

文章编号:1671-1513(2011)04-0050-08

抗冻蛋白的研究进展及其在食品工业中的应用

汪少芸¹, 赵璐¹, 吴金鸿², 陈琳¹

(1. 福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350002;

2. 上海交通大学 生物与食品学院, 上海 290002)

摘要: 抗冻蛋白是一类具有热滞效应、冰晶形态效应和重结晶抑制效应的蛋白质,因其特殊的结构和功能,抗冻蛋白引起了研究人员的极大兴趣. 探讨了近年来抗冻蛋白的研究进展,介绍了目前已知的抗冻蛋白的来源、特性、测定方法、基因结构及在食品工业中的应用. 抗冻蛋白对冷冻食品有显著的品质改良功能,是未来冷冻食品工业中极具潜力的抗冻添加剂.

关键词: 抗冻蛋白; 热滞活性; 冰晶抑制; 食品添加剂

中图分类号: TS202.3; TQ936.2

文献标志码: A

低温冻害对大多数生物体是致死性的,它导致细胞内环境脱水、结晶,造成细胞物理性的损害或死亡^[1]. 极地海洋和加拿大东部沿海水域的冬季水温大约在 $-1.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,这一温度远远低于一般海洋鱼类血液的冰点($-0.7\sim-0.9\text{ }^{\circ}\text{C}$),但是仍有许多鱼类在这一低温环境下继续生存,尽管鱼体直接与冰接触,却不发生冻结现象^[2-3]. 生物体能够采取一些策略适应高山、极地等寒冷的环境,包括合成一种血清蛋白阻止其血液结冰,这种血清蛋白就是抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs). 抗冻蛋白是一类抑制冰晶生长的蛋白质,它能以非依数性形式降低水溶液的冰点而对其熔点影响甚微,于是导致水溶液的熔点(melting point, MP)和冰点(freezing point, FP)之间出现差值,这种差值称为热滞活性(thermal hysteresis activity, THA),因而抗冻蛋白亦称为热滞蛋白或温度迟滞蛋白(Thermal Hysteresis Proteins, THPs)^[4]. 抗冻蛋白是保护机体在结冰或亚结冰条件下(接近并高于结冰温度)免受伤害的蛋白质家族中的一种,它可以非依数性地降低机体胞外基质和体液的冰点同时使熔点不变,这个过程被称作热滞后^[4-5].

抗冻蛋白最早在极地鱼类中发现,到目前,科学家已经在鱼类、昆虫、植物、细菌和真菌体内发现了

多种抗冻蛋白^[6]. 尽管这些不同来源的抗冻蛋白无论结构或活性都存在很大的差异,但是其抗冻机理是一致的,即都是通过与冰晶结合,或者通过影响冰晶的形状及大小来发挥作用. 基于抗冻蛋白影响冰晶结构的这一特性,对抗冻蛋白的最新定义是“Ice Structuring Protein”,即制约冰晶结构的蛋白质^[7]. 抗冻蛋白以其独特的功能和潜在的商业价值引起了众多学者的关注,抗冻蛋白在低温冷链的众多食品加工和运输过程也发挥着重要的作用.

1 抗冻蛋白的来源

至今,在鱼、昆虫、植物和细菌等生物体中发现抗冻蛋白,按照来源的不同,抗冻蛋白被分类为鱼类抗冻蛋白、昆虫抗冻蛋白、植物抗冻蛋白和细菌抗冻蛋白.

1.1 鱼类抗冻蛋白

1.1.1 抗冻糖蛋白(AFGPs)

AFGPs主要存在于生活在两极的某些鱼类中,如齿鱼类(*Dissostichus*)、贝氏肩鲑(*Trematomus bernacchii*)及北半球高纬度海域中的鱼如大西洋鳕(*Gadus morhua*)、北鳕(*Boreogadus Saida*)的血液中^[8]. AFGPs主要由3肽糖单位[-Ala-Ala-Thr(双

糖基)-]以不同重复度串联而成。AFGPs的分子量一般为2.5~33.7 ku,糖基是抗冻活性形成的主要基团,且活性与分子量有关,分子量大者,一般活性也高^[9]。推测它形成一种与多聚脯氨酸II相似的左手螺旋结构,其双糖疏水基团面向碳骨架,亲水基团面向溶液^[10]。

1. 1. 2 I型抗冻蛋白(AFP I)

AFP I在美洲黄盖鲈鱼(*Pseudopleuronectes americanus*)、床杜父鱼(*Myoxocephalus scorpius*)等中存在^[11]。AFP I的一级结构是由11个氨基酸残基组成的多肽单元[-Thr-(Ala)₂-Asx-(Ala)₇-]重复串联而成。Ala含量约为65%,分子量为3.3~4.5 ku。Asn/Asp的比例和Thr是确定其抗冻功能的主要影响因子。通过X-射线研究其晶体结构,发现其二级结构全为 α -螺旋,且为双亲螺旋结构,这样其亲水氨基酸具有较大的摆动能力,可以粘附到不同的冰晶表面,抑制冰晶生长^[12]。

1. 1. 3 II型抗冻蛋白(AFP II)

AFP II在几种鱼类如海渡鸦、胡爪鱼和鲱鱼等的血清中存在。显著特点是Cys含量比较高(约为8%),并且半数Cys都能形成二硫键,用巯基乙醇或二硫苏糖醇处理都会导致热滞活性丧失,因此这些二硫键对保持分子结构稳定性及抗冻活性有重要作用。AFP II的分子量为11~24 ku,是鱼类AFP中分子量最大的一类。它也是唯一在蛋白质序列库中查出与其他蛋白质具有同源性的AFPs^[13]。根据AFP II和C型凝集素碳水化合物识别区域同源的特点,进行类比分析,认为AFP II有2个 α -螺旋,2个 β -折叠和大量无规则结构^[14]。

1. 1. 4 III型抗冻蛋白(AFP III)

AFP III主要存在于几种*Zoarcooid*科的鱼中,如大头鳊和狼鱼。从南极大头鳊(*Austrolyciethys branchycephalus*)的血清中分离出两种AFP III。而从另一种南极大头鳊(*Lycodichthys dearborni* or *Rhizophila dearborni*)的血浆中发现了8种AFP III,它们是同一类球蛋白,在这种AFPs中Ala和Cys的含量都不高,分子量为6.5~14 ku。对一种含66个残基的AFP III用NMR和X-射线衍射技术分析表明:其二级结构主要由9个 β -折叠组成,其中8个 β -折叠组成三明治夹心结构,另一个 β -折叠则游离在其外,这种三明治结构的“夹心”是2个反向平行的3个串联 β -折叠,外边则是2个反向平行的 β -折叠^[13]。

1. 1. 5 IV型抗冻蛋白(AFP IV)

IV型抗冻蛋白含有108个氨基酸,分子量约为12.3 ku,并且含有高达17%的Glu,N-末端连接有一个焦谷氨酰胺基团。该抗冻蛋白的序列与膜载脂蛋白非常相似,通过圆二色谱分析表明该蛋白和载脂蛋白也具有类似结构:有较高的 α -螺旋结构,其中4个 α -螺旋反向平行排列折叠成一个螺旋束。疏水基团向内,亲水基团向外,亲水基的表面可与冰晶结合,鱼可以把它作为一种屏障来阻止冰晶从皮肤表面渗入。该蛋白很有可能是由膜载脂蛋白进化而来^[14]。

1. 2 昆虫抗冻蛋白

一些越冬的昆虫体内存在超活性的AFP,维持其体液的过冷(Supercooling)状态。目前昆虫中抗冻蛋白的分离纯化主要在4种昆虫中开展,分别为黄粉虫(*Tenebrio molitor*)、美洲脊胸长椿(*Oncopeltus fasciatus*)、枞色卷蛾(*Choristoneura fumiferana*)和*Dendroides canadensis*。

昆虫抗冻蛋白的分子量一般为8~9 ku,无糖基,与鱼类AFP I型相似,含有较多的亲水性氨基酸(例如Thr, Ser, Asx, Glx, Lys, Arg),有40%~59%的氨基酸残基能形成氢键^[14]。有些昆虫AFPs类似于鱼类AFP II,含有一定数量的半胱氨酸^[15]。一般来讲,昆虫抗冻蛋白抑制冰晶生长的活性更高于鱼类或植物抗冻蛋白^[16]。它的最大活性可能达到鱼类抗冻蛋白最大活性的3~4倍,而且在毫摩尔浓度其活性会比鱼类抗冻蛋白的活性高出10~100倍^[17],分子结构也大不一样,这可能与冬季陆地的温度更低有关^[13]。

1. 3 植物抗冻蛋白

植物生长发育过程中,温度作为一个重要的环境因子对其生长、生殖和分布起着关键的作用。低温不仅在很大程度上限制植物的种植范围,同时还会造成减产和品质下降,严重时甚至绝收^[18]。

植物抗冻蛋白同时具有抗冻、抗病双重功能。植物抗冻蛋白提高植物抗冻性的主要途径不是阻止冰晶的形成,而是调控胞外冰晶的增长及抑制冰的重结晶,避免冰晶增大而产生致死性的机械损伤^[19]。植源性AFP主要分布于南北回归线以外高纬度地区以及高山高寒区,常见的有高山雪莲^[20]、胡萝卜^[21-22]、黑麦草^[23]、沙冬青^[24]等,它们共同的特点是都经受了冷诱导,因此可以推测产生AFP是植物本身应对外界寒冷变化的一种策略^[25]。苦

甜茄属(*Solanum dulcamara*) AFP, 分子量为 12.4 ku, 含有两个分别由 56 和 57 个氨基酸残基组成的锌指结构域, 两个锌指结构域之间为酸性结构域, 第 1 个锌指结构域上游为富含 Glu 的区域, C-端有 10 个保守的 13 个氨基酸的重复^[26]. 长青黑麦(*Lolium perenne*) AFP, 分子量为 40.0 ku, 其 N-端 20 个氨基酸残基为 SDDL SFIFNKFVPCQTDILF, 为糖蛋白, 该序列与植物凝集素有较高同源性^[27].

1.4 细菌抗冻蛋白

在加拿大北极地区的植物根际中发现一种根瘤菌(*Pseudomonas putida* GR12-2), 能耐受 -20 ℃ 和 -50 ℃ 的冰冻温度而存活下来, 在 5 ℃ 生长温度下, 会合成和分泌一种具有抗冻活性的蛋白质. 这种蛋白质分子量为 164 ku 的糖脂蛋白, 实验证实了这种菌抗冻的机制之一是 AFP 的聚集^[28-29].

来源于南极洲的细菌中有 6 种可以产生抗冻蛋白, 其中热滞活性最高的一种 AFP 是由 82 号菌株(*Moraxella* sp.) 产生的一类脂蛋白(AFLP), N-端氨基酸顺序与该菌的外膜蛋白有很高的相似性, 这是首次报道的第一类抗冻脂蛋白^[30].

2 抗冻蛋白的性质

抗冻蛋白几种特殊的性质, 使之具有不同于其他蛋白的“抗冻”活性, 即保护低温作用.

2.1 热滞活性

抗冻蛋白具有热滞活性, 抗冻蛋白能以非依数形式降低水溶液的冰点但不影响其熔点, 冰点和熔点的差值称为热滞活性, 差值越大抗冻活性越大^[29]. 抗冻蛋白抗冻作用的大小与本身的性质有关而与数量无关, AFPs 的这种特性称为抗冻作用的非依数性(noncolligative). AFPs 降低鱼血清、昆虫、植物体液或水溶液冰点的效率比一般溶质要高, 按重量浓度算比 NaCl 的效率高 2 倍; 按摩尔浓度算, 比 NaCl 的效率高 200~500 倍, 这说明 AFPs 降低体液冰点的机制与盐类(如 NaCl)不同, 一般溶液(如 NaCl, 蔗糖溶液等)的冰点是固、液两相蒸汽压平衡时的温度, 因而冰点等于熔点^[9]. 而 AFPs 在其溶液中只影响结冰过程, 几乎不影响融化过程, 所以使冰点低于熔点^[8]. 影响热滞活性的因素主要有 AFP 浓度、肽链长度和一些小分子量溶质. AFP 浓度越大, 热滞活性越大; 高分子量糖肽比低分子量糖肽热滞活性更强; 一些小分子量溶质如柠檬酸盐、甘

油和山梨醇能显著阻止冰核的形成, 提高昆虫的热滞活性^[31].

2.2 改变冰的生长习性

抗冻蛋白具有冰晶形态效应, 改变冰的生长习性, 而且这种作用在不同方向上有强弱之分, 由此引起冰晶形态的改变. 冰通常以平行于晶格基面(a 轴)的方式生长, 在垂直基面(c 轴)很少生长, 因此冰晶格呈扁圆状. 低浓度 AFP 优先抑制冰沿 a 轴生长, 因此冰晶格的六边柱表面变得明显. 而在高浓度 AFP 下, 冰晶格主要沿 c 轴生长, 形成六边双棱锥及针形晶体^[9,32].

2.3 重结晶抑制效应

抗冻蛋白还具有重结晶抑制效应, 在低于溶点几度的温度下, 冰有重结晶的趋势, 即大的冰晶可以取代小的冰晶, 而抗冻蛋白可能通过控制发生冰冻的组织中冰晶的大小和形状减缓或阻止这一过程^[28], 以形成体积小而比较均匀的晶体. 在范德华力、疏水相互作用和氢键作用下^[33], 抗冻蛋白吸附到液体中的冰核表面, 抑制冰核生长并降低冰点^[34-35], 保护有机体免受结冰引起的伤害^[36]. 在耐冻植物内和耐冰昆虫(仅限于细胞外结冰)体内, 重结晶抑制作用可能比热滞效应更为重要. AFPs 主要通过重结晶抑制作用来避免冰晶体对细胞组织的伤害, 因为重结晶化的抑制作用比冰晶生长的抑制作用更容易达到, 只需少量 AFPs (20 μg/mL) 就有较高的重结晶化抑制活性^[37].

2.4 降低过冷却点

抗冻蛋白能够调节动植物原生质体的过冷状态, 使过冷点降低. 过冷却点低于昆虫体液的临界温度是昆虫致死的主要原因, 而抗冻蛋白可以抑制促进冰晶生长的冰核蛋白的活性, 调节原生质溶液的过冷状态, 降低过冷却点, 使昆虫具有抗寒能力^[8]. 越冬植物 AFP 可能也具有此功能, 但目前还缺乏足够的证据^[29].

2.5 保护细胞膜

鱼中发现的 AFPs 可以和细胞膜结合, 增加膜的稳定性从而起到抗冻作用, 在昆虫中也发现部分 AFPs 位于细胞膜上, 在低温甚至零度以下可增强细胞的活性^[29,38]. AFPs 还可以抑制玻璃化损伤, 这也许通过阻断 Ca²⁺ 和 K⁺ 离子通道达到对细胞膜的保护作用^[8].

3 抗冻活性的测定

不同于其他蛋白质的活性测定, 抗冻蛋白的活

性测定基本都要涉及“低温”过程,所以其操作稳定性和操作成本就成为设计、建立活性测试方法的挑战。至今,根据抗冻蛋白的上述性质,已经建立起来的抗冻活性测定方法包括热滞活性的测定和低温保护活性的测定。

3.1 热滞活性的测定

3.1.1 传统测定法

早期的测定方法是把抗冻蛋白样品溶液加入毛细玻璃管中,密封,通过降低温度或其他方法,使样品结冰,然后使温度回升,部分融化结冰,保留一个晶核^[39]。把装有样品的毛细管放入盛有预冷的温度稍微低于样品冰点的95%乙醇的浴锅中,缓慢降温或升温,通过放大镜观察冰核增大或缩小,冰核缓慢生长或融化的温度分别为冰点和熔点,二者之差即为热滞活性^[40]。这种方法不需要仪器,但操作复杂,且误差较大,后来被进一步改进^[41]:把样品溶液盛在玻璃皿中,放入有恒温器调温,温度稍微低于样品冰点的95%乙醇的浴锅中,取出玻璃皿,迅速加入氟利昂,诱导形成冰核,然后重新放入浴锅中。用200 W白炽灯做光源,光线通过准直仪和极性过滤器进入浴锅,样品皿的图像通过4倍光学放大镜投射在白色屏幕上。在黑色的各向同性的液相背景下,可以看到冰晶的生长和缩小^[40]。通过精确的热变电阻器来监测温度,如果浴锅温度稍微低于样品冰点,晶体缓慢生长,20 min增加0.5 mm。生长速度略高于此的温度即视为冰点,晶体缩小速度略高于此的温度即视为熔点^[39]。

3.1.2 纳升渗透压计法

纳升渗透压计(nanoliter osmometer)是一种冰点渗透压计,测量溶液冰点下降的精密仪器。它既能缓慢升温 and 降温,又能快速升温 and 降温。在纳升渗透压计系统中,可以借助显微镜来观察冰晶的增大或缩小。抗冻蛋白加在钠盐缓冲液中^[39]。样品板放在渗透压计系统电热控温的显微镜台上。该镜台利用珀尔帖效应(peltier effect)能够在0~-9℃(误差为0.01℃)范围内调节温度,而且可以通过快速冷冻方式达到-40℃的低温。运用很细的毛细管向样品槽中心加入一滴(大约10 μL)样品。通过快速降温到-40℃,样品快速冷冻。然后温度升高,部分融化样品,直至留下一个50~63 μm的冰晶。小心升温或降温,诱导冰晶缓慢生长或缓慢缩小的温度分别看作冰点和熔点,二者之差即是样品的热滞活性^[40]。

3.1.3 差示扫描量热法

差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC法)是一种热分析法,测量输入到试样和参比物的热量与温度的关系,主要通过测定体系结晶过程中吸热和放热的变化,检测体系发生的物理变化。可以通过测定升温及降温过程中热焓的变化来判断冰点与熔点,确定真实的结晶起始温度,进而获得准确客观的热滞活性测定结果,而且DSC法可以精确测定体系的冰晶含量,缺点在于检测花费的时间较长,需要高精度的设备^[42]。

张超等^[43]用差示扫描量热法测定了重组胡萝卜抗冻蛋白的热滞活性,将等体积的样品与参比溶液密封于铝制坩埚中放置在样品池中央,通过升温降温过程记录样品的结晶温度、保留温度等参数,最后根据公式计算得出该重组胡萝卜抗冻蛋白的热滞活性为 $(0.0957 \pm 0.00368)^\circ\text{C}$,并对其稳定性、专一性和精密度进行了评价。

3.1.4 量热仪法

量热仪法是利用一种液氮气化扫描量热仪(liquid nitrogen resistance thermometer, LNRT),通过样品与液氮热交换的过程测定,进行样品量热。张党权^[44]等采用高精度的量热仪(Model 5614 Platinum LNRT)来检测重组表达的胡萝卜抗冻蛋白的热滞活性。该仪器的精确度为0.01℃,采用液氮进行程序降温,通过计算机采集并分析数据。此方法操作简单方便,重复性较好。

3.2 低温保护活性的测定

3.2.1 细菌低温保护

抗冻保护实验是通过低温处理细菌培养液之后,平板培养一段时间然后计数菌落数来统计细菌的存活率,存活率越高,抗冻蛋白的低温保护活性越高。或者采用分光光度计测定经低温处理后的细菌培养液的OD₆₀₀值作为指标,OD₆₀₀值越高,表明细菌个数越多,抗冻蛋白的低温保护活性越高^[45]。

3.2.2 细胞低温保护

细胞低温保护实验与细菌低温保护实验过程相似,但其将细胞放置在低温条件不同时间后还要将细胞再回到37℃复温,测量细胞的LDH释放量、ATP含量及WST-8等指标。其中,LDH是一种细胞质酶,存在于所有组织中,在大多数哺乳动物中常常都会表达,在许多病理情况下引起血浆水平升高。当细胞膜受外界影响而变性,细胞内LDH则开始泄漏,细胞外LDH活性随着细胞膜的破坏而增加,由

此反映出被损伤细胞的比率;ATP含量,即细胞能量水平,测定细胞内ATP含量能够进一步表征低温保存对细胞的损伤;保存细胞的生存能力可以通过WST-8还原法来评价,它可以反映出胞内酶通过依赖NADH脱氢酶系统而将WST-8还原的能力^[46].LDH越低,胞内ATP含量越高,胞内WST-8减少量越大,则抗冻蛋白的低温保护性越高.

3.2.3 冰淇淋低温保护

将抗冻蛋白样品与不含稳定剂、抗冻剂的冰淇淋基体(ice cream basic mix)混合,取一定量滴加到载玻片上,盖上盖玻片,将载玻片放入热量平台,然后迅速冷却,保持一段时间后用显微镜记录下该状态下的冰晶形态.接着再以一定的速度将样品缓慢升温并做冷热循环(cold-heat-stage-cycle)后用显微镜记录冰晶形态^[47].这样,通过软件分析冰晶颗粒的大小与均匀程度就可以推断出样品的抗冻活性,冰晶颗粒越小、越均匀,则说明抗冻蛋白的抗冻活性越高.

4 抗冻蛋白基因

研究发现,AFP是被多基因家族编码的,4类AF的基因均被克隆,它们都是串联重复的多基因家族^[48].抗冻糖蛋白AFGP基因序列中结构基因是46个正向串联的同源性片段,44个是编码AFGP8,2个是编码AFGP7的,每个片段编码一个AFGP和三肽内含子.冬鲱基因组中约含40个AFP基因拷贝,其中2/3是正向串联重复排列,每个AFP重复序列中含有一个AFP基因,几个AFP基因的转录方向均相同,其余1/3也是相连,但被不规则的间隔区分开.大多数能够产生抗冻蛋白的生物体内并不只有单一的分子结构,而是有一组异源分子同时具有抗冻活性.

鱼类具有10个以上可确定的分子结构具有抗冻活性.有些抗冻蛋白在生物体内有多个拷贝存在,最多可以达到100个以上.北半球鱼类AFP也是多基因家族编码,经研究证明冬鲱单位体基因中约含AFP基因的40个拷贝,其中2/3是正向串联重复排列,每个AFP重复序列中含有一个AFP基因,几个AFP基因的转录方向均相同,其余1/3也是相连但被不规则的间隔区分开.冬季比目鱼皮肤和肝中的抗冻蛋白基因都是多拷贝的(30~40个),其皮肤型抗冻蛋白不含有分泌信号肽及其前体,说

明这类抗冻蛋白是在细胞内发挥作用的.肝型抗冻蛋白基因主要在肝中,少量在肠道中表达;而皮肤型抗冻蛋白基因在肝以及皮肤、鳍、鳞、鳃等外部组织中都能表达,表明其在保护外部组织免受冻害中发挥着重要的作用^[48].从12月份的甲虫(*Dendroides canadensis*)幼虫的cDNA文库中,分离到了10个可能的抗冻蛋白基因,说明这种抗冻蛋白也是由多基因簇编码的^[49].海渡鸟基因组中AFP II有12~15个拷贝,其序列测定表明,2~2kbDNA序列为6个AFP外显子,其两侧25kb范围未能检测到第二个该基因拷贝,大概该基因拷贝是较大重复的单一部分.北冰洋绵鳚基因组AFP III的0~7kb长基因约有150个拷贝,其中大多数拷贝是相连的,但不像冬鲱那样正向串联重复,而是由10~12个不规则间隔的基因聚集成簇^[49].柞色卷蛾(*Choristoneura fumiferana*) AFPs基因*Afp-Lul*和*Afp-Iul*的克隆.该AFPs基因有着相似的结构:外显子串联在一起,其间由3~316kb的内含子隔开^[50].

抗冻蛋白在生物体内的表达受温度和季节变化的影响而改变,从夏季到冬季抗冻蛋白及其mRNA的量可以成倍地增加,最高可以达到1000倍.冬季比目鱼肝型抗冻蛋白mRNA的量可以达到夏季量的几百倍,而肾和鳍中抗冻蛋白mRNA的量只有5~10倍的变化^[48].柞色卷蛾幼虫抗冻蛋白转录比较特殊,主要受发育时期的调控,而不是受季节性低温调控^[51].该特性为生物在冰冻环境中获得尽可能多抗冻蛋白的保护提供了遗传学基础.

5 抗冻蛋白在食品工业中的应用

冷冻食品业在食品工业中所占的份额越来越大,低温冷链中众多食品发生结晶和重结晶现象对细胞组织结构发生破坏作用,造成细胞内汁液流失.水的结晶导致溶液的局部浓缩现象又促使细胞内组分的性质发生改变,发生蛋白质变性、淀粉回生等现象,这些现象最终使产品品质受到严重破坏^[52].作为一类新型的食品添加剂,抗冻蛋白可以有效减少冷冻贮藏的食品中冰晶的形成和重结晶,而提高低温冷链系列食品的质量.

5.1 在冷冻乳制品中的应用

评价冰淇淋质量高低的一个重要的指标是其中的冰晶体越细小越好.如果在冷藏、运输、销售任何一个冷链环节出现较高的温度就会发生重结晶现

象,生成较大的晶体,从而影响冰淇淋的口感. 添加抗冻蛋白可以有效防止冷冻贮藏的食品中冰晶的形成. 美国的 DNAP 公司将 AFP 添加于冰淇淋和牛奶中,消除了冰渣,改善了质量和口味^[31]. Wang^[53] 等将冰淇淋经过 cold-heat-stage 处理后用显微镜观察冰晶生长情况,结果发现,加有抗冻蛋白的冰淇淋样品冰晶细小且均匀,而未加抗冻蛋白的冰淇淋样品冰晶大且不均匀.

5.2 在冷却/冷冻肉中的应用

肉制品的冷冻、冷藏中,加入 AFPs 可以有效地减少渗水和抑制冰晶的形成,保持原来的组织结构,减少营养流失^[29]. 据报道,将 AFPG 于屠宰前注入羔羊体内,宰后肉体经真空包装,在 -20 °C 冻藏 2 ~ 16 周,然后解冻,观察肉的冷冻质量. 结果发现,无论在屠宰前 1 h 或 24 h 注射 AFPG,均可有效降低冰晶体的体积和液滴的数量. AFPG 终注射浓度达到 0.01 mg/kg 时,特别是在宰前 24 h 注射时,可以获得最小的冰晶体^[7].

抗冻蛋白已能进行人工合成,因其具有潜在的商业价值,美国已通过遗传路线开发出了这种产品^[54]. 在食品中的应用还包括保护柑桔果实免受冷冻损伤,保护烘焙品(特别是面包烘焙用酵母,需经历冷冻-解冻循环和贮存)及啤酒酵母等,它们在冷冻食品领域的应用被认为几乎是无限的.

5.3 在果蔬保鲜中的应用

速冻果蔬在冻藏解冻过程中常出现的主要问题是汁液流失、软烂、失去原有的形态. 造成汁液流失的原因与食品的原料处理、冻结方式、包装、冻藏条件以及解冻方式有关,而最关键的因素则是冻藏过程中的温度波动导致重结晶^[8]. 运用基因工程的方法,将异源高活性抗冻蛋白基因转移到果蔬上并使之表达,得到的转基因果蔬能够有效改善这种状况.

5.4 在冷冻面团技术中的应用

冷冻面团技术是一种烘焙食品加工新技术,一方面由中心工厂进行面团搅拌、切块、成型、冷冻,另一方面由烘焙房、超市、快餐店在需要时进行解冻、醒发和烤制^[55]. 然而,冷冻面团经过长时间冻藏,面团的品质会下降,如醒发时间延长,面包比容减小等^[56]. Zhang^[57] 等研究了抗冻蛋白对冷冻面团质地特性的影响,结果发现,添加抗冻蛋白的实验组冷冻面团的硬度比对照组更加柔软和稳定,这主要是因为较低的结冰水含量.

食品在低温贮藏、运输等过程中,抗冻蛋白有

效抑制其冰晶的形成和重结晶化而使食品保持质地的柔软性,并能减少滴液以防止营养成分的损失. 目前,由于抗冻蛋白的售价很高,仅适宜于研究和专门的应用,因此,如何不断地降低抗冻蛋白的成本,是实现其在食品工业中广泛应用的关键.

参考文献:

- [1] 彭淑红,姚鹏程,徐宁迎. 抗冻蛋白的特性和作用机制[J]. 生理科学进展,2003,34(3):238-240.
- [2] Mariève D, Nathalie R L, Garth L F, et al. High antifreeze protein levels in wolffish (*Anarhichas lupus*) makethem an ideal candidate for culture in cold, potentially ice laden waters[J]. Aquaculture,2007,272:667-674.
- [3] 钟其旺,樊廷俊. 鱼类抗冻蛋白的研究进展[J]. 生物化学与生物物理学报,2002,34(2):124-130.
- [4] Zhang D Q, Liu B, Feng D R, et al. Expression, purification, and antifreeze activity of carrot antifreeze protein and its mutants[J]. Protein Expression and Purification, 2004,35:257-263.
- [5] Wang S, Amornwittawat N, Juwita V, et al. A key residue for the enhancing ability of an antifreeze protein of the beetle *Dendroides Canadensis* [J]. Biochemistry, 2009, 48:9696-9703.
- [6] Steffen P G, Brian D S. Cold survival in freeze-intolerant insects: the structure and function of β -helical antifreeze proteins[J]. Biochemistry,2004,271:3285-3296.
- [7] Jia Z C, Davies P L. Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction [J]. Trends in Biochemical Sciences,2002,27:101-106.
- [8] 韩永斌,刘桂玲. 抗冻蛋白及其在果蔬保鲜中的应用前景[J]. 天然产物研究与开发,2003,15(4):373-378.
- [9] 尹明安. 胡萝卜抗冻蛋白基因的克隆及其对番茄的转化[D]. 乌鲁木齐:新疆大学,2001:8-12.
- [10] 谢秀杰,贾宗超,魏群. 抗冻蛋白结构与抗冻机制[J]. 细胞生物学杂志,2005,27:5-8.
- [11] Prathalingam N S, Holt W V, Revel S G, et al. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw [J]. Theriogenology, 2006, 66(8):1894-1900.
- [12] Steffen P G, Carolyn M S, Peter L D, et al. Structure of type I antifreeze protein and mutants in supercooled water [J]. Biophysics,2001,81(3):1677-1683.
- [13] 田云,卢向阳,张海文,等. 抗冻蛋白研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2002,22(6):48-53.
- [14] 李芳,王博,艾秀莲,等. 抗冻蛋白研究进展[J]. 新

- 疆农业科学,2003,40(6):349-352.
- [15] 费云标,江勇,赵淑慧,等. 昆虫抗冻蛋白的研究进展[J]. 昆虫学报,2000,43(1):98-102.
- [16] Mao X F, Liu Z Y, Ma J, et al. Characterization of a novel β -helix antifreeze protein from the desert beetle *Anatolica polita*[J]. Cryobiology,2011,62:91-99.
- [17] Yue C W, Zhang Y Z. Cloning and expression of *Tenebrio molitor* antifreeze protein in *Escherichia coli* [J]. Mol Bio Rep,2009,36:529-536.
- [18] 陈儒钢,巩振辉,逯明辉. 植物抗寒基因工程研究进展[J]. 西北植物学报,2008,28(6):1274-1280.
- [19] 高媛,田淑琴. 抗冻蛋白新近研究进展及面临的挑战[J]. 兽药研究与应用,2010(10):45-46.
- [20] 李璐,王晓军,赵安民. 新疆雪莲新的内切几丁质酶类冷诱导基因的分离、克隆和测序[J]. 植物生理学通讯,2005(6):731-736.
- [21] Smallwood M, Worrall D, Byass L, et al. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*) [J]. Biochemical Journal,1999,340:385-391.
- [22] Meyer K, Keil M, Naldrett M J. A leucine-rich repeat protein of carrot that exhibits antifreeze activity [J]. Febs Letters,1999,447(2-3):171-178.
- [23] Griffith M, Antikainen M, Hon W C, et al. Antifreeze proteins in *winter rye*[J]. Physiologia Plantarum,1997,100(2):327-332.
- [24] Fei Y B, Wei L B, Gao S Q, et al. Isolation, purification and characterization of secondary structure of antifreeze protein from *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. Chinese Science Bulletin,2001,46(6):495-498.
- [25] Atici O, Nalbantoglu B. Antifreeze proteins in higher plants [J]. Phytochemistry,2003,64(7):1187-1196.
- [26] Huang T, Duman J G. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*[J]. Plant Mol Biol,2002,48(4)339-350.
- [27] Kuiper M J, Davies P L, Walker V K. A theoretical model of a plant antifreeze protein from *Lolium perenne* [J]. Biophys J,2001,81(6):3560-3565.
- [28] 刘晨临,黄晓航,李光友. 抗冻蛋白的研究及其在生物技术中的应用[J]. 海洋科学进展,2002,20(3):102-109.
- [29] 孙琳杰. 新疆荒漠昆虫抗冻蛋白在酿酒酵母低温保存中的应用[D]. 乌鲁木齐:新疆大学,2008:9-12.
- [30] Yamashita Y, Nakamuta N, Omiya K, et al. Identification of an antifreeze lipoprotein from *Moraxella* sp. of Antarctic origin [J]. Biosci Biotechnol Biochem,2002,66(2):239-247.
- [31] 冯从经,陆剑锋,吕文静,等. 抗冻蛋白研究进展[J]. 江苏农业学报,2007,23(5):481-486.
- [32] 陈晓军. 抗冻蛋白研究进展[J]. 生命的化学,2000,20(4):170-174.
- [33] Davies P L, Baardsnes J, Kuiper M J, et al. Structure and function of antifreeze proteins [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,2002,357:927-935.
- [34] Daley M E, Spyropoulos L, Jia Z, et al. Structure and dynamics of a β -helical antifreeze protein [J]. Biochemistry,2002,41(17):5515-5525.
- [35] Baardsnes J, Kuiper M J, Davies P L. Antifreeze protein dimer, when two ice-binding faces are better than one [J]. Journal Biology Chemistry,2003,278(40):38942-38947.
- [36] Swanson W J, Aquadro C F. Positive darwinian selection promotes heterogeneity among members of the antifreeze protein multigene family [J]. J Mol Evol,2002,54(3):403-410.
- [37] 江勇,贾士荣,费云标,等. 抗冻蛋白及其在植物抗冻生理中的作用[J]. 植物学报,1999,41(7):677-685.
- [38] Jessie N, Joseph E O'T, John G D. Expression of a beetle, *Dendroides canadensis*, antifreeze protein in *Drosophila melanogaster dendroides canadensis*[J]. Journal of Insect Physiology,2006,52:888-896.
- [39] 邵强,李海峰,刘国生,等. 抗冻蛋白的抗冻活性及其测定方法[J]. 平原大学学报,2005,22(4):111-113.
- [40] 李岩. 偃麦草非质体蛋白抗冻活性的研究[D]. 沈阳:东北农业大学,2008:14-17.
- [41] Daniel M M, Kieran F G, Yin Y, et al. Antifreeze glycoproteins from *Polar Fish*[J]. J Biol Chem, 1980,255(2):659-662.
- [42] Zhang C, Zhang H, Wang L. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough [J]. Food Research International,2007,40:763-769.
- [43] 张超,赵晓燕,马越,等. 使用差示扫描量热仪测定抗冻蛋白热滞活性方法的研究 [J]. 生物物理学报,2008,24(6):465-473.
- [44] 张党权,刘兵,范云,等. 胡萝卜抗冻蛋白在大肠杆菌中的高效表达[J]. 中山大学学报,2003,42(3):51-55.
- [45] 吕国栋,马纪. 检测抗冻蛋白生物学活性两种方法的比较[J]. 新疆大学学报:自然科学版,2007,24(1):77-80.

- [46] Yu H, Yoshiyuki N, Shuichiro M, et al. Hypothermic preservation effect on mammalian cells of type III antifreeze proteins from *notched-fin eelpout* [J]. *Cryobiology*, 2008, 57: 46–51.
- [47] Wang S Y, Damodaran S. Optimisation of hydrolysis conditions and fractionation of peptide cryoprotectants from gelatin hydrolysate [J]. *Food Chemistry*, 2009, 11: 620–630.
- [48] Gong Z, Ewart K V, Hu Z, et al. Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes am ericanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and pro sequences [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(8): 4106–4112.
- [49] Andorfer A C, Duman J G. Isolation and characterization of cDNA clones encoding antifreeze proteins of the pyrochroid beetle *Dendroides canadensis* [J]. *J Insect Physio*, 2000, 46: 365–372.
- [50] Daniel D, Michael G T, Peter L D, et al. A family of expressed antifreeze protein genes from the moth, *Choristoneura fumiferana* [J]. *FEBS*, 2002, 269: 38–46.
- [51] Doucet D, Tyshenko M G. A family of expressed antifreeze protein genes from the moth, *Choristoneura fumiferana* [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 263: 38–46.
- [52] 周素梅, 廖红. 未来的食品原料——抗冻蛋白 [J]. *冷饮与速冻食品工业*, 2011, 7(4): 37–38.
- [53] Wang S Y, Damodaran S. Ice-structuring peptides derived from bovine collagen [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 5501–5509.
- [54] 胡爱军, 郑捷, 丘泰球. 抗冻蛋白及其在食品中的应用 [J]. *西部粮油科技*, 2002, 27(2): 28–31.
- [55] 潘振兴, 邹奇波, 黄卫宁. 冰结构蛋白对长期冻藏冷冻面团抗冻发酵特性与超微结构的影响 [J]. *食品科学*, 2008, 29(8): 39–42.
- [56] Bhattacharya M, Langstaff T M, Berzonsky W A. Effect of frozen storage and freeze-thaw cycles on the rheological and baking properties of frozen doughs [J]. *Food Research International*, 2003, 36: 365–372.
- [57] Zhang C, Zhang H, Wang L. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb [J]. *LWT*, 2008, 41: 1029–1036.

Research Progress in Antifreeze Proteins and Application in Food Industry

WANG Shao-yun¹, ZHAO Jun¹, WU Jin-hong², CHEN Lin¹

(1. College of Biological science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China;

2. College of Biology and Food Science, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 290002, China)

Abstract: Antifreeze proteins (AFPs) are the thermal hysteresis proteins that have the ability to modify the growth and inhibit the recrystallization of the ice. Antifreeze proteins aroused great interests of many researchers due to its special structure and functions. In this article, the recent advance in antifreeze protein was reviewed, and the types, properties, measurements, gene structures of antifreeze protein, and its applications in food industry were introduced. The application trials indicated that antifreeze protein could significantly improve the qualities of frozen foods, which suggested the potential food additives of antifreeze protein in future frozen food industry.

Key words: antifreeze proteins; thermal hysteresis activity; crystallization inhibition; food additives

(责任编辑:叶红波)