

复合抗冻剂的研制及对鲷鱼肌原纤维蛋白的抗冻效果

逯晓燕^{1,3}, 丛海花^{1,2*}, 沈益诚¹, 赵勇^{3*}, 陈继伟^{2,3}, 江雨桐^{2,3}

¹大连海洋大学食品科学与工程学院 辽宁大连 116023

²苏州农业职业技术学院食品科技学院 江苏苏州 215008

³中科荣耀(苏州)生物科技有限公司 江苏苏州 215152

摘要 以鲫鱼鱼鳞为原料,用胰蛋白酶酶解法获得抗冻粗肽。以抗冻粗肽、海藻糖和褐藻寡糖为因素,运用{3,3}单纯形格子法进行配方设计,以冷冻 24 h 后嗜热链球菌的存活率为抗冻活性筛选指标,获得复合抗冻剂理论模型配方。选用复合抗冻剂最优组(K1、K2)和理论模型配方组(K3)进行冷冻鲷鱼肌原纤维蛋白试验,验证复合抗冻剂的抗冻效果。结果表明:抗冻粗肽组嗜热链球菌的存活率达 57.11%。与大豆卵磷脂互作的红外光谱显示:抗冻粗肽可能与磷脂亲水头部和水之间发生相互作用,有利于稳定膜结构。K1 和 K2 嗜热链球菌的存活率在 80%以上,K3 嗜热链球菌的存活率高达 92%。添加 K1、K2 和 K3 复合抗冻剂后蛋白质表面疏水性显著降低($P<0.05$),蛋白质溶解度显著升高($P<0.05$)。K1 和 K2 的 α -螺旋和 β -折叠含量显著下降($P<0.05$),K2 和 K3 的 r 值显著降低($P<0.05$)。结论:理论模型 K3 是具有高抗冻活性,可抑制蛋白质聚集和维持蛋白质结构稳定的一种良好的水产品复合抗冻剂。本研究为复合抗冻剂的开发提供新思路,为后续开发鲷鱼预制菜冷冻产品提供了理论参考。

关键词 抗冻粗肽;单纯形格子法;抗冻性;复合抗冻剂;肌原纤维蛋白

文章编号 1009-7848(2024)04-0199-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.04.019

添加抗冻剂是控制蛋白冷冻变性的主要方法之一,目前抗冻效果良好的商业抗冻剂主要有蔗糖、多聚磷酸盐等,然而存在健康风险,如:甜度大,不适合糖尿病人食用,还会导致肥胖、龋齿等^[1]。近年来,有研究发现从鱼鳞中提取的胶原蛋白肽,也称为抗冻肽,在抑制冰晶生长和重结晶方面具有良好效果^[2],可以降低冰水界面的稳定性,抑制水分子的聚集,且当抗冻肽被吸附至冰表面时,其会与冰晶表面结合,阻止冰晶在冰-水界面的位移和与水分子的结合,从而降低溶液的冰点

并抑制冰晶的生长^[3],是一种良好的冰晶调节剂。如:鲢鱼鳞抗冻肽可抑制冰晶生长,有效延缓肌原纤维蛋白(Myofibrillar protein,MP)变性和聚集,2%或4%的抗冻肽可达到与市售抗冻剂(8%蔗糖和山梨糖醇)相似的效果^[2]。罗非鱼鳞抗冻肽可激活 ATP 酶的活性,调节细胞内 Ca^{2+} 浓度,其冷冻嗜热链球菌的存活率可达到 83.76%,有助于提高细胞的耐寒性^[4]。罗非鱼鳞抗冻肽可以改善鲫鱼鱼片的感官品质,延长保质期至 9 d^[5]。

海藻糖是由 2 个通过半缩醛羟基缩合的葡萄糖分子组成,通过 1,1-糖苷键连接,是一种有效的蛋白质和细胞膜稳定剂,能够增强细胞对高温和冷冻等应激环境的抵抗力^[6]。其作为抗冻剂在水产肉制品方面的研究更为普遍,如:6%海藻糖可显著抑制草鱼鱼糜 MP Ca^{2+} -ATP 酶活性的下降,延缓表面疏水性的增加,以延缓 MP 的冷冻变性^[7]。随着海藻糖质量分数(2%~10%)的增加,冷冻牛肉 MP 的溶解度损失减小,热转变温度升高,保护牛肉 MP 在冷冻期间的稳定性越强^[8]。褐藻寡糖(Alginate oligosaccharide,AOS)是褐藻胶的寡聚物,分子质量低,水溶性强,稳定性高,安全无毒,具有良好的抗氧化性^[9]。有研究表明用 8 g/L

收稿日期:2023-08-10

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31701630);辽宁省教育厅高等学校基本科研目面上项目(LJKZ0715);江苏省高职院校教师专业带头人高端研修项目(2023GRFX061);江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人项目;苏州市乡村振兴软科学重点课题(SN-XCZX-2023-04);2022 年青年教师科研能力提升计划(BS[2022]18);2023 年江苏省职业院校学生创新创业培育计划项目

第一作者:逯晓燕,女,硕士生

通信作者:丛海花 E-mail: hhcong@szai.edu.cn
赵勇 E-mail: 44677213@qq.com

AOS处理虾,可使货架期至少延长2 d,并具有良好的品质^[10]。使用海藻糖或褐藻寡糖均可防止凡纳滨对虾水分含量和活性的降低,保持其品质,具有良好的冷冻保护作用^[11]。也有研究表明复合抗冻剂的抗冻效果高于单一组分的抗冻剂。如:壳寡糖与茶多酚复配对冷藏牛肉进行保鲜,其作用优于单独壳寡糖处理,可延长货架期至25 d^[12],然而,目前还鲜有这类复合抗冻剂在水产品冷冻保鲜的研究。

单纯形格子设计是混料设计中的一个方案,其计算简单、准确,实验点分布均匀,适用于食品工业的配料中^[13]。本研究以鲫鱼鱼鳞为原料,用胰蛋白酶酶解法获得抗冻粗肽,并以抗冻粗肽、海藻糖和褐藻寡糖为因素,运用{3,3}单纯形格子法进行试验设计。以冷冻24 h后嗜热链球菌的存活率为抗冻活性筛选指标,获得复合抗冻剂理论模型配方。使用鲫鱼(*Ictalurus punctatus*)肌原纤维蛋白进行28 d冷冻,研究MP结构变化。以期为天然绿色安全的复合抗冻剂提供新思路,为后续开发鲫鱼预制菜的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鱼鳞选用新鲜鲫鱼鳞,鲫鱼购买于苏州上海华联超市。新鲜鲫鱼鳞购买于叮咚买菜平台,所选购鱼均为同一批次,同一生长周期。褐藻寡糖由中国科学院过程工程研究所中科荣耀(苏州)生物科技有限公司提供。海藻糖购买于河南华瑞生物科技有限公司。

盐酸、氯化钠,天津市富宇精细化工有限公司;NaOH,无锡市展望化工试剂有限公司;酒石酸钾钠,天津市瑞金特化学品有限公司;M17培养基(牛肉浸粉、大豆蛋白胨、酵母浸粉,南京茂捷生物科技有限公司;胰蛋白酶、 β -甘油磷酸钠、乳糖,上

海麦克林生化科技有限公司;抗坏血酸、硫酸镁,国药集团化学试剂有限公司;胰蛋白酶、蛋白胨,北京鸿润宝顺科技有限公司;丙三醇,天津市科密欧化学试剂有限公司;脱脂乳,北京诺博莱德科技有限公司;嗜热链球菌,西安米先尔生物科技有限公司。

1.2 仪器设备

FL-2可调式封闭电炉,北京市永光明医疗仪器有限公司;722N可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;ZWY-240恒温培养振荡器,上海智诚分析仪器制造有限公司;TGL-16M低温高速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;YXQ-LS-SOA立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;BD/BC-203KMD(E)转换型冷冻冷藏箱,合肥美的电冰箱有限公司;LGJ-10D真空冷冻干燥机,北京四环起航科技有限公司;BIOMATE 3S紫外分光光度计,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;ALPHA II傅立叶变换红外光谱仪,德国BRUKER公司;Leica TCS SP8激光扫描共聚焦显微镜(Confocal laser scanning microscope, CLSM),德国徕卡显微系统贸易有限公司。

1.3 鲫鱼鱼鳞抗冻粗肽的提取及表征

1.3.1 提取方法 根据顾晨涛等^[14]和 Xu 等^[2]的方法,略作修改。提取工艺如图1所示,将新鲜的鲫鱼鱼鳞清洗3次(水和生理盐水)以去除杂质,晾干水分,称重。加入料液比为1:10(g/mL)的0.1 mol/L NaOH浸泡搅拌3 h去除杂蛋白,隔1.5 h换一次液,用水清洗至中性,再加入料液比为1:15(g/mL)的0.5 mol/L HCl浸泡搅拌1 h脱钙,用清水清洗至中性,晾干备用。取一定质量的鲫鱼鱼鳞加入料液比为1:5(g/mL)的水,置于100 ℃的水浴锅中搅拌1 h,以溶出胶原蛋白,放置于室温。将胶原蛋白溶液调至pH 8,加入一定质量的胰蛋白酶(质量比10:1),在38 ℃下酶解3 h,置于沸水中

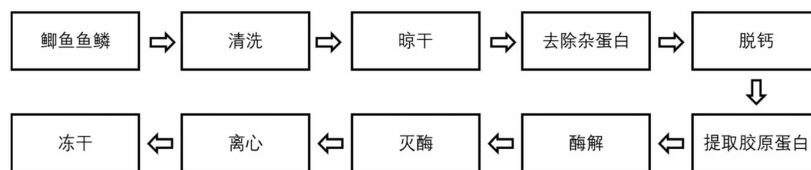


图1 鲫鱼鱼鳞抗冻粗肽的提取工艺

Fig.1 Extraction process of crude antifreeze peptide from crucian carp scales

灭酶 10 min。在 10 000 r/min, 4 ℃下离心 10 min, 所得上清液即为粗肽溶液, 后进行冷冻干燥, 即得鲫鱼鱼鳞抗冻粗肽。

1.3.2 粗肽的抗冻活性 抗冻活性的测定参考 Xu 等^[15]的方法, 略作修改。利用嗜热链球菌在冷冻条件下的存活率作为测定指标。将 10%嗜热链球菌在 20 mL M17 液体培养基 (5%, V/V) 中 37 ℃, 180 r/min 活化 18 h。取 50 μL 隔夜活化的嗜热链球菌接种于 4 mL M17 液体培养基中 37 ℃, 180 r/min 培养 4 h, 然后以 5 000 r/min 离心 5 min, 并用无菌水清洗 1 次, 用无菌生理盐水稀释至菌落悬液浊度 OD₆₀₀ 值为 1.2 左右。将 540 μL 的 3% 的鱼鳞粗肽样品与 60 μL 的菌落稀释液混合。用无菌生理盐水代替样品作为空白, 以 1 mg/mL 的脱脂乳和 20%甘油作为阳性对照。各取 60 μL 样品加入 4 mL M17 液体培养基中, 在 37 ℃, 180 r/min 培养 7 h, 在波长 600 nm 下测吸光度, 另取一份样品在 -20 ℃下冷冻 24 h, 各取 60 μL 样品加入 4 mL M17 液体培养基中, 于 37 ℃, 180 r/min 培养 7 h, 在波长 600 nm 下测吸光度。嗜热链球菌存活率按公式(1)计算:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{A}{B} \times 100 \quad (1)$$

式中, A——冷冻后 OD₆₀₀ 值; B——冷冻前 OD₆₀₀ 值。

1.3.3 傅里叶变换红外光谱 参考 Xu 等^[16]和张晓岷等^[17]的方法。以大豆卵磷脂为细胞膜模型, 制备质量比为 1:1、1:3 和 1:5 的大豆卵磷脂抗冻粗肽混合物, 以大豆卵磷脂为对照, 进行红外光谱测定。设置参数: 波长 4 000~500 cm⁻¹、分辨率 4 cm⁻¹、扫描次数: 24 次。

1.4 单纯形格子试验设计

试验设计参考罗玲泉等^[13]的方法, 稍作改动。鱼鳞抗冻粗肽、海藻糖、褐藻寡糖 3 种抗冻成分按 {3,3} 单纯形格子试验设计方案, 其中, A₁ 为鱼鳞抗冻粗肽, A₂ 为海藻糖, A₃ 为褐藻寡糖。其适用范围: 0 ≤ a₁ ≤ 3, 0 ≤ a₂ ≤ 3, 0 ≤ a₃ ≤ 3 (a₁, a₂, a₃ 各代表鱼鳞抗冻粗肽、海藻糖、褐藻寡糖), Z_i = 下限 + (上限 - 下限) × A_i, 结果见表 1。

物理相容性的测定: 根据施鸿谋等^[18]的方法, 使用分光光度计测定 10 组溶液(表 1)在波长 600

表 1 {3,3}单纯形格子试验设计

试验号	A ₁	a ₁ /%	A ₂	a ₂ /%	A ₃	a ₃ /%
1	1	3	0	0	0	0
2	0	0	1	3	0	0
3	0	0	0	0	1	3
4	1/3	1	2/3	2	0	0
5	2/3	2	1/3	1	0	0
6	1/3	1	0	0	2/3	2
7	2/3	2	0	0	1/3	1
8	0	0	1/3	1	2/3	2
9	0	0	2/3	2	1/3	1
10	1/3	1	1/3	1	1/3	1

nm 处的透光率, 来表示原料的物理相容性。以空白比色皿为空白对照。

1.5 鲷鱼肌原纤维蛋白的冷冻验证试验

1.5.1 鲷鱼肌原纤维蛋白的提取 根据 Liu 等^[19]的提取方法, 略作修改。将新鲜鲷鱼清洗干净, 取背部肌肉, 与 4 ℃预冷的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (1:5, m/V) 混合, 以 8 000 r/min 的速度均质 2 min, 后于 4 ℃, 5 000 r/min 离心 20 min。弃掉上清液, 沉淀重复上述操作 1 次。沉淀加入 4 ℃预冷的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 0.6 mol/L NaCl) (1:5, m/V) 中, 在相同的条件下均质, 后于 4 ℃, 5 000 r/min 离心 20 min。收集上清液, 即为肌原纤维蛋白提取液。通过双缩脲法测定 MP 蛋白浓度, 并调整至适当的质量浓度 (5 mg/mL) 以测定蛋白。

1.5.2 冷冻试验方案 参考丛海花等^[20]的方法, 略作修改。在 5 mg/mL 的 MP 溶液中加入 K1 (2% 抗冻粗肽和 1% 海藻糖)、K2 (1% 抗冻粗肽和 2% 褐藻寡糖) 和 K3 (2.2% 抗冻粗肽、2% 海藻糖和 0.3% 褐藻寡糖) 复合抗冻剂, 以不加抗冻剂的 MP 溶液为对照, 在 -20 ℃下冷冻 28 d。后于 4 ℃下解冻过夜, 以测定指标。

1.5.3 溶解度 溶解度的测定参考 Tan 等^[21]的方法, 将 2.0 mL MP 样品在 10 000 ×g 下离心 10 min, 使用双缩脲法测定上清液中的蛋白质含量。蛋白质溶解度 (%) 表示为离心后上清液中蛋白质浓度与离心前蛋白质浓度的百分比。

1.5.4 表面疏水性 表面疏水性的测定参考常娅

妮等^[22]的方法,取1 mL MP溶液加入200 μ L 1 mg/mL 溴酚蓝,在室温下静置10 min,后于4 $^{\circ}$ C, 6 000 \times g离心10 min。将上清液稀释10倍后,于波长595 nm处测定吸光度。结果按式(2)计算:

$$\text{表面疏水性} = \frac{200 \times (A_0 - A_1)}{A_0} \quad (2)$$

式中, A_0 ——空白吸光度; A_1 ——样品吸光度。

1.5.5 傅里叶变换红外光谱 参考蓝蔚青等^[23]的方法,略作修改。取一定量的冻干样品,置于45 $^{\circ}$ C烘箱中4 h后,进行红外光谱的测定。设置参数:扫描范围:500~4 000 cm^{-1} ,分辨率:4 cm^{-1} ,扫描次数:24次。用Peakfit软件对酰胺I波段(1 600~1 700 cm^{-1})进行拟合,计算二级结构含量。

1.5.6 紫外吸收光谱 紫外吸收光谱的测定参考Qiu等^[24]的方法,略作修改。取1 mg/mL MP溶液,设置波长扫描范围为:190~600 nm。并使用Origin软件进行二阶求导。

1.5.7 激光扫描共聚焦显微镜 参考Tan等^[25]的方法,略作修改。用0.1 mg/mL 异硫氰酸荧光素的二甲基亚砷溶液对蛋白质(20:1, V/V)进行染色。取10 μ L样品置于载玻片上,盖上盖玻片。激发波长480 nm,记录了500~700 nm的荧光强度。采用10 \times 水浸物镜对蛋白质微观结构进行成像。

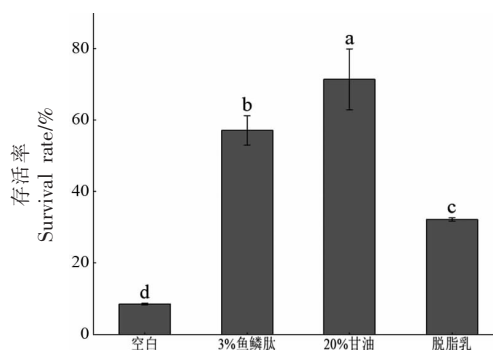
1.6 数据处理和统计学分析

所有指标数据均做3次平行试验,结果用“平均值 \pm 标准差”表示。用Origin 2021软件进行数据绘图。采用SPSS 22.0软件进行单因素方差分析,用Duncan's法分析数据间差异显著性, $P < 0.05$ 表示差异显著。使用Excel软件进行回归方程以及规划求解计算。

2 结果与分析

2.1 鱼鳞抗冻粗肽的抗冻活性和傅里叶变换红外光谱

2.1.1 鱼鳞抗冻粗肽的抗冻活性 通过胰蛋白酶水解制备了鲫鱼鱼鳞抗冻粗肽。空白组(无菌生理盐水)、鱼鳞抗冻粗肽和2个阳性对照组(20%甘油和1 mg/mL 脱脂乳)对嗜热链球菌的抗冻活性如图2所示。与空白组(8.58%)相比,其它3组的菌存活率显著升高($P < 0.05$),20%甘油的菌存活率



注:不同小写字母代表不同组别间的显著性差异, $P < 0.05$,下同。

图2 鱼鳞抗冻粗肽冷冻后嗜热链球菌的存活率

Fig.2 The survival rate of *Streptococcus thermophilus* after freezing of fish scale crude antifreeze peptide

最高,可达到71.36%,其原因可能是甘油在冷冻过程中可以优先与水分子结合,使溶液黏性增加,影响冰晶的形成,从而使细菌细胞免受冰晶损伤,提高菌种存活率^[26]。鱼鳞抗冻粗肽的菌存活率(57.11%)显著高于1 mg/mL 脱脂乳(32.20%)($P < 0.05$),说明鱼鳞抗冻粗肽可以提高嗜热链球菌在低温环境下的存活率,可能作为一种抗冻剂,保护益生菌。这与Zeng等^[27]的研究相似,其通过胰蛋白酶水解罗非鱼鳞胶原蛋白制备的抗冻肽可以缓解嗜热链球菌在冷冻贮存过程中代谢活性的降低。

2.1.2 傅里叶变换红外光谱 以大豆卵磷脂作为模型体系,图3显示了大豆卵磷脂与抗冻粗肽的相互作用。如图所示,1 750~1 650 cm^{-1} 附近的峰为C=O键,1 260~1 050 cm^{-1} 之间为磷脂中的对称或不对称P=O键;3 410,2 927,1 243,1 064 cm^{-1} 附近的吸收峰分别是大豆卵磷脂中的亲水基与水分子形成的氢键、饱和碳C-H伸缩振动带、C-O和C-O-C振动带和P=O伸缩振动带^[17,28]。随着抗冻粗肽的加入,大豆卵磷脂的几个特征吸收峰逐渐减小,吸收强度减弱,这与Xu等^[16]的研究结果一致,此外,这些特征峰出现小小的偏移,说明抗冻粗肽的存在改变了光谱,也显示出了抗冻粗肽与细胞膜的相互作用,这可能与磷脂亲水头部和水之间形成氢键有关,这有助于保持生物膜结构及其相应功能的完整性^[29]。有研究使用同样的方法探究了海藻糖与卵磷脂的相互作用,发现海藻

糖抑制磷脂相转变的机制,可能是海藻糖的羟基基团和磷脂的头部基团形成的氢键,替代了原有的脂和水之间的氢键,从而影响生物膜的结构^[30]。因此,本研究也认为抗冻粗肽与海藻糖对磷脂相转变的可能作用机制相似,抗冻粗肽的-OH和磷脂头部基团之间的氢键可能会阻止磷脂头部相互靠近,降低磷脂相变温度,从而稳定膜结构和功能^[16,31]。

2.2 单纯形格子试验结果

2.2.1 复合抗冻剂的相容性 通过测定 OD_{600nm} 的透光率来表示复合抗冻剂的相容性。张锦中等^[32]的研究使用此法对普鲁兰多糖-卡拉胶软胶囊囊皮进行了物理相容性测定,认为透光率越大,相容性越好。如图 4 所示,在单一溶液中,组别 2(3%海藻糖)的透光率最高,为 99.70%,其次是组别 3(3%褐藻寡糖,85.45%)和组别 1(3%抗冻粗肽,78.60%),这可能是由于试验原料(褐藻寡糖和抗冻粗肽本身的颜色)影响整体溶液的吸光值所致。在复合溶液中,组别 4(1%抗冻粗肽和 2%海藻糖)和组别 9(2%海藻糖和 1%褐藻寡糖)的透光率显著高于其它组($P<0.05$),均可达到 94%以上,表明抗冻粗肽和海藻糖或褐藻寡糖的相容性较好。

2.2.2 复合抗冻剂的抗冻活性 表 2 显示了 10 组复合抗冻剂的嗜热链球菌存活率,结果表明,单一溶液中,组别 3(3%褐藻寡糖)的相对存活率显著高于组别 1(3%抗冻粗肽)和组别 2(3%海藻糖)($P<0.05$),说明褐藻寡糖可以在低温环境下保护嗜热链球菌免受损伤,这可能是由于小分子的糖可以与水分子结合,产生水合作用,影响冰晶的生成。复合溶液中,组别 4 和 7 的相对存活率可达到 80%以上,且显著高于单一分子抗冻剂($P<0.05$),这与 Wang 等^[33]的研究结果相似,复合抗冻剂对菌的保护能力优于单一分子抗冻剂,本研究结果表明,抗冻粗肽和海藻糖复合的抗冻剂均可以提高低温环境下嗜热链球菌的存活率。

采用 Excel 软件对表 2 的数据进行回归方程的计算,如表 3 所示,得到回归方程: $y=59.271-0.192x_2+1.718x_3+10.583x_1x_2+4.866x_1x_3-13.556x_2x_3-0.429x_1x_2x_3$,进一步利用规划求解工具预测最优配方,得到理论模型配方: $x_1=2.2\%$, $x_2=2\%$, $x_3=0.3\%$ 时, $y=100\%$ 。因此,选择组别 4(K1)、7(K2)和理论

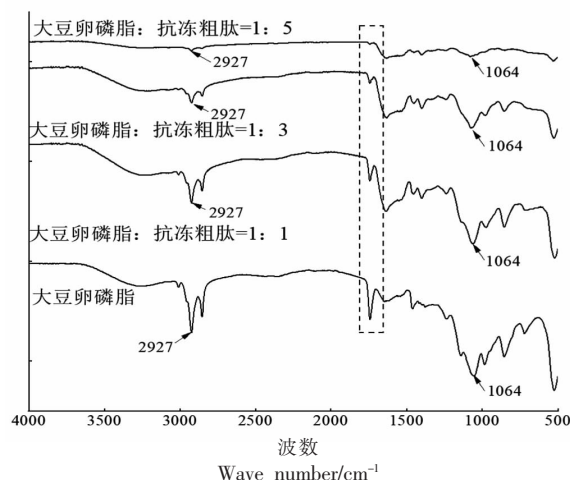
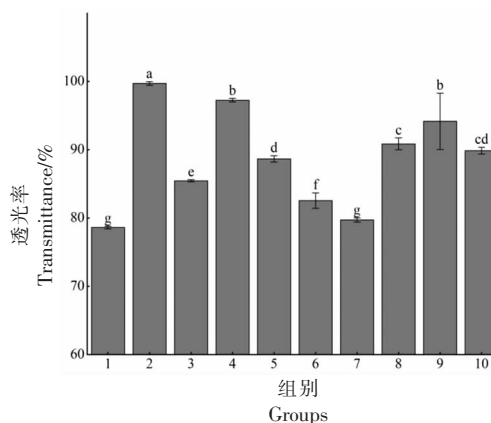


图 3 大豆卵磷脂及大豆卵磷脂抗冻粗肽的傅里叶变换红外光谱图

Fig.3 Fourier transform infrared spectroscopy of soybean lecithin and soybean lecithin crude antifreeze peptide



注:组别 1~3 为单一溶液,组别 4~10 为复合溶液;组别 1:3%鱼鳞抗冻粗肽,组别 2:3%海藻糖,组别 3:3%褐藻寡糖,组别 4:1%抗冻粗肽+2%海藻糖,组别 5:2%抗冻粗肽+1%海藻糖,组别 6:1%抗冻粗肽+2%褐藻寡糖,组别 7:2%抗冻粗肽+1%褐藻寡糖,组别 8:1%海藻糖+2%褐藻寡糖,组别 9:2%海藻糖+1%褐藻寡糖,组别 10:1%抗冻粗肽+1%海藻糖+1%褐藻寡糖。

图 4 单一及复合抗冻剂的相容性

Fig.4 Compatibility of single and composite antifreeze agents

模型配方(K3)进行验证试验。结果如图 5 所示, K3(理论模型配方)的嗜热链球菌存活率可达到 92%左右,与预测值相差 8%,且显著高于 K1 和 K2($P<0.05$),且如表 4 所示, $R^2>0.800$,说明单纯格子形试验设计合理,可利用此回归方程进行模

拟预测,结果可信度高,理论模型配方有利于在低温环境下保护嗜热链球菌免受损伤,提高冷冻后的存活率。

表2 试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results

试验号	x_1 (抗冻粗肽)/%	x_2 (海藻糖)/%	x_3 (褐藻寡糖)/%	y (存活率)/%
1	3	0	0	57.11 ± 4.14^d
2	0	3	0	56.77 ± 8.69^d
3	0	0	3	68.51 ± 5.48^{bc}
4	1	2	0	86.48 ± 1.25^a
5	2	1	0	73.82 ± 3.32^b
6	1	0	2	59.53 ± 2.68^{cd}
7	2	0	1	83.63 ± 2.91^a
8	0	1	2	36.05 ± 5.19^e
9	0	2	1	32.84 ± 7.79^e
10	1	1	1	62.26 ± 5.88^{cd}

表3 回归模拟系数

Table 3 Regression simulation coefficient

	系数	标准误差	t-Stat	P-value	下限(95.0%)	上限(95.0%)
截距	59.271	11.543	5.135	0.014	22.537	96.005
x_1	0	0	65535	-	0	0
x_2	-0.192	5.296	-0.036	-	-17.047	16.663
x_3	1.718	5.296	0.324	0.767	-15.137	18.572
x_1x_2	10.583	5.995	1.765	0.176	-8.495	29.662
x_1x_3	4.866	5.995	0.812	0.476	-14.212	23.945
x_2x_3	-13.557	5.996	-2.261	0.109	-32.636	5.521
$x_1x_2x_3$	-0.429	14.650	-0.029	0.978	-47.066	46.208

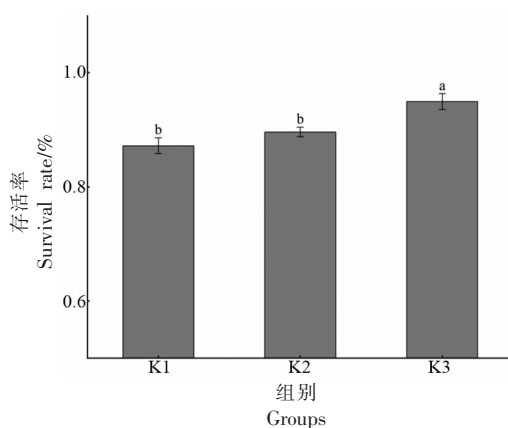
表4 回归模拟关键参数

Table 4 Key parameters for regression simulation

回归统计	数值
r	0.919
R^2	0.844
标准误差	12.135
观测值	10

2.3 鲷鱼肌原纤维蛋白的冷冻验证结果

2.3.1 溶解度 溶解度是蛋白质重要的功能性质之一,蛋白质的变性和聚集会影响其溶解度的大小^[34]。图6a显示了冷冻后MP的溶解度。由图可知,与Fresh组相比,其它4组的溶解度均显著下降($P < 0.05$)。这种变化可能是冷冻过程中冰晶的形成和生长,导致蛋白质变性,也可能是冷冻



注:K1:1%抗冻粗肽+2%海藻糖(组别4);K2:2%抗冻粗肽+1%褐藻寡糖(组别7);K3:2.2%抗冻粗肽+2%海藻糖+0.3%褐藻寡糖(理论模型)。

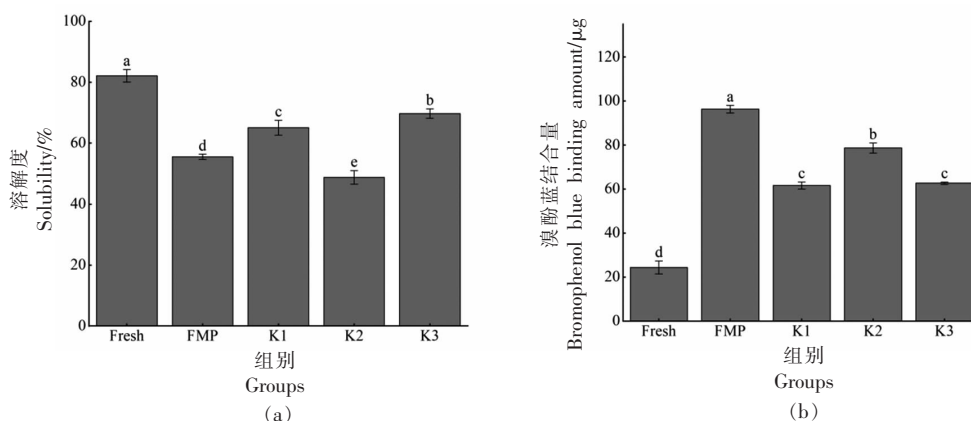
图5 验证试验结果

Fig.5 Verify experimental results

过程中,蛋白质与水分子或小分子物质发生相互作用,影响蛋白质构象,导致 MP 在冷冻过程中不溶^[35]。与 FMP 组相比,K1 和 K3 的 MP 溶解度均显著上升($P<0.05$),K2 则相反,说明 K1 和 K3 抗冻剂均可延缓蛋白质聚集,延缓溶解度降低,且 K3 的溶解度最接近新鲜样品。这一方面可能是复合抗冻剂中的抗冻粗肽可以缓解细胞内结冰,减少聚集体的形成^[35],另一方面可能是小分子糖类物质可以延缓溶质迁移,降低未冻液体中的离子强度,从而抑制蛋白质的不可逆聚集,使得溶解度增加^[36]。这说明添加复合抗冻剂对蛋白的冷冻作用较好,可以延缓 MP 的聚集。

2.3.2 表面疏水性 表面疏水性是评价蛋白质变

性的一个重要指标,可以反映蛋白质中疏水氨基酸残基含量^[37]。图 6b 显示了经过 3 种复合抗冻剂处理冷冻后 MP 的表面疏水性。如图所示,与 Fresh 组相比,其它 4 组的 MP 表面疏水性均显著升高($P<0.05$)。说明冷冻处理对细胞的损伤较大,可使疏水基团暴露,导致 MP 的聚集^[2]。与 FMP 组相比,复合抗冻剂处理组的表面疏水性均显著下降($P<0.05$),其中 K3 的表面疏水性最低,说明小分子糖类物质和与肽共同作用可抑制疏水基团的暴露,这可能是小分子物质与 MP 之间亲水作用增强所致^[38]。总体来说,K3 复合抗冻剂延缓疏水性残基的暴露,延缓蛋白质聚集的效果更为显著。



注: Fresh 表示冷冻前的新鲜 MP 样品; FMP 表示冷冻 MP 样品; K1 表示添加 K1 复合抗冻剂的冷冻 MP 样品; K2 表示添加 K2 复合抗冻剂的冷冻 MP 样品; K3 表示添加 K3 复合抗冻剂的冷冻 MP 样品,下同。

图 6 复合抗冻剂冷冻的 MP 的溶解度(a)和表面疏水性(b)

Fig.6 Solubility (a) and surface hydrophobicity (b) of composite antifreeze to frozen MP

2.3.3 傅里叶变换红外光谱 红外光谱反映了分子间和分子内官能团的相互作用,不同抗冻剂对冷冻鲷鱼 MP 的傅里叶变换红外光谱如图 7 所示。结果表明,1540 cm^{-1} 附近的特征吸收峰是酰胺 II 带 C-N 的伸缩和 C-H 的弯曲^[39],对比 Fresh 组的红外谱图,经冷冻处理后的特征峰峰强明显减弱;添加抗冻剂后,1180~953 cm^{-1} 区域的透光率变大,可能是 MP 与寡糖和肽结合形成了羟基和碳氧键,使得该波段吸收增强^[40]。

图 7b 显示了 3 种抗冻剂对冷冻鲷鱼 MP 的二级结构含量。与 Fresh 组相比,经过冷冻后,无规卷曲含量变化波动较小,其它 3 种结构均呈现不同程度的下降或升高,且所有组别的 α -螺旋和

β -折叠含量之和均在 60%~70%之间。与 FMP 组相比,添加 K1 和 K2 抗冻剂后,其 α -螺旋含量降低, β -折叠含量显著增加 ($P<0.05$);K3 的 α -螺旋含量和 β -折叠含量与 FMP 组和 Fresh 组并无显著差异, β -转角含量显著降低 ($P<0.05$),说明 K3 抗冻剂可保护 α -螺旋不被转化,这与汪兰等^[41]的研究相似,其推测小分子的糖类物质可促进 α -螺旋的形成。这也说明本研究将 3 种小分子物质混合,可更好地促进 α -螺旋结构的形成和抑制 β -转角的形成,从而维持二级结构的稳定性。

2.3.4 紫外吸收光谱 紫外吸收光谱是通过检测发色基团的变化来评估蛋白质的三级结构。图 7c 和图 7d 分别显示了 3 种抗冻剂对冷冻鲷鱼 MP

的紫外吸收光谱图和紫外二阶导数图。结果表明,经过冷冻后的 MP 在波长 280 nm 处的吸光度均出现不同程度的升高或降低,说明三级结构发生了变化。添加复合抗冻剂 K2 和 K3 后,250~270 nm 处的最大吸收波长发生红移,这与汪兰等^[41]的研究结果一致,这可能是肌原纤维蛋白中的酪氨酸暴露,造成紫外吸收和微环境的改变。

为了进一步了解构象的变化,对紫外吸收光谱进行二阶导数处理,如图 7d 所示,经冷冻后,FMP 组在波长 284 nm 处的负峰红移,3 组复合抗冻剂的负峰蓝移,这是由于添加复合抗冻剂后酪

氨酸向内包埋,移动到更加疏水的环境中所致;经过冷冻后,4 个处理组在波长 296 nm 附近的正峰均红移,这是由于冷冻后,造成色氨酸残基的暴露,使得微环境的极性增加,向亲水环境移动^[42]。此外,如图 7d 中的 r 值所示,其数值越大,说明酪氨酸的暴露量越大^[40],与 Fresh 组相比,除 K1 外,其余 3 组的 r 值均下降,与 FMP 组相比,K2 和 K3 的 r 值显著降低 ($P < 0.05$),说明复合抗冻剂 K2 和 K3 均可抑制酪氨酸暴露。综上所述,这 3 种复合抗冻剂均可抑制紫外吸光度的下降,复合抗冻剂 K2 和 K3 的效果更显著,显示出更高的稳定性。

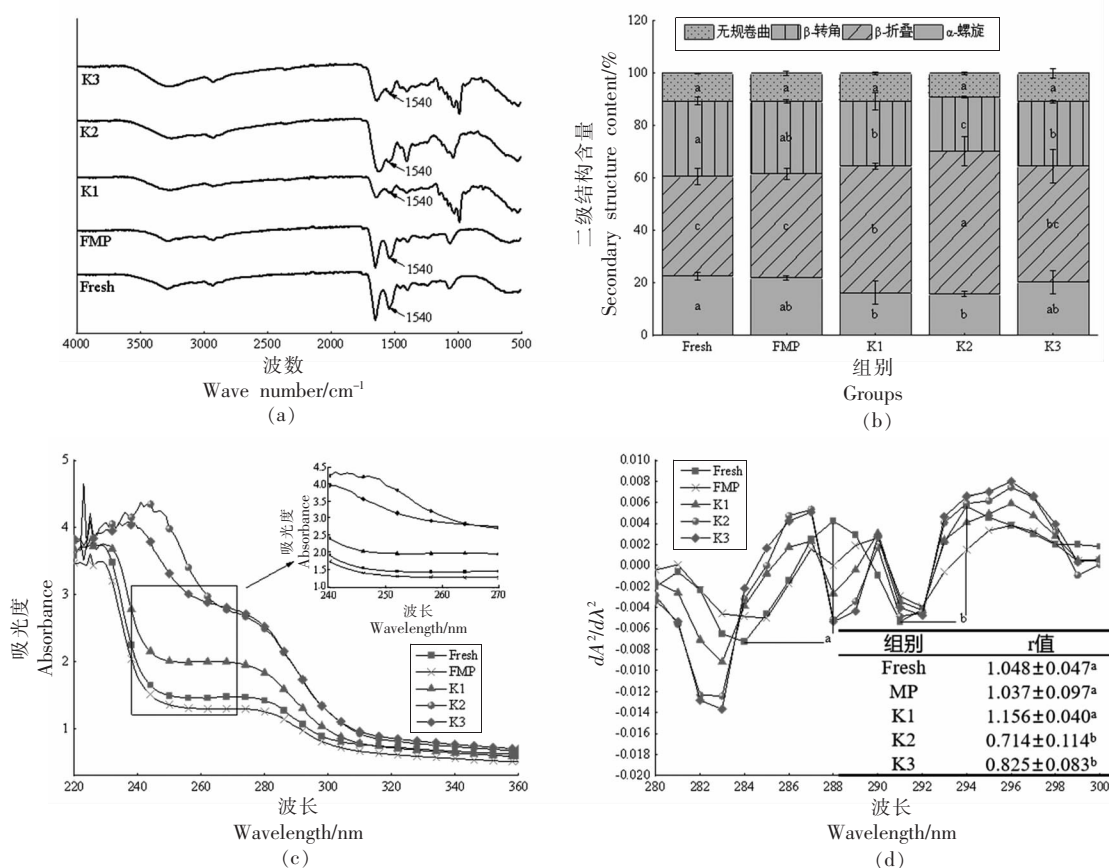
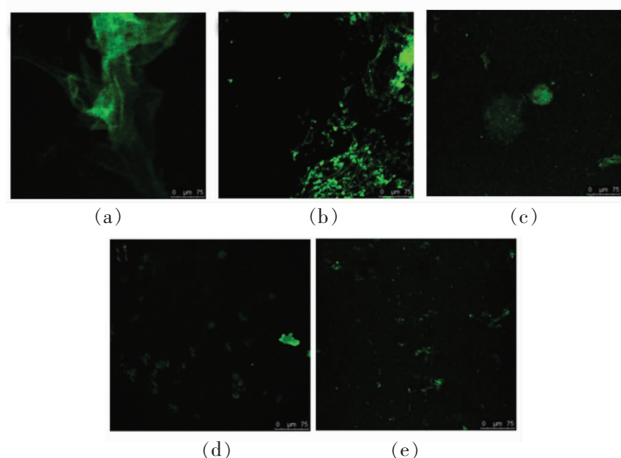


图 7 复合抗冻剂冷冻的 MP 傅里叶变换红外光谱(a)、二级结构含量(b)、紫外吸收光谱图(c)、紫外二阶导数图(d)

Fig.7 Fourier transform infrared spectroscopy (a), secondary structure content (b), UV absorption spectroscopy (c), UV second derivative (d) of composite antifreeze frozen MP

2.3.5 激光扫描共聚焦显微镜 图 8 显示了 3 种抗冻剂对冷冻 MP 的激光共聚焦显微镜图,其中明亮区域为蛋白质。如图所示,Fresh 组的可见聚集较少,分布较为均匀(图 8a)。经过冷冻后,蛋白质上从均匀分布状态变为较大的不规则絮凝体,

这可能是在冷冻过程中蛋白质结构被破坏,导致蛋白质发生聚集,形成较大的聚集体^[43]。此外,添加 3 种抗冻剂后,蛋白质的聚集行为明显得到改善,其中 K3 的作用更明显(图 8e),聚集体明显减少,这与溶解度和表面疏水性的结果一致,表明



注:a. 新鲜样品;b. 冷冻 MP 样品;c. 添加复合抗冻剂 K1 的冷冻 MP 样品;d. 添加复合抗冻剂 K2 的冷冻 MP 样品;e. 添加复合抗冻剂 K3 的冷冻 MP 样品;图片比例尺为 1:15(μm)。

图 8 复合抗冻剂冷冻的 MP 激光扫描共聚焦显微镜图
Fig.8 MP confocal laser scanning microscope image
of composite antifreeze freezing

K3 抗冻剂可抑制冷冻环境中蛋白质聚集体的形成。

3 结论

本文通过胰蛋白酶酶解制备了抗冻粗肽,且使用单纯形格子试验筛选出复合抗冻剂配方并进行鲫鱼肌原纤维蛋白冷冻试验。结果表明:抗冻粗肽可能是通过与细胞膜的相互作用来提高冷冻后嗜热链球菌的存活率(57.11%)。海藻糖、褐藻寡糖和抗冻粗肽的相容性均较好;复合抗冻剂 K1 和 K2 的嗜热链球菌存活率可达 80%以上,理论模型配方 K3 的嗜热链球菌存活率为 92%。冷冻鲫鱼 MP 试验表明,复合抗冻剂可显著提高 MP 的溶解度,抑制疏水基团暴露,从而抑制蛋白质聚集,CLSM 图像也进一步说明聚集体的减少;复合抗冻剂 K1 和 K2 的 α -螺旋和 β -折叠结构显著降低,不利于维持二级结构的稳定;复合抗冻剂 K2 和 K3 的 r 值显著降低,可抑制酪氨酸暴露,维持三级结构的稳定。综上所述,理论模型 K3 是具有高抗冻活性、可抑制蛋白质聚集和维持蛋白质结构稳定的一种良好的水产品复合抗冻剂。这为制备天然、绿色、安全的复合抗冻剂提供了一种新方法,也为开展品质稳定保持技术应用推广提供数据支持。在下一步的研究中,将对鲫鱼鱼鳞抗冻粗

肽的结构、组成成分及抗冻机理进行解析;并阐释复合抗冻剂的抗氧化性和冷冻保护机制,多角度验证复合抗冻剂对冷冻水产品品质的提质增效作用,解决制约水产预制菜产品品质降低的问题,增加副产物的高值化利用。

参 考 文 献

- [1] 朱士臣, 俞杰航, 金燕, 等. 鱼鳞明胶对鱼糜肌原纤维蛋白的冷冻保护作用及其机制[J]. 食品科学, 2022, 43(24): 16-24.
ZHU S C, YU J H, JIN Y, et al. Cryoprotective effect and mechanism of fish scale gelatin on surimi myofibrillar proteins [J]. Food Science, 2022, 43 (24): 16-24.
- [2] XU C, LI X Z, YANG F J, et al. Effects and mechanism of antifreeze peptides from silver carp scales on the freeze-thaw stability of frozen surimi [J]. Food Chemistry, 2022, 396: 133717.
- [3] XU C, SHI X D, CAI X X, et al. Ice-binding proteins: A remarkable ice crystal regulator for frozen foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 61(20): 3436-3449.
- [4] XU C, LI L, YANG F J, et al. Effects of gelatin-based antifreeze peptides on cell viability and oxidant stress of *Streptococcus thermophilus* during cold stage[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 136: 111056.
- [5] 樊世芳, 卢立新, 游柳青, 等. 鱼鳞明胶及蛋白肽涂膜对鲫鱼保鲜效果的影响[J]. 包装与食品机械, 2016, 34(4): 5-9, 31.
FAN S F, LU L X, YOU L Q, et al. The effects of coated gelatin and protein peptide from scales on fresh-keeping of crucian carp [J]. Packaging and Food Machinery, 2016, 34(4): 5-9, 31.
- [6] CHEN J S, YING X G, DENG S G, et al. Trehalose and alginate oligosaccharides enhance the stability of myofibrillar proteins in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) muscle during frozen storage [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, 46(4): e16469.
- [7] 邓泽新, 廖泉, 吴卫国. 海藻糖对草鱼鱼糜肌原纤维蛋白冷冻变性作用的影响[J]. 农产品加工(学刊), 2014(7): 13-15, 18.
DENG Z X, LIAO Q, WU W G. The effect of tre-

- halose on denaturation of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) surimi myofibrillar protein during frozen storage[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2014(7): 13–15, 18.
- [8] KOVAČEVIĆ D, MASTANJEVIĆ K. Cryoprotective effect of trehalose and maltose on washed and frozen stored beef meat[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2011, 29(1): 15–23.
- [9] 阿拉腾珠拉, 胡永飞. 褐藻寡糖的制备方法及其生物活性研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 104–118.
- A LA TENG Z L, HU Y F. Advances in the preparation of alginate oligosaccharides and its biological functions[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 104–118.
- [10] YAN F, ZHONG J F, CHEN J Y, et al. Application of alginate oligosaccharide produced by enzymatic hydrolysis in the preservation of prawns[J]. Food Bioscience, 2022, 49: 101897.
- [11] XIE C, ZHANG B, MA L K, et al. Cryoprotective effects of trehalose, alginate, and its oligosaccharide on quality of cooked - shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during frozen storage [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2016, 41(2): e12825.
- [12] 高晓冉, 刘程惠, 陈立国, 等. 壳寡糖与茶多酚复合保鲜剂对冷鲜牛肉的保鲜效果[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(11): 172–178.
- GAO X R, LIU C H, CHEN L G, et al. Preservative effects of chitosan oligosaccharide and tea polyphenol together on chilled beef [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(11): 172–178.
- [13] 罗玲泉, 刘成国, 熊郜, 等. 单纯形格子配料法复配凝固型酸乳增稠剂研究[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(8): 30–32.
- LUO L Q, LIU C G, XIONG H, et al. Research on mixed set-style yoghurt thickener by simplicity grid method[J]. China Dairy Industry, 2008, 36(8): 30–32.
- [14] 顾晨涛, 黄酒, 王雪燕, 等. 鲫鱼鱼鳞抗菌多肽的制备纯化及其抑菌活性[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 193–198.
- GU C T, HUANG S, WANG X Y, et al. Preparation, purification and antimicrobial activity of antimicrobial peptide from crucian carp scales[J]. Food Science, 2019, 40(22): 193–198.
- [15] XU C, WANG S Y. Cryoprotective effect of antifreeze glycopeptide analogues obtained by nonenzymatic glycation on *Streptococcus thermophilus* and its possible action mechanism [J]. Food Chemistry, 2019, 288: 239–247.
- [16] XU C, WU J H, LI L, et al. Cryoprotective activity and action mechanism of antifreeze peptides obtained from tilapia scales on *Streptococcus thermophilus* during cold stress[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(7): 1918–1926.
- [17] 张晓頔, 董焯, 张益奇, 等. 鱼糜副产物蛋白水解物的抗冻活性及对嗜热链球菌的抗冻效果及机制[J]. 食品科学, 2023, 44(7): 39–47.
- ZHANG X D, DONG Y, ZHANG Y Q, et al. Antifreeze activity of surimi by-product protein hydrolysate and its cryoprotective effect and mechanism on *Streptococcus thermophilus* [J]. Food Science, 2023, 44(7): 39–47.
- [18] 施鸿谋, 苏一帆, 范超春, 等. 响应曲面法优化植物复配胶软胶囊囊皮配方[J]. 广州化工, 2019, 47(22): 67–72.
- SHI H M, SU Y F, FAN C C, et al. Optimization of plant compound soft capsule formula by response surface methodology[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2019, 47(22): 67–72.
- [19] LIU C K, LI W X, ZHOU M Y, et al. Effect of oxidation modification induced by peroxy radicals on the physicochemical and gel characteristics of grass carp myofibrillar protein[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2021, 15(6): 5572–5583.
- [20] 丛海花, 耿文豪, 朱嘉雯, 等. 虾夷扇贝裙边多肽提高鲢鱼肌原纤维蛋白结构稳定性[J]. 肉类研究, 2022, 36(9): 13–19.
- CONG H H, GENG W H, ZHU J W, et al. Patinopecten yessoensis mantle polypeptides enhanced the structural stability of myofibrillar proteins from silver carp[J]. Meat Research, 2022, 36(9): 13–19.
- [21] TAN M T, DING Z Y, XIE J. Freezing-induced myofibrillar protein denaturation: Contributions of freeze-concentration and role of cellobiose[J]. Journal of Food Engineering, 2022, 329: 11076.
- [22] 常娅妮, 马俪珍, 杨梅, 等. 不同冷冻方式对调味鱼贮藏期间肌原纤维蛋白的影响[J]. 肉类研究, 2019, 33(10): 63–68.
- CHANG Y N, MA L Z, YANG M, et al. Effects

- of different freezing methods on myofibrillar proteins from prepared fish products during storage[J]. *Meat Research*, 2019, 33(10): 63–68.
- [23] 蓝蔚青, 胡潇予, 阮东娜, 等. 傅里叶红外结合拉曼分析卡拉胶寡糖对南美白对虾蛋白结构影响[J]. *光谱学与光谱分析*, 2019, 39(8): 2507–2514.
- LAN W Q, HU X Y, RUAN D N, et al. Effects of carrageenan oligosaccharides on the protein structure of *Litopenaeus vannamei* by fourier transform infrared and micro-Raman spectroscopy[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2019, 39(8): 2507–2514.
- [24] QIU C J, XIA W S, JIANG Q X. Pressure-induced changes of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myofibrillar protein structure[J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 238(5): 753–761.
- [25] TAN M T, DING Z Y, YANG D Z, et al. The quality properties of frozen large yellow croaker filets during temperature fluctuation cycles: Improvement by cellobiose and carboxylated cellulose nanofibers[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 194: 499–509.
- [26] 朱志宁, 赵燕, 黄惠, 等. 不同种冷冻保护剂嗜酸乳杆菌保存效果的比较研究[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(5): 412–417.
- ZHU Z N, ZHAO Y, HUANG H, et al. Effect of preservation on *Lactobacillus acidophilus* by different cryoprotectants[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(5): 412–417.
- [27] ZENG Y, LI W N, LIU Y, et al. Antifreeze peptides preparation from tilapia skin and evaluation of its cryoprotective effect on *Lactocaseibacillus rhamnosus*[J]. *Foods*, 2022, 11(6): 857.
- [28] LONG G H, JI Y, PAN H B, et al. Characterization of thermal denaturation structure and morphology of soy glycinin by FTIR and SEM[J]. *International Journal of Food Properties*, 2015, 18(4): 763–774.
- [29] MENEGHEL J L, PASSOT S, DUPONT S, et al. Biophysical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* membrane during cold and osmotic stress and its relevance for cryopreservation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 101: 1427–1441.
- [30] 张英华, 霍贵成, 郭鸽. 海藻糖对乳酸菌冷冻干燥保护机理的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(7): 148–151.
- ZHANG Y H, HUO G C, GUO L. Study on the cryoprotective mechanism of trehalose for lactic acid bacteria during freeze drying[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(7): 148–151.
- [31] ALLISON S D, CHANG B, RANDOLPH T W, et al. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 365(2): 289–298.
- [32] 张锦中, 肖美添, 叶静, 等. 响应面法优化普鲁兰多糖-卡拉胶软胶囊囊皮配方[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(7): 162–167.
- ZHANG J Z, XIAO M T, YE J, et al. Optimization of the preparation process of the prouran-carrageena-soft capsule by response surface method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(7): 162–167.
- [33] WANG G Q, LUO L Y, DONG C, et al. Polysaccharides can improve the survival of *Lactiplantibacillus plantarum* subjected to freeze-drying[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 104(3): 2606–2614.
- [34] AMIRI A, MOUSAKHANI-GANJEH A, SHAFIE-KHANI S, et al. Effect of high voltage electrostatic field thawing on the functional and physicochemical properties of myofibrillar proteins[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2019, 56: 102191.
- [35] LI F F, DU X, WANG B, et al. Inhibiting effect of ice structuring protein on the decreased gelling properties of protein from quick-frozen pork patty subjected to frozen storage[J]. *Food Chemistry*, 2021, 353: 129104.
- [36] DU X, LI H J, PAN N, et al. Effectiveness of ice structuring protein on the myofibrillar protein from mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) during cryopreservation: Reduction of aggregation and improvement of emulsifying properties[J]. *International Journal of Refrigeration*, 2022, 133: 1–8.
- [37] GUAN F, CHEN Y R, ZHAO S M, et al. Effect of slurry ice during storage on myofibrillar protein of *Pseudosciaena crocea* [J]. *Food Science Nutrition*, 2021, 9(7): 3806–3814.
- [38] WALAYAT N, TANG W, WANG X P, et al. Effective role of konjac oligosaccharide against oxidative changes in silver carp proteins during fluctuated frozen storage[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 131:

- 107761.
- [39] 逯晓燕, 刘丽, 黄文哲, 等. 低磁场冷冻对鲢鱼肌原纤维蛋白的作用[J]. 肉类研究, 2022, 36(6): 1–8.
- LU X Y, LIU L, HUANG W Z, et al. Effect of low magnetic field freezing on structural and functional properties of myofibrillar proteins in silver carp muscle[J]. Meat Research, 2022, 36(6): 1–8.
- [40] 杨天, 郑志红, 张紫薇, 等. 酶解海洋壳寡糖和褐藻寡糖对鲢鱼糜热稳定性、化学作用力及蛋白质结构的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2022, 37(1): 157–165.
- YNAG T, ZHENG Z H, ZHANG Z W, et al. Effects of enzymatic hydrolysis of chitooligosaccharide and alginate oligosaccharide on thermal stability, chemical interactions and protein secondary and tertiary structure of silver carp surimi [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2022, 37(1): 157–165.
- [41] 汪兰, 吴文锦, 乔宇, 等. 冻藏条件下魔芋葡甘聚糖降解产物对肌原纤维蛋白结构的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(22): 244–249.
- WANG L, WU W J, QIAO Y, et al. Effect of degraded products of konjac glucomannan on the structure of myofibrillar protein from glass carp meat during frozen storage [J]. Food Science, 2015, 36(22): 244–249.
- [42] 周昕仪, 游刚, 高可安, 等. 凉粉草多糖对鱼肌球蛋白理化性质和结构特征的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(4): 48–56.
- ZHOU X Y, YOU G, GAO K A, et al. Effects of *Mesona chinensis* benth polysaccharide on the physicochemical properties and structural characteristics of myosin[J]. Food Science, 2023, 44(4): 48–56.
- [43] TAN M T, DING Z Y, MEI J, et al. Effect of cellobiose on the myofibrillar protein denaturation induced by pH changes during freeze–thaw cycles[J]. Food Chemistry, 2021, 373: 131511.

Preparation of Composite Antifreeze and Its Antifreeze Effect of Channel Catfish Myofibrillar Protein

Lu Xiaoyan^{1,3}, Cong Haihua^{1,2*}, Shen Yicheng¹, Zhao Yong^{3*}, Chen Jiwei^{2,3}, Jiang Yutong^{2,3}

¹College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning

²College of Food Science and Technology, Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture, Suzhou 215008, Jiangsu

³Zhongke Runyao (Suzhou) Biotechnology Co., Ltd., Suzhou 215152, Jiangsu

Abstract In this study, antifreeze crude peptide was obtained from crucian carp fish scales by trypsin enzyme digestion. And the formulation was designed by using {3, 3} simplex lattice method with antifreeze crude peptide, trehalose and alginate oligosaccharides as factors. The survival rate of *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) after 24 h of freezing was used as the screening index for antifreeze activity to obtain the theoretical model formulation of the compound antifreeze. The optimum group of composite antifreeze (K1, K2) and the theoretical model formulation group (K3) were further selected for the frozen channel catfish (*Ictalurus punctatus*) myofibrillar protein test to verify the antifreeze effect of the composite antifreeze. The results showed that the survival rate of *S. pyogenes* in the antifreeze crude peptide group reached only 57.11%. The infrared spectra of the interaction with soy lecithin showed that the crude antifreeze peptide might interact with the hydrophilic head of phospholipids and water, which could help to stabilize the membrane structure. The survival rate of *S. pyogenes* reached more than 80% in the K1 and K2 groups, and as high as 92% in the K3 group. The hydrophobicity of the protein surface was significantly reduced ($P < 0.05$) and the protein solubility was significantly increased ($P < 0.05$) by the addition of K1, K2 and K3 complex antifreeze. The α -helix and β -fold content of K1 and K2 were significantly decreased ($P < 0.05$); and the r -values of K2 and K3 were significantly decreased ($P < 0.05$). In summary, the theoretical model K3 is a good aquatic products composite antifreeze with high antifreeze activity, which can inhibit protein aggregation and maintain the stability of protein structure. This study provides a new idea for the efficient development of composite antifreeze, and provides a theoretical basis for the subsequent development of catfish pre-prepared vegetables frozen products.

Keywords crude antifreeze peptide; the simplex lattice method; antifreeze; composite antifreeze; myofibrillar protein