

抗冻蛋白抗冻活性评价方法的研究进展

刘志东¹, 马庆保^{1,2}, 陈雪忠^{1*}

¹中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; ²上海海洋大学食品学院, 上海 201306

摘要: 抗冻蛋白 (AFPs) 因其独特的结构和功能特性受到日益广泛的关注。抗冻活性的评价是 AFPs 研究的关键步骤之一, 评价结果的准确性、精确性和可比性直接影响 AFPs 的后续研究。本文综述了 AFPs 抗冻活性评价方法的基本原理、分析、比较了不同评价方法之间的优势、不足。未来 AFP 抗冻活性评价方法发展的重点在于评价方法的标准化, 精确性和重现性方面, 以期能够推动 AFPs 研究的发展。

关键词: 抗冻蛋白; 抗冻活性; 评价方法; 进展

中图分类号: Q514; TS254

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.032

Review on Evaluation Methods for Antifreeze Activity of Antifreeze Proteins

LIU Zhi-dong¹, MA Qing-bao^{1,2}, CHEN Xue-zhong^{1*}

¹East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

²College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Antifreeze proteins (AFPs) obtain more and more extensive concerns recently because of their unique structures and functions. In the research of antifreeze proteins, the evaluation of antifreeze activity is the first step and the most critical step. The accuracy and comparability of the measurable results directly affects its follow-up studies. In this article, the advantages and disadvantages of existing antifreeze activity evaluation methods are reviewed. The relationship, present problems and development trend, among different evaluation methods of the antifreeze activity, are analyzed and compared. The standardization, accuracy and reproducibility of evaluation methods of the antifreeze activity is the emphasis of the future development.

Key words: antifreeze protein; antifreeze activity; evaluation methods; progress

抗冻蛋白 (Antifreeze proteins, AFPs), 亦称热滞蛋白 (Thermal hysteresis proteins, THPs)、冰结合蛋白 (Ice binding proteins, IBPs) 或冰结构蛋白 (Ice structuring proteins, ISPs), 是一类可以非依数性的降低体系的冰点、改变冰晶形态、抑制冰晶生长的特殊蛋白质。AFPs 能够防止冰晶对生物体细胞造成的损伤和致死, 是生物体抵御低温胁迫所产生的一类物质^[1]。1969年, DeVries AL 在 Antarctic fish (*Trematomus borchgrevingki*) 的血液中首次发现了 AFPs 的存在^[2]。随后, 不同物种来源的 AFPs 相继被发现。目前, 已在极区生物、越冬生物、耐寒植物及细菌、真菌、动物等生物体中发现 AFPs 的存在。AFPs 的抗冻机理主要是通过吸附到冰晶的表面, 抑制冰晶的生长。

AFPs 的吸附导致生物体液的冰点温度低于其熔点温度, 使得生活于低温环境的生物得以生存^[3]。

AFPs 抗冻活性的评价是 AFPs 研究的关键步骤之一。AFPs 抗冻活性评价方法的诞生和发展是伴随着 AFPs 的发现和发展的。由于 AFPs 来源广泛、结构多样, 抗冻活性差异大。因此, 精准的评价 AFPs 的抗冻活性尤为重要。现有的抗冻活性评价方法主要是基于热滞活性和冰晶重结晶抑制原理衍生出的定性或者定量的抗冻活性评价方法。但是由于评价方法基本原理的差异, 不同抗冻活性评价方法和结果的准确性、相关性、重现性较差, 有些结果甚至是互相矛盾的。到目前为止, 还没有一种权威的、标准的抗冻活性评价方法为 AFPs 研究人员所认可, 这在一定程度上限制了 AFPs 研究的进展。但是, 现有的 AFPs 抗冻活性评价方法存在的缺陷和不足, 也为探究新的 AFPs 抗冻活性评价方法提供了机会^[4]。近年来, 材料科学、低温成像技术、信息技术的迅猛发展, 也为 AFPs 抗冻活性评价

收稿日期: 2016-08-08 接受日期: 2016-11-14

基金项目: 国家自然科学基金 (31471687); 上海市自然科学基金 (13ZR1449900); 上海市科技兴农项目 (2015-5-5); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2016HY-ZD09)

* 通讯作者 Tel: 86-21-65684690; E-mail: xuezhong@fishery.ac.cn

方法的发展提供了有效的材料基础、理论储备和方法学支撑^[5]。

本文综述了 AFPs 抗冻活性评价方法的发展历程,基本原理,分析、比较了不同评价方法之间的优势与不足,预测了抗冻活性评价方法的发展趋势以期推动 AFPs 的研究。

1 基于热滞原理的抗冻活性评价方法

热滞是指含有 AFPs 溶液的熔点和非平衡冻结点之间存在的温度差效应,这个差值也称为热滞活性(Thermal Hysteresis Activity, THA)或冻结滞活性(Freezing hysteresis activity, FHA)。热滞活性是评价 AFPs 抗冻活性的重要指标。因此,精确的测定 AFPs 的热滞活性对于评价 AFPs 的抗冻活性尤为重要。目前, AFPs 热滞活性的评价主要通过两种方式:冰晶形态图像法和差示扫描量热法及两种方法的结合。

1.1 冰晶形态图像法

冰晶形态图像法主要是通过显微镜观察冰晶结晶/融化过程中冰晶核的变化情况,同步确定 AFPs 的冻结点和熔点的温度,定量的确定 AFPs 的热滞活性。

1.1.1 毛细管单晶生长观察法(传统方法)

1969年, DeVries AL 采用毛细管单晶生长观察法评价了其从南极鱼(*Trematomus borchgrevinkii*)的血浆中所发现 AFPs 的抗冻活性,因此,该法亦称 DeVries 法。该法首先将毛细玻璃管的一端在酒精灯下烧结,接着将 AFPs 溶液注入毛细玻璃管中。然后,采用石蜡油密封毛细玻璃管的另一端,将样品封存于玻璃毛细管内;再通过快速冷冻使样品结冰;通过缓慢升温融化样品直至样品中仅保留一个冰晶核。利用浴锅中预冷的 95% 乙醇(预冷的温度稍微低于样品冰点)对毛细管进行缓慢的升温/降温;通过相差显微镜对毛细管内的样品进行观察。冰晶核缓慢生长的温度即为冻结点,冰晶核融化的温度即为熔点,熔点与冻结点的差值计为热滞活性^[6,7]。

该法是在冰晶核体积足够小的情况下用来观察样品的冻结点和熔点,操作比较简单,不需要大型的仪器设备。但是,该法操作过程较复杂,测定单一样品耗时长;而且人为误差较大。误差主要来源于两个方面:一是毛细管中样品的升温/降温速率难以精确控制,并且波动较大,样品温度的变化速率滞后于低温酒精循环浴的调整,导致样品的观测温度与实

际温度存在一定的差异;二是毛细管中冻结的样品冰晶易附着于毛细管,其形态变化不易辨认,即使是同一样品,实验组内观测到的 TH 也有较大的差异。

1.1.2 改进的毛细管单晶生长观察法

由于毛细管单晶生长观察法(DeVries 法)存在的不足,研究人员开展了相关的研究以减小误差。Daniel 等^[8]在冷却装置上安装了自动调温器调节温度,将温度波动控制在 ± 0.02 °C 范围内,利用更加高效的氟利昂进行冰晶的诱导结冰,改进了光源装置(配备了准直仪和偏振滤光器),便于更加直观清晰地观察冰晶的生长情况。Jin YM 等进行了改进^[9]。Tomczak 等对毛细管法进行了改进,更便于冰晶的观测^[10]。王维香^[11]改进了样品孔,将不锈钢圆片打的微孔(直径为 0.1 mm)作为样品孔。加样后,样品溶液因毛细管作用而悬垂于小孔中。观测过程中,样品溶液始终处于悬垂状态,观测时图像更加清晰和直观。相比于 DeVries 法,此法所需样品量更少,且没有处理毛细管的复杂操作;容器壁较薄,传温速度快,样品对温度升降更加敏感,减小了样品温度的后滞效应。虽然很多学者都对 DeVries 法进行了不断的改进和优化。但是,这些措施都没有从根本上解决该法存在的温度难以精确控制,人为误差较大的问题。

1.1.3 纳升渗透压法

目前,国际上使用较多的 AFPs 热滞活性测定方法为纳升渗透压(Nanolitre Osmometer)法。纳升渗透压法所用的仪器主要有:Clifton(Clifton Technical Physics, 哈特福特, 纽约, 美国)与 Otago(Otago Osmometers, 但尼丁, 新西兰)两种纳升渗透压计^[12-16]。该法具有所需样品量少,能够提供冰晶图像的特点。纳升渗透压仪由温度控制单元和冷冻平台组成。样品支持盘(具有多个直径约为 0.33 mm 的上样孔)安装在冻结盘上。测定前,首先要利用已知摩尔渗透压浓度的溶液进行两点定位校准;上样前将少量的浸油注入样品孔的底部(目的是为了保持表面张力及防止样品脱水);然后,采用微量注射器或毛细管取少量样品溶液注入或吹入样品槽的浸油中。纳升渗透压法的冷却台采用珀尔帖原理(Peltier principle)运行控制,能够在 0 °C ~ -9 °C(误差为 ± 0.01 °C)范围内进行精确调节温度^[17]。通过调节冷却台的温度实现精确升/降温,诱导冰晶的生长或融化,直至获得最后一个冰晶核。期间,通过显微镜观察冰晶的生长情况,获得样品溶液的冻结

点和熔点,进而获得样品的热滞活性^[18]。观测期间,冰晶的生长及减小还可以通过摄像机记录并采用计算机软件分析研究。Duman 等研究发现纳升渗透压法较毛细管法更灵敏。即使相同的样品,纳升渗透压法测得的热滞值大于毛细管法^[19]。原因可能是由于纳升渗透压法所需的冰晶小于毛细管法,所需样品量也少于毛细管法。冰晶的形状显示为圆形/圆盘形时,表明样品没有抗冻活性;冰晶的形状为多面体或者双六面体时,表明样品的抗冻活性较高;冰晶的形状为平的六棱柱型,表明样品的抗冻活性较低^[20]。此外,由于低温成像技术的不断发展,纳升渗透压计与显微镜相结合观察到的冰晶生长变化的图像更加清晰和准确。但是,纳升渗透压计的操作过程主要是依靠人工完成,温度的变化速率和温度的波动也无法达到非常精准的控制,测定温度范围较小(测定下限大约为-7.5℃),而且该设备目前还无法显示时间与温度之间的动态实时变化情况。Tomalty 等^[21]利用 Clifton 纳升渗透压计测定了多年生黑麦草 AFPs 的热滞活性,蛋白浓度为 1 mg/mL 时,其 THA 为 0.20℃。Gupta 等^[22]利用 Otago 纳升渗透压计测定了沙棘 AFPs 的热滞活性,蛋白浓度为 0.2 mg/mL 时,其 THA 为 0.13℃。

1.1.4 改进的纳升渗透压法

为了克服纳升渗透压法存在的不足,Braslavsky 等^[23]设计了一个基于计算机控制的纳升渗透压系统。系统的冷台包括一个金属台和一个作为散热装置的微流装置,二者相连。系统的温度依靠温控仪控制的热电冷却器进行升/降温,而温控仪依靠计算机进行调控。改进的纳升渗透压法在原有装置基础上进行了检测室的改进并实现了控制系统的自动化,温度的控制与检测非常灵敏与精确(实现了以 0.001℃ 的分辨率降低到-25℃,也实现了 0.002℃ 的测量精度);而且能够通过一个显微视频输出装置,自动的将检测室内温度随时间的波动进行实时反馈。然而,该法采用冰晶的直接显微观测评价样品的 THA 方法还存在不准确和不连续等问题。该法没有准确的方式确定冻结点和含有冰核溶液二次结晶的起始温度,因为它们的判断并不取决于视觉评价;测试后的样品不能重复利用。此外,该法向金属板的孔中注入样品以及确定一个合适的冰晶作为观测对象也是非常耗时和繁琐的过程。此外,Vali 等采用微滴冻结法检测,计算云杉(*Picea* spp)非原生质体蛋白质的 THA,Celik 等采用微流技术评价 AFPs 的 THA^[24-27]。

1.2 差示扫描量热法(DSC 法)

差示扫描量热法(Different scanning calorimetry, DSC)是一种在差热分析(Differential thermal analysis, DTA)的基础上发展起来的热分析技术,兼具 DTA 的功能并克服了 DTA 在计算热量变化的困难。DSC 法是以样品温度变化产生的热效应为基础,通过测定 AFPs 结晶过程中热量的变化,精确测定热容和热焓,进而确定真实的结晶起始温度,得到样品的热滞活性并精确测定体系的冰晶含量。

1988 年,Hansen 等首次将 DSC 法用于黄粉虫(*Tenebrio molitor*) AFPs 热滞活性的评价并确定了影响因素^[28,29]。田童童等^[30]采用 DSC 法测定了胡萝卜(*Daucus carota*) AFPs 的热滞活性。Ding 等^[31]从冷驯的啤酒大麦种子中提取了 AFPs 并采用 DSC 方法测定了其 THA, AFPs 浓度为 18.0 mg/mL 时,THA 为 1.04℃。Jia 等^[32]从越冬的女贞叶片中纯化出了 AFPs,采用 DSC 方法测定了其 THA, AFPs 浓度为 10 mg/mL 时,冰晶含量 5% 时,THA 为 0.27℃。目前,DSC 法已经成为测定 AFPs 热滞活性的主要方法之一^[33-37]。通常, AFPs 的 DSC 法测定开始前,一般采用萘、镓、铟、辛烷等校正,以空的铝盘作为参照;通常以 BSA,蒸馏水作为阴性对照;待测样品常溶于蒸馏水、Tris/HCl 缓冲液、PBS 等体系。DSC 法常用的仪器包括 Perkin Elmer Co., 美国;Mettler Toledo, 美国;TA Instruments, New Castle, 美国;HP-μDSC 7 Evo; Setaram, Inc; Netzsch. GmbH, Selb, 德国。

相比于其他方法,在相同的测定环境中,DSC 法测定结果的精确度和重复性更高。通过过冷冻结及融化热流的温度曲线,还能反映 AFPs 特殊的相变和热力学行为。由于仪器测定范围的限制,DSC 法不能测定过冷点太低样品的热滞活性。尽管该法可以计算出样品中冰晶的体积,但是不能提供冰晶生长形态和冰晶大小的信息。此外,样品浓度、升降温速率、冰晶含量等都会影响测定结果甚至无法检测出热滞活性,检测时间较长,设备的成本和环境要求也较高。特别是较低的升/降温速率能够减少或避免过冷现象对 TH 测定结果造成的误差和干扰。

尽管基于热滞活性的 AFPs 抗冻活性评价方法具有独特的优势,但在 AFPs 抗冻活性评价方面仍然受到样品来源、浓度、退火时间、测试环境、添加物盐离子种类及浓度等、控温精度、升/降温速率等因素的影响。因此, AFPs 热滞活性的评价结果重现性,可比性差异较大。虽然基于热滞活性的 AFPs

抗冻活性评价方法还存在一些问题,但热滞活性依然是评价 AFPs 抗冻活性的最重要方法之一。特别是近年来,伴随着新技术的出现,纳升渗透压法和 DSC 法的测量精确度和准确度都不断提高,他们已经成为 AFPs 热滞活性测定的主要方法^[38,39]。

2 基于冰晶重结晶抑制原理的抗冻活性评价方法

冰晶重结晶 (Ice recrystallization, IR) 是指在低于体系熔点温度时发生的冰晶重结晶,即已形成的冰晶体颗粒之间的重新分配,小的冰晶相互结合,大的冰晶不断长大的过程,该过程称为奥斯特瓦尔德成熟过程 (Ostwald ripening)^[40-42]。冰晶的重结晶是热力学驱动的过程,这会导致体系的总自由能降低。这也符合一切自发过程朝着体系自由能降低的方向进行的现象^[43]。因此,冰晶重结晶抑制活性也是评价 AFPs 抗冻活性的重要指标。冰晶结晶的形成主要取决于晶核,冰晶的重结晶是以较小冰晶的消失来实现的较大冰晶的生长,而与成核过程无关,这也是二者的关键区别。因此,IRI 活性的量化主要是基于 IRI 终点的确定。IRI 的评价是最灵敏的 AFPs 抗冻活性评价方法,即使纳摩尔浓度的 AFPs 也能抑制冰晶的重结晶。

目前,冰晶重结晶抑制活性测定方法主要为溅射冷却 (splat-cooling) 法,是一种半定量方法^[44]。实验过程:采用经液氮或干冰预冷却的金属板,随后将少量 (10 μL) AFPs 溶液从距离经 -80 $^{\circ}\text{C}$ 预冷金属板上方 1.5 ~ 3.0 m 高的位置滴落。滴落的样品与金属板接触时,瞬间冻结形成一个薄薄的冰晶片,该法亦称平板实验。将冰晶片转移到显微镜载物台上,调整温度,使冰晶孵化一段时间进行重结晶。利用显微镜对各个时间段的冰晶形态图像进行观察并拍照,并对图像进行处理分析;通过比较、测算冰晶的变化情况,获得冰晶重结晶抑制活性。通常以 BSA, 蒸馏水作为阴性对照。

但在实际操作过程中,当样品溶液中溶质的浓度很高时,样品的下落及其他操作都比较困难,而且形成的冰晶可能不透明,对于冰晶变化的观察也比较困难。因此,Smallwood 等^[43] 对其进行了改进,设计了蔗糖-三明治检测法 (sucrose-sandwich assays)。将 AFPs 溶解于 23% ~ 60% 的蔗糖溶液 (20 mM 碳酸氢氨, pH 8.0); 梯度稀释,分别取少量封存于两个圆形薄片 (直径 12 ~ 18 mm) 之间;然后,“三明治”在有机溶剂 (异辛烷,庚烷) 中速冻至 -80 $^{\circ}\text{C}$; 随

后,“三明治”被转移至相同的溶剂中在 -6 ~ -8 $^{\circ}\text{C}$ 保温 (30 min 至过夜)。冰晶形态的变化采用显微镜观测。早期采用的冰晶重结晶抑制活性测定方法是将样品溶液封存于玻璃片之间,然后,将溶液降温过冷至 -6 $^{\circ}\text{C}$ 并且成核并于 -4 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 24 h 让冰晶进行重结晶;利用显微镜观察拍照,得出冰晶重结晶抑制活性。但是此法中最终冰晶晶粒大小主要取决于晶核的数量以及晶界迁移率,样品形成晶核具有不确定性^[43]。然而,该法一次只能观测一个样品。多个样品不能同时观测和比较,样品也不能保存另用。Tomczak 等为了解决这些问题,提出了毛细管法^[10]。在该法中,不同的样品被注入毛细管中,在同一个显微视野中可以同时观测并排摆放的 10 ~ 15 个样品。此外,注入毛细管中的蛋白样品可以保存 4 周而不降解,且可以继续用于后续分析。Tam 等^[46] 采用该方法测定了抗冻糖蛋白类似物的冰晶重结晶抑制活性。

Hassas-Roudsari 等提出了基于 RI 评价的 DSC 快速定性评价方法。含有 AFPs 的样品在特定的时间和浓度范围内的热分析图表现出放热特性,而空白样品的热分析图则没有表现出放热特性。最终,该法可以用于任何含有 AFPs 或 ISPs 的样品 (不论其是基于水或者缓冲液作为提取溶剂)。该法准确、快速、不需要繁琐的实验室准备工作或观察,所需样品量低于 1 μL 。此法还可与先前介绍的 DSC 法评价 THA 相结合。该法的局限是测试样品不能够再回收,样品的浓度范围需要确定。此外,该法也无法提供冰晶颗粒大小的信息^[45]。还有一种“重结晶抑制终点” (RI end point) 的方法。该法通过梯度稀释样品用于检测样品的 RI 活性,直至确定样品的 RI 活性不被检出的浓度。AFPs 浓度越低表明冰晶的重结晶抑制活性越高。相同浓度不同来源 AFPs 之间冰晶重结晶抑制的活性越高,其抗冻效果越好。该法的优势在于保留了样品,可以用于进一步的分析及同步的观测。

然而,采用上述方法,每次只能进行一个实验样品的测定,拍照时样品也必须放于显微镜固定的位置,以防因高度变化产生的误差。因此,必须等所有的样品都测定完毕之后才能将所得到的图像进行直接比较和分析,但仅能获得样品的冰晶重结晶抑制活性信息。而且,由于样品是置于玻璃片或金属板上,测定之后样品不能进行保存,因此,样品也无法再次使用或留作参考,也不能用于其它应用或者同步分析。

综上所述, AFPs 的抗冻活性评价方法尽管各有优缺点, 它们在 AFPs 的抗冻活性评价方法发展过程中发挥了应有的作用。研究发现, 即使是相同物种来源的 AFPs, 由于其结构, 测定方法的差异及产地的不同, 抗冻活性测定结果的差异也非常显著。特别是 THA 和 IRI 两种抗冻活性评价方法所获得的结果有时差异很大。主要是由于物种的来源, 两类方法的评价原理, 结果的表示方法等的差异不同所致。此外, 在物种进化的过程中, 为了抵御低温环境的胁迫, 不同的物种采用迥异的抗冻方式和机理。如极区鱼类或昆虫在寒冷环境中体液不能结冰, 因此其 AFPs 的 THA 较高; 而越冬植物则通过抑制冰晶生长而防止其组织受低温伤害, 因此其 RI 较高, 但 THA 较低。因此, 不同物种来源的 AFPs 与冰晶面的结合方式和途径也差异较大^[47,48]。未来, 研究人员可以基于统计学方法等分析两种评价结果的关联关系, 进而为 AFPs 抗冻活性评价方法和结果的标准化奠定基础。因此, AFPs 抗冻活性评价方法及结果之间的标准化仍需开展深入的研究。

3 结论与展望

AFPs 的独特价值主要表现为其抗冻活性(热滞活性和冰晶重结晶抑制活性)。因此, AFPs 抗冻活性的精准、标准化评价对于 AFPs 研究极为重要。经过近半个世纪的发展, 抗冻活性评价方法的发展已经由原来单一技术相对独立的发展状态逐渐过渡到多技术交叉、融合发展的状态, 方法研究的理论基础不断深入; 由原来较单一地基于生理感知或物质性的可视性研究向基于热力学、微观科学和信息技术相结合、更精准的检视性研究发展。未来, 提高 AFPs 抗冻活性评价结果的准确性、精确性和相关性仍是 AFPs 抗冻活性评价研究的重点, 尤其是进一步完善, 规范现有的主要评价方法并明确二者之间的相关关系或者构建一种 AFPs 研究公认的标准定性/定量评价方法。因此, 抗冻活性评价方法的精准化和标准化将是抗冻活性方法评价的主要和重点发展方向。

参考文献

- 1 Clarke CJ, *et al.* Ice structuring proteins—a new name for antifreeze proteins. *Cryoletters*, 2002, 23 (2) : 89-92.
- 2 DeVries AL, *et al.* Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, 1969, 163 : 1073-1075.
- 3 Gamham CP, *et al.* Anchored clathrate waters bind antifreeze

proteins to ice. *PNAS*, 2011, 108 : 7363-7367.

- 4 Russo R, *et al.* Molecular adaptations in Antarctic fish and bacteria. *Polar Sci*, 2010, 4 : 245-256.
- 5 Nada H, *et al.* Antifreeze proteins: computer simulation studies on the mechanism of ice growth inhibition. *Polymer J*, 2012, 44 : 690-698.
- 6 Davries AL. Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes. *Science*, 1971, 172 : 1152-1155.
- 7 DeVries AL. Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water. *Methods Enzymol*, 1986, 127 : 293-303.
- 8 Daniel MM, *et al.* Antifreeze glycoproteins from polar fish. *J Biol Chem*, 1980, 255 : 659-662.
- 9 Jin YM, *et al.* Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation. *Compar Biochem Physiol*, Part B, 2006, 144 : 290-300.
- 10 Tomczak MM, *et al.* A facile method for determining ice recrystallization inhibition by antifreeze proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311 : 1041-1046.
- 11 Wang WX (王维香). Purification and physicochemical characterization of Antifreeze proteins from *A mongolicus*. Dalian: Dalian University of Technology, PhD. 2004.
- 12 Chakrabarty A, *et al.* The effect of enhanced α -helicity on the activity of a winter flounder antifreeze polypeptide. *Eur J Biochem*, 1991, 202 : 1057-1063.
- 13 Cullins TL, *et al.* Antifreeze proteins in pelagic fishes from Marguerite Bay (Western Antarctica). *Deep Sea Research Part II: Topical Stu Oceanogr*, 2011, 58 : 1690-1694.
- 14 Knight CA, *et al.* Inhibition of the recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology*, 1986, 23 : 256-262.
- 15 Nickell PK, *et al.* Antifreeze proteins in the primary urine of larvae of the beetle *Dendroides Canadensis*. *J Exp Biol*, 2013, 216 : 1695-1703.
- 16 Ba Y, *et al.* Effects of a type I antifreeze protein (AFP) on the melting of frozen AFP and AFP + solute aqueous solutions studied by NMR microimaging experiment. *J Biol Phys*, 2013, 39 : 131-144.
- 17 Shao Q (邵强), *et al.* Antifreeze activity of antifreeze protein and its quantitative analysis. *J Pingyuan Univ* (平原大学学报), 2005, 22 : 111-113.
- 18 Lee JH, *et al.* Structural basis for the antifreeze activity of an ice-binding protein from an Arctic yeast. *J Biol Chem*, 2012, 287 : 11460-11468.
- 19 Duman JG, *et al.* The role of endogenous antifreeze protein enhancers in the hemolymph thermal hysteresis activity of the beetle *Dendroides canadensis*. *J Insect Physiol*, 2002, 48 : 103-

- 111.
- 20 Slaughter D, *et al.* Improvements in the determination of antifreeze protein activity using a freezing point osmometer. *Anal Biochem*, 1981, 115:212-218.
- 21 Tomalty HE, *et al.* Perturbation of bacterial ice nucleation activity by a grass antifreeze protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452:636-641.
- 22 Gupta R, *et al.* Low temperature stress modulated secretome analysis and purification of antifreeze protein from *Hippophae rhamnoides*, Himalayan wonder plant. *J Proteome Res*, 2012, 11:2684-2696.
- 23 Braslavsky I, *et al.* LabVIEW-operated novel nanoliter osmometer for ice binding protein investigations. *J Visual Exp*, 2013, 72:4189-4195.
- 24 Celik Y, *et al.* Microfluidic experiments reveal that antifreeze proteins bound to ice crystals suffice to prevent their growth. *Proceed Natl Acad Sci USA*, 2013, 110:1309-1314.
- 25 Vali G. Principles in Ice Nucleation, in: R. E. Lee Jr., G. J. Warren, L. V. Gusta (Eds.), *Biological Ice Nucleation and Its Applications*, APS Press. 1995. 1-28.
- 26 Zhang C, *et al.* Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough. *Food Res Int*, 2007, 40:763-769.
- 27 Mao XF, *et al.* Characterization of a novel b-helix antifreeze protein from the desert beetle *Anatolica polita*. *Cryobiology*, 2011, 62:91-99.
- 28 Hansen TN, *et al.* Differential scanning calorimetric analysis of antifreeze protein activity in the common mealworm, *Tenebrio Molitor*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1988, 957:217-221.
- 29 Hansen TN, *et al.* Differential scanning calorimetric analysis of *Tenebrio molitor* antifreeze protein activity. *Cryobiology*, 1989, 26:383-388.
- 30 Tian TT (田童童), *et al.* Determination of thermal hysteresis activity of antifreeze proteins by DSC method. *China Brewing (中国酿造)*, 2014, 1:127-132.
- 31 Ding XL, *et al.* Extraction, purification and identification of antifreeze proteins from cold acclimated malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Food Chem*, 2015, 175:74-81.
- 32 Jia CL, *et al.* Characterization and yeast cryoprotective performance for thermostable ice-structuring proteins from Chinese Privet (*Ligustrum Vulgare*) leaves. *Food Res Int*, 2012, 49:280-284.
- 33 Cao H, *et al.* Antifreeze and cryoprotective activities of ice-binding collagen peptides from pig skin. *Food Chem*, 2016, 194:1245-1253.
- 34 Liu Z, *et al.* Enhancement effect of solutes of low molecular mass on the insect antifreeze protein ApAFP752 from *Anatolica polita*. *J Thermal Anal Calorimetry*, 2015, 120:307-315.
- 35 Wen X, *et al.* Interaction of reduced nicotinamide adenine dinucleotide with an antifreeze protein from *Dendroides canadensis*; mechanistic implication of antifreeze activity enhancement. *J Molecul Recogn*, 2011, 24:1025-1032.
- 36 Kristiansen E, *et al.* Salt-induced enhancement of antifreeze protein activity; A salting-out effect. *Cryobiology*, 2008, 57:122-129.
- 37 Kubota N. Effects of cooling rate, annealing time and biological antifreeze concentration on thermal hysteresis reading. *Cryobiology*, 2011, 63:198-209.
- 38 Hassas-Roudsari M, *et al.* Ice structuring proteins from plants; Mechanism of action and food application. *Food Res Int*, 2012, 46:425-436.
- 39 Balcerzak AK, *et al.* Designing ice recrystallization inhibitors; from antifreeze (glyco) proteins to small molecules. *RSC Advances*, 2014, 80:42682-42696.
- 40 Mizrahy O, *et al.* Inhibition of ice growth and recrystallization by zirconium acetate and zirconium acetate hydroxide. *PLoS One*, 2013, 8(3):1-9.
- 41 Budke C, *et al.* Ice recrystallization kinetics in the presence of synthetic antifreeze glycoprotein analogues using the framework of LSW theory. *J Physic Chem B*, 2009, 113:2865-2873.
- 42 Knight CA, *et al.* Solute effects on ice recrystallization; an assessment technique. *Cryobiology*, 1988, 25(1):55-60.
- 43 Smallwood M, *et al.* Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*). *Biochem J*, 1999, 340:385-391.
- 44 Regand A, *et al.* Freezing and ice recrystallization properties of sucrose solutions containing ice structuring proteins from cold acclimated winter wheat grass extract. *J Food Sci*, 2005, 70:E552-E556.
- 45 Hassas-Roudsari M, *et al.* A new quantitative method to measure activity of ice structuring proteins using differential scanning calorimetry. *Cryoletters*, 2012, 33:118-125.
- 46 Tam RY, *et al.* Solution conformation of C-Linked antifreeze glycoprotein analogues and modulation of ice recrystallization. *J Am Chem Soc*, 2009, 131:15745-15753.
- 47 Gaukel V, *et al.* Synergism of different fish antifreeze proteins and hydrocolloids on recrystallization inhibition of ice in sucrose solutions. *J Food Eng*, 2014, 141:44-50.
- 48 Pertaya N, *et al.* Direct visualization of spruce budworm antifreeze protein interacting with ice crystals; basal plane affinity confers hyperactivity. *Biophys J*, 2008, 95:333-341.