

两条鲢鱼小清蛋白源抗冻肽的活性 及作用机制比较

Comparison of the activities and cryoprotective mechanism of two antifreeze peptides derived from silver carp parvalbumin

李 军^{1,2} 符禹婷^{1,2} 俞 健^{1,2} 李向红^{1,2}

LI Jun^{1,2} FU Yuting^{1,2} YU Jian^{1,2} LI Xianghong^{1,2}

刘永乐^{1,2} 王发祥^{1,2}

LIU Yongle^{1,2} WANG Faxiang^{1,2}

(1. 长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114;

2. 湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心, 湖南 长沙 410114)

(1. College of Food and Bioengineering, Changsha University of Science and Technology,
Changsha, Hunan 410114, China; 2. Hunan Provincial Engineering Technology Research
Center of Aquatic Food Resources Processing, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:目的:探讨鲢鱼小清蛋白源抗冻肽的作用机制和构效关系。方法:采用差示扫描量热和分子动力学模拟方法对比分析了两条鲢鱼小清蛋白源抗冻肽的活性、结构及其作用模式。结果:Pv-AFP 1(KAADSFNHNKAFFAKVG)呈稳定的 α -螺旋结构,而 Pv-AFP 2(KAADSFNHNKAF)倾向于呈无规卷曲;Pv-AFP 1的热滞值为 0.87 °C,总平均亲水性为-0.21,热滞活性和两亲性均优于 Pv-AFP 2(0.74 °C, -0.71);分子动力学模拟显示 Pv-AFP 1能结合 53 个水分子,可形成 16 个氢键吸附至冰晶表面,结合能为-1 514 kJ/mol,均大于 Pv-AFP 2(能结合 50 个水分子,通过形成 11 个氢键吸附至冰面,结合能为-805 kJ/mol);尽管两条肽序列相似,但其与水分子和冰晶相互作用的主要位点和模式也有一定差异。此外,两条肽均能与冰水界面相互作用,改变了冰面的曲率从而抑制了水的结冰,但 Pv-AFP 1抑制冰面生长的效果优于 Pv-AFP 2,与热滞活性结果一致。结论:鲢鱼小清蛋白源抗冻肽的活性可能与构象、两亲性及其与水分子和冰晶相互作用的亲和力、位点和模式有关。

关键词:鲢鱼;小清蛋白;抗冻肽;热滞活性;分子动力学

Abstract: Objective: Explore the cryoprotective mechanism and structure-activity relationship of antifreeze peptides derived from silver carp parvalbumin. **Methods:** Using differential scanning calorimetry and molecular dynamics simulation to compare activity, structure and mode of action of two typical peptides. **Results:** Pv-AFP 1 (KAADSFNHNKAFFAKVG) had a stable α -helix structure, while Pv-AFP 2 (KAADSFNHNKAF) tended to exhibit random coil. The thermal hysteresis activity of Pv-AFP 1 was 0.87 °C, which was higher than Pv-AFP 2 (0.74 °C). Molecular dynamics simulations showed that Pv-AFP 1 could interact with 53 water molecules, and could form 16 hydrogen bonds to adsorb onto the surface of ice crystals, with a binding energy of -1 514 kJ/mol, all were greater than Pv-AFP 2 (can bind 50 water molecules, adsorb on ice surface by forming 11 hydrogen bonds, with a binding energy of -805 kJ/mol). Despite the similarity of the two peptide sequences, their major sites and modes of interactions with water molecules and ice crystals were somewhat different. In addition, both peptides could interact with ice/water interface and altered the curvature of the ice surface, thereby inhibiting water freezing. But Pv-AFP 1 showed a better inhibitory effect on ice surface growth than Pv-AFP 2, which was consistent with their thermal hysteresis activity. **Conclusion:** The activities of antifreeze peptides derived from silver carp parvalbumin might be related to their structural characters and their affinities, sites and modes of interaction with water molecules and ice crystals.

Keywords: silver carp; parvalbumin; antifreeze peptide; thermal hysteresis; molecular dynamic

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:32372371);湖南省重点研发计划项目(编号:2022NK2038)

作者简介:李军,男,长沙理工大学在读硕士研究生。

通信作者:王发祥(1978—),男,长沙理工大学教授,博士。

E-mail: wfx@csust.edu.cn

收稿日期:2024-02-01 **改回日期:**2024-04-16

冷冻保藏是目前长期存贮食物最常用的手段,但冷冻环节通常会因为冰晶形成和重结晶等原因不可逆损害食物品质,目前添加抗冻剂是最有效的缓解方法之一^[1-2]。抗冻肽能通过吸附在冰晶表面抑制冰晶生长和重结晶,从而发挥抗冻保护作用^[3]。与传统抗冻剂相比,抗冻肽营养、安全、理化性质稳定,易渗透入细胞和组织发挥作用,同时可以利用食源性蛋白质特异性水解制备,原料来源充足、生产工艺可控,便于工业化生产和规模化应用^[4],市场需求和应用前景广阔。

近年来,研究者利用食用明胶、丝胶蛋白、鱼皮、虾副产物等为原料,制备和筛选出许多优良的抗冻肽,并在冷冻食品的低温保护方面显示出巨大的应用潜力^[5-8]。尽管抗冻肽通常具有某些特定的氨基酸序列或结构特征,但其抗冻机理至今还存在争议。目前主流的观点认为,抗冻肽具有热滞活性,能以非依数性形式降低体系冰点,从而影响冰晶形成过程^[3];而当冰晶形成时,抗冻肽分子被部分冻结,并通过氢键作用吸附到冰晶的特定表面,从而抑制冰晶生长和重结晶,降低食品冷冻损伤^[9]。然而,抗冻肽的抗冻性质很大程度上依赖于其来源和制备方法^[3,8],而现有的试验方法难以直接描述不同特征的抗冻肽与水分子或冰晶相互作用的细节,尚需借助计算机模拟技术进一步阐释^[10]。

最近,课题组^[11]从鲢鱼酶解产物中筛选了 10 条抗冻肽,其序列均定位于鲢鱼小清蛋白非功能的 AB 结合域,共享了一段十肽序列,但其热滞活性差异较大;目前尚不清楚其肽链长度与热滞活性变化的关系,以及其抗冻作用的分子机制是否一致。研究拟选择其中两条代表性抗冻肽,对比分析其热滞活性,并使用分子动力学模拟方法研究抗冻肽与水分子、冰晶表面及冰水界面相互作用的细节,以期为进一步理解鲢鱼小清蛋白源抗冻肽的作用机理和构效关系提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

抗冻肽 Pv-AFP 1(KAADSFNHNKAFKVG)、Pv-AFP 2(KAADSFNHNKAF);纯度>90%,课题组前期筛选自鲢鱼酶解产物,来源于鲢鱼小清蛋白,委托南京源肽有限公司合成。

1.2 仪器与设备

差示扫描量热仪:DSC Q2000 型,美国 TA 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 热滞活性测定 参照 Cui 等^[11]的方法以差示扫描量热仪(DSC)测定。以空坩埚为对照,取约 5 μ L 质量浓度为 10 mg/mL 样品迅速放入 DSC 样品盘中,密封,以 4 $^{\circ}$ C/min 下降至-25 $^{\circ}$ C 并保持 3 min,再以 4 $^{\circ}$ C/min 升至样品处于固-液状态时的温度并保持 5 min,此温度记为 T_h ,然后再以 4 $^{\circ}$ C/min 降至-25 $^{\circ}$ C 并记录开始结晶

时的温度为 T_0 。按式(1)计算热滞值。

$$A_{TH} = T_h - T_0, \quad (1)$$

式中:

A_{TH} ——热滞活性, $^{\circ}$ C;

T_h ——保留温度, $^{\circ}$ C;

T_0 ——开始结晶温度, $^{\circ}$ C。

1.3.2 抗冻肽的理化参数和结构分析 对抗冻肽基本性质的分析采用 ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>),采用 I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER>)工具进行多肽同源建模以建立三维结构。

1.3.3 肽与水分子相互作用的分子动力学模拟 采用 Gromacs 2020.6 软件包^[12]进行模拟。先建立与多肽分子边缘距离至少 1 nm 的立方体盒子,并用水分子填充。然后进行 5 000 步的能量最小化,经过 100 ps 的 NVT 和 NPT 预平衡将温度和压力分别控制在 220 K 和 100 kPa,最后进行 50 ns 的成品模拟。结果采用 Pymol 和 VMD 软件分析。

1.3.4 肽与冰晶表面相互作用的分子动力学模拟 参照 Wu 等^[13]的方法,使用 Material Studio 2020 软件,冰的晶胞采用 Ih 结构,晶胞常数为 $a = 0.45$ nm, $b = 0.78$ nm, $c = 0.73$ nm, $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$ 。将冰晶重复排列形成冰板,冰板由 3 936 个冰分子组成,尺寸为 9.00 nm $\times$ 1.56 nm $\times$ 8.79 nm。固定冰中氧原子的位置后,将多肽放在冰平面上,智能算法进行构象优化,范德华力的截止半径设为 1.25 nm。优化后的肽/冰体系在 165 K 下进行 100 ps 的 NVT 模拟,分析形成的氢键和结合能。

1.3.5 多肽抑制冰晶生长的分子动力学模拟 同 1.3.2 构建含有肽的水盒子,并能量最小化,然后使用 Packmol 与冰层接合,参照 Kuiper 等^[14]的方法构建冰水界面模型,冰层由 GenIce 生成,大小为 4.69 nm $\times$ 4.41 nm $\times$ 0.90 nm,含有 576 个冰分子;根据刘晓霞^[15]的结论调整为冰晶的棱面朝上。冰、水、肽混合体系再次经能量最小化并 NVT、NPT 预平衡后,在 220 K,100 kPa 条件下进行 300 ns 的成品模拟。

1.3.6 数据处理 热流数据经 TA Universal Analysis 软件导出后,采用 Origin 2018 制图;蛋白的结构和动力学模拟结果的可视化由 Pymol 2.5.2 和 VMD 软件处理生成。

2 结果与分析

2.1 热滞活性分析

热滞是指抗冻蛋白(肽)降低冰晶生长点的同时不影响冰晶熔点的现象,热滞活性可作为抗冻活性强弱的定量指标^[16]。图 1 为抗冻肽 Pv-AFP 1、Pv-AFP 2 和牛血清蛋白(BSA)的 DSC 温度热流图和 THA。Pv-AFP 1、Pv-AFP 2 的放热峰均较 BSA 出现了明显延迟,经计算其

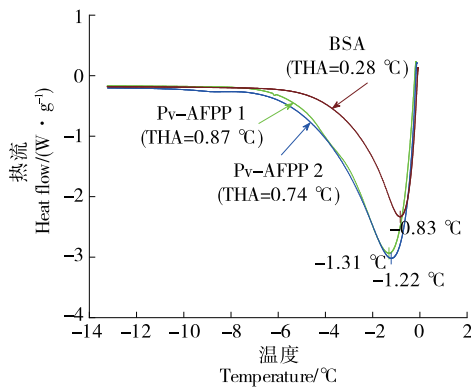


图 1 两条抗冻肽的 DSC 曲线和热滞活性
Figure 1 DSC heat flow curves and thermal hysteresis activities of the two antifreeze peptides

表 1 两条抗冻肽的基本参数比较

Table 1 Comparison of the primary preferences of the two antifreeze peptides

多肽	长度	相对分子质量	等电点	疏水氨基酸数	碱性氨基酸数	酸性氨基酸数	总平均亲水性
Pv-AFP 1	16	1 738	9.7	8	3	1	-0.21
Pv-AFP 2	11	1 235	8.6	5	2	1	-0.71

GRAVY)为-0.21,而 Pv-AFP 2 含有 5 个疏水性氨基酸,GRAVY 为-0.71;GRAVY 负值越大表示亲水性越好,正值越大表示疏水性越强,说明两条抗冻肽的亲疏水性比较平衡,Pv-AFP 1 的两亲性相对更佳。Hudait 等^[19]研究表明,两亲性结构可以促进抗冻肽与水分子结合从而在其抗冻活性发挥中具有重要作用。此外,Pv-AFP 1 含有总共 4 个带电氨基酸(酸性和碱性氨基酸),较 Pv-AFP 2 多 1 个赖氨酸,前期研究^[11]表明带电氨基酸具有优先与自由水相互结合的能力,能通过热滞活性影响抗冻作用。

预测的两条抗冻肽的三维结构见图 2。由图 2 可见 Pv-AFP 1 倾向于形成高度有序的 α -螺旋结构,而尽管 Pv-AFP 2 仅比 Pv-AFP 1 少 5 个氨基酸,但其形成的 α -螺旋很短,更倾向于折叠成无规卷曲状;二级结构分析表明 Pv-AFP 1 和 Pv-AFP 2 中 α -螺旋结构分别约占 68%和 36%,

THA 分别为 0.87,0.74 °C。Maddalena 等^[17]指出低浓度抗冻肽的 THA 大于 0.6 °C 则属于高抗冻活性,因此 Pv-AFP 1 和 Pv-AFP 2 均可被归类为高活性抗冻肽。Majura 等^[18]研究表明,抗冻肽的热滞活性与相对分子质量和疏水性氨基酸含量之间存在一定的联系。Pv-AFP 1 的抗冻活性优于 Pv-AFP 2,可能与其相对分子质量、亲疏水氨基酸比例及空间构象等有关^[17]。

2.2 基本参数和结构比较

从表 1 可以看出,抗冻肽 Pv-AFP 1、Pv-AFP 2 分别由 16,11 个氨基酸组成,其理论相对分子质量、等电点分别为 1 738、pH 9.7 和 1 235、pH 8.6;Pv-AFP 1 完全包含 Pv-AFP 2 的肽序,其中 Pv-AFP 1 含有 8 个疏水性氨基酸,总平均亲水性(grand average of hydropathicity,

其余为无规卷曲。Sicheri 等^[20]报道了两亲性、 α -螺旋结构是鱼类 I 型抗冻蛋白的重要特征,因此,Pv-AFP 1 的 THA 优于 Pv-AFP 2 可能与其更容易形成两亲性 α -螺旋结构有关。

2.3 与水分子的相互作用

抗冻肽的抗冻活性与其结合水分子的能力相关^[19]。为探究两条抗冻肽的作用机制,通过分子动力学模拟了其与水分子相互作用的过程。结果(图 3)表明,Pv-AFP 1 可与周围 53 个水分子结合,共形成了 55 个氢键,其中形成氢键较多的位点主要为赖氨酸(K1,10 个;K9,6 个;K14,5 个)、天冬氨酸(D4,6 个)、天冬酰胺(N7,4 个)和甘氨酸(G16,7 个);而 Pv-AFP 2 可与周围 44 个水分子结合,共形成了 50 个氢键,形成氢键较多的位点主要为赖氨酸(K1,10 个;K9,5 个)、天冬氨酸(D4,8 个)、天冬酰胺(N7,10 个)和苯丙氨酸(F11,7 个)。总体而言,两条肽均

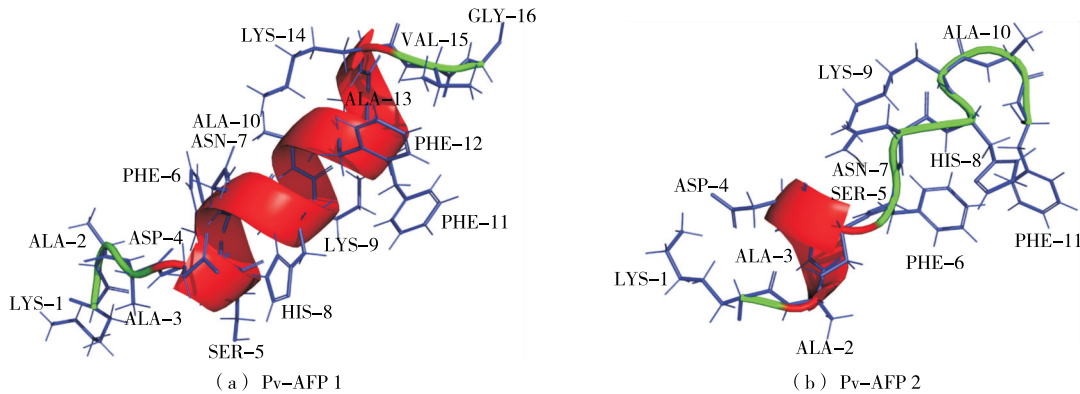


图 2 两条抗冻肽的空间结构
Figure 2 The predicted structures of two antifreeze peptides

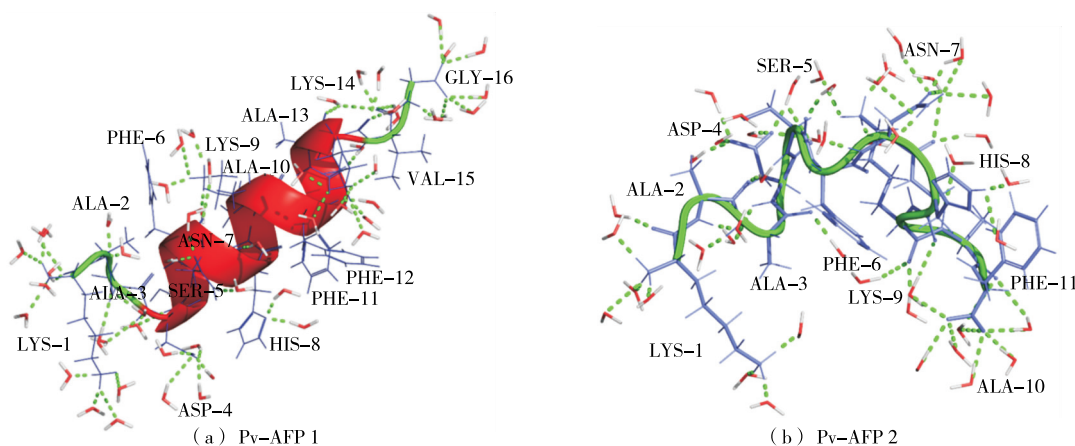


图 3 两条抗冻肽与水分子相互作用的分子动力学模拟结果

Figure 3 Molecular dynamics simulations of the two antifreeze peptides interacting with water molecules

可结合较多的水分子,表明其对水分子有较高的亲和力,从而能通过吸附水分子减少冻结过程中冰晶的形成,这也可能是其具有较高热滞活性的原因。由于序列上 Pv-AFP 2 是 Pv-AFP 1 的一部分,两者相同氨基酸位点与水分子的相互作用模式大致相同,但 Pv-AFP 2 的 N7 和 D4 位置形成的氢键数量比 Pv-AFP 1 多,可能与 Pv-AFP 2 在此处失去螺旋结构有关。

此外,在模拟与水分子相互作用过程中,Pv-AFP 1 能较好维持初始构象[图 2(a)],而 Pv-AFP 2 的短螺旋结构[图 2(b)]展开并慢慢散失,然后在水分子的作用下收缩,氨基酸侧链向分子内部聚拢,呈一定的球形。说明 Pv-AFP 1 在水环境中的构象更加稳定,均方根偏差(root mean square deviations,RMSD)(图 4)和回旋半径(radius of gyration,Rg)(图 4)的变化^[21]也证实了这一点。RMSD 为多肽分子骨架位置与初始位置的偏差,是判断多肽在模拟过程中构象稳定性的指标;模拟过程中两条抗冻肽的 RMSD 值均增大,但 Pv-AFP 2 的 RMSD 变化幅度明显更大。Rg 为多肽上原子质量与重心的关系,能表征分子结构的膨胀和收缩程度;在模拟过程中 Pv-AFP 1 的 Rg 变化率

仅为 0.71%(由初始的 0.801 nm 增大到 0.806 nm),而 Pv-AFP 2 的 Rg 变化率为 5.47%(由初始的 0.695 nm 减小到 0.657 nm)。典型抗冻蛋白的结构通常为富含丙氨酸的 α -螺旋结构或 β 片层折叠成的 β -螺旋结构^[22],周艳霞等^[23]研究也表明螺旋长度的增加能显著增强抗冻活性。因此,Pv-AFP 1 相比 Pv-AFP 2 能与更多的水分子结合,同时在水环境下能保持稳定的 α -螺旋构象,可能是其热滞活性优于 Pv-AFP 2 的重要原因。

2.4 与冰晶表面的相互作用

抗冻肽能通过“吸附—抑制”机制^[13]影响冰晶生长及重结晶,从而发挥低温保护作用。为更好地理解两条鲢鱼小清蛋白源抗冻肽作用机制,通过分子动力学模拟进一步探究了真空条件下肽与冰晶的相互作用,经过 100 ps 的 NVT 模拟后抗冻肽在冰晶表面的构象如图 5 所示。模拟过程中,两条抗冻肽的构象均会慢慢在冰面展开,并通过氢键吸附于冰晶表面。其中 Pv-AFP 1 通过组氨酸(H8,9 个氢键)、赖氨酸(K1,1 个氢键;K9,1 个氢键)、丙氨酸(A10,1 个氢键;A13,1 个氢键)、苯丙氨酸(F12,2 个氢键)和天冬氨酸(D4,1 个氢键)残基参与形成 16 个氢键

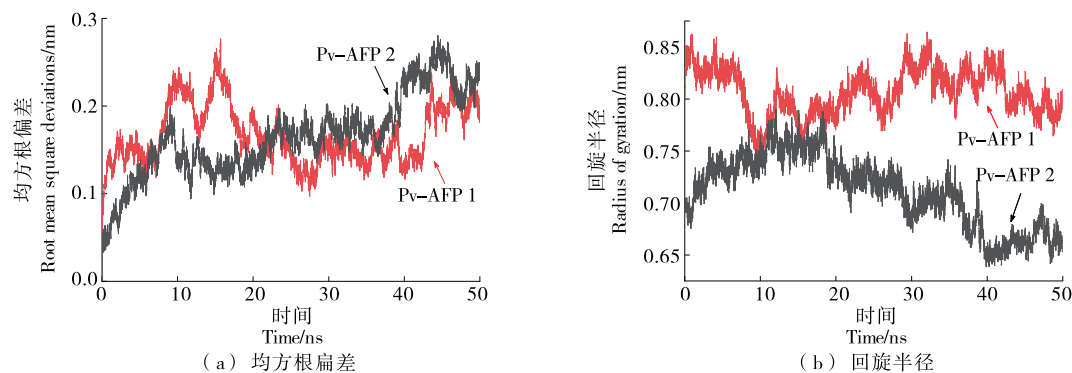


图 4 两条抗冻肽与水分子相互作用过程中均方根偏差和回旋半径变化

Figure 4 Changes in the root mean square deviations and radius of gyration of the two antifreeze peptides during their interactions with water molecules

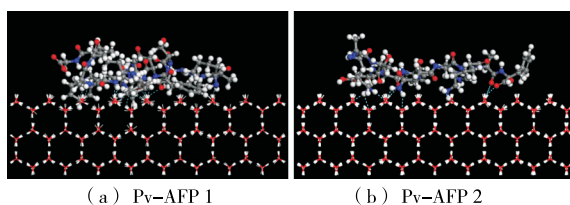


图5 两条抗冻肽结合至冰晶表面的分子动力学模拟结果

Figure 5 Molecular dynamics simulations of the two antifreeze peptides binding to ice surface

与冰晶表面结合,与 Cui 等^[11]的结果有所差异,可能是因使用了不同冰晶模型和模拟方法;而 Pv-AFP 2 则通过赖氨酸(K1,3 个氢键;K9,2 个氢键)、天冬酰胺(N7,2 个氢键)、丙氨酸(A10,2 个氢键)、苯丙氨酸(F11,1 个氢键)和丝氨酸(S5,1 个氢键)残基参与形成 11 个氢键与冰晶表面结合,与 Pv-AFP 1 结合到冰晶的模式有一定差异。

通过计算总能量,Pv-AFP 1、Pv-AFP 2 与冰表面的结合能分别为 $-1\,514$ 、 -805 kJ/mol,表明两条抗冻肽与冰晶表面的相互作用为放热反应,能直接结合到冰表面,从而破坏冰核中水分子的有序结构^[24],进而抑制冰晶的形成和生长。此外,Pv-AFP 1 结合能的绝对值更大,意味着 Pv-AFP 1 能更紧密地与冰面结合,与 Pv-AFP 1 有着更高的热滞活性一致。

2.5 抗冻肽在冰/水环境中作用的分子动力学模拟

为了探究抗冻肽对水结冰过程的影响机制,进一步模拟了两条抗冻肽与冰/水界面体系相互作用过程。模拟过程中,体系总氢键数量越多表明体系中形成的冰晶越多、冻结速率越快。从图 6 可见,在前 150 ns,氢键数量持续增加,表明游离水分子逐渐通过氢键结合到冰面;此后,不含抗冻肽的体系氢键数量达到平衡,意味着水分子全部结冰。然而,含抗冻肽的体系中总氢键数量在 100 ns 处增长放缓,氢键数量达到平衡的时间更长且氢键总数更少,表明抗冻肽能延缓水结冰速度^[25],抑制冰晶的生

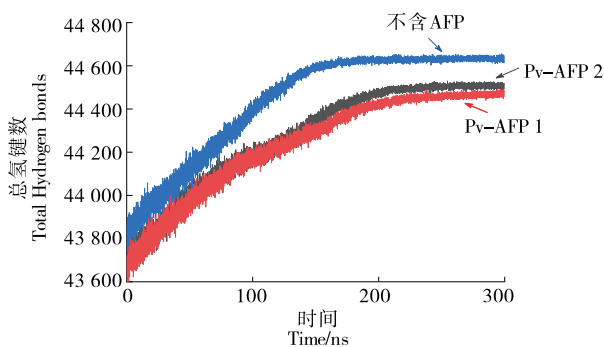
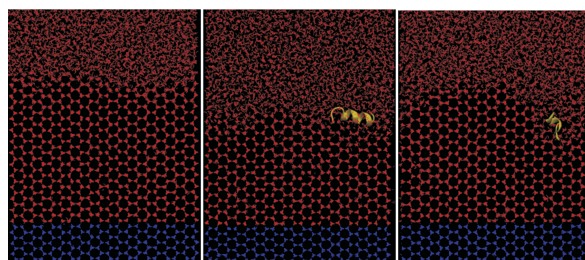


图6 两条抗冻肽与冰/水界面相互作用过程中体系总氢键数变化

Figure 6 Changes in total hydrogen bonds in the system during two antifreeze peptides interacting with ice/water interface

长;从图 7 可以观察到,含有抗冻肽的体系中冰晶显著少于纯水体系,且在加入 Pv-AFP 1 的体系中表现更明显,与其热滞活性的结果一致。Kim 等^[26]发现添加短肽能抑制体系冰晶生长,与试验结果吻合。

如图 7 所示,在不含抗冻肽的混合体系中,上层大部分水分子变为有序的冰晶结构,而含有抗冻肽的体系中明显更多的水分子仍保持无序状态,表明其冰层生长的速度较慢,可能是因为两条抗冻肽均能与生长的冰面相互作用,从而改变了冰面的曲率,通过吉布斯-汤姆逊效应^[27]抑制了水的结冰。与 Pv-AFP 2 相比,Pv-AFP 1 抑制结冰的效果更明显,这也与其热滞活性大的结果一致。进一步分析表明,在模拟过程中,Pv-AFP 1 主要通过丙氨酸(A10)、苯丙氨酸(F11)、缬氨酸(V15)和甘氨酸(G16)等与冰/水界面相互作用,而 Pv-AFP 2 其主要作用的位点为天冬酰胺(N7)的侧链。因此,两条抗冻肽发挥抗冻作用的机制不尽相同,Pv-AFP 2 不仅能吸附到冰晶表面抑制其进一步生长,还能通过疏水作用阻止周围的水分子靠近冰面^[28],从而表现出更好的抗冻效果。



(a) 不含抗冻肽 (b) 含Pv-AFP 1 (c) 含Pv-AFP 2

图7 两条抗冻肽与冰/水界面相互作用的分子动力学模拟结果

Figure 7 Molecular dynamics simulations of the two antifreeze peptides interacting with ice/water interface

3 结论

研究对比分析了两条代表性鲢鱼小清蛋白源抗冻肽的活性、结构特征及作用机制。Pv-AFP 1 (KAADSFNHNKAFKVG) 和 Pv-AFP 2 (KAADSFNHNKAF) 两条肽均为高活性抗冻肽,Pv-AFP 1 主要呈 α -螺旋结构,两亲性好,能结合 53 个水分子,由 16 个氢键吸附至冰晶表面,结合能为 $-1\,514$ kJ/mol,同时部分疏水性氨基酸参与排开冰表面的水分子从而阻止冰晶形成和长大;相较而言,Pv-AFP 2 螺旋结构短,在溶液中螺旋结构易失去,可结合水分子的数量、吸附至冰晶表面的结合能及抑制冰层生长的效率均低于 Pv-AFP 1,与其热滞活性低于 Pv-AFP 1 吻合。结果表明,尽管两条抗冻肽的序列相似,但作用机制不尽相同,其活性可能与 α -螺旋结构、两亲性及其与水分子和冰晶相互作用的亲和力、结合位点和模式有关。

参考文献

- [1] 陆益钊, 杜章申, 马骏骅, 等. 汤圆粉团混料设计及抗冻性优化[J]. 食品与机械, 2022, 38(10): 201-209.
LU Y B, DU T S, MA J H, et al. Study on mixing design and freezing resistance optimization of glutinous rice balls[J]. Food & Machinery, 2023, 38(10): 201-209.
- [2] 忻晨, 周锐丽, 龚方圆. 改良剂对冷冻面团品质影响的研究进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(3): 217-225.
XIN C, ZHOU R L, GONG F Y. Research progress on the effect of different improvers on the quality of frozen dough[J]. Food & Machinery, 2023, 39(3): 217-225.
- [3] CHEN X, WU J H, CAI X X, et al. Production, structure-function relationships, mechanisms, and applications of antifreeze peptides[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(1): 542-562.
- [4] 陈旭, 蔡茜茜, 汪少芸, 等. 抗冻肽的研究进展及其在食品工业的应用前景[J]. 食品科学, 2019, 40(17): 331-337.
CHEN X, CAI X X, WANG S Y, et al. Recent progress and application prospects of antifreeze peptides in food industry[J]. Food Science, 2019, 40(17): 331-337.
- [5] 汪少芸, 赵立娜, 周焱富, 等. 食源性明胶多肽的制备、分离及其抗冻活性[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 135-139.
WANG S Y, ZHAO L L, ZHOU Y F, et al. Preparation and isolation of food-origin gelatin peptide and ice crystal inhibition[J]. Food Science, 2013, 34(9): 135-139.
- [6] YANG F J, JIANG W T, CHEN X, et al. Identification of novel antifreeze peptides from *Takifugu obscurus* skin and molecular mechanism in inhibiting ice crystal growth[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(44): 14 148-14 156.
- [7] ZHU K, ZHENG Z X, DAI Z Y. Identification of antifreeze peptides in shrimp byproducts autolysate using peptidomics and bioinformatics[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132568.
- [8] DANG M Z, WANG R F, JIA Y Y, et al. The Antifreeze and cryoprotective activities of a novel antifreeze peptide from *Ctenopharyngodon idella* scales[J]. Foods, 2022, 11: 1 830.
- [9] 吴金鸿, 杨丹璐, 周密, 等. 抗冻蛋白与冰—水界面层相互作用的理论机制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 244-252.
WU J H, YANG D L, ZHOU M, et al. Advances in understanding the theoretical mechanism of the interaction between antifreeze proteins and ice-water interface layer[J]. Food Science, 2021, 42(11): 244-252.
- [10] SMITH E J, HAYMET A D J. Molecular dynamics simulations of an antifreeze protein at the lipid/water interface[J]. Journal of Molecular Liquids, 2023, 390(B): 123050.
- [11] CUI M L, LI J L, LI J, et al. Screening and characterization of a novel antifreeze peptide from silver carp muscle hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134480.
- [12] VAN D S D, LINDAHL E, BERK H, et al. GROMACS: Fast, flexible, and free[J]. Journal of Computational Chemistry, 2005, 26(16): 1 701-1 718.
- [13] WU J H, RONG Y Z, WANG Z W, et al. Isolation and characterisation of sericin antifreeze peptides and molecular dynamics modelling of their ice-binding interaction[J]. Food Chemistry, 2015, 174(5): 621-629.
- [14] KUIPER M J, MORTON C J, ABRAHAM S E, et al. The biological function of an insect antifreeze protein simulated by molecular dynamics[J]. eLife, 2015, 4: e05142.
- [15] 刘晓霞. 抗冻蛋白与冰晶不同晶面吸附结合的分子动力学模拟[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2021: 33.
LIU X X. Molecular dynamics simulation for the adsorption and combination of antifreeze protein and ice crystal on different crystal planes[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2021: 33.
- [16] DING X L, ZHANG H, WANG L, et al. Effect of barley antifreeze protein on thermal properties and water state of dough during freezing and freeze-thaw cycles[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 47: 32-40.
- [17] MADDALENA B G, WEIKUSAT I, BESIR H, et al. Characterization of an antifreeze protein from the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus* and its relevance in sea ice[J]. Cryobiology, 2011, 63(3): 210-219.
- [18] MAJURA J J, HAN M, OUYANG J J, et al. The antifreeze activity and physicochemical properties of *Litopenaeus vannamei* head autolysate[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2023, 58(11): 6 131-6 142.
- [19] HUDAIT A, QIU Y Q, ODENDAHL N, et al. Hydrogen-bonding and hydrophobic groups contribute equally to the binding of hyperactive antifreeze and ice-nucleating proteins to ice[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(19): 7 887-7 898.
- [20] SICHERI F, YANG D S. Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder[J]. Nature, 1995, 375(6 530): 427-431.
- [21] CHEN Z S, WU Y D, HAO J H, et al. Molecular dynamic simulation of the porcine pancreatic lipase in non-aqueous organic solvents[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 676.
- [22] SHTUKENBERG A G, WARD M D, KAHR B. Crystal growth with macromolecular additives[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(24): 14 042-14 090.
- [23] 周艳霞, 谭宏伟, 杨作银, 等. 两种昆虫抗冻蛋白抗冻活性差异的分子基础[J]. 中国科学 B 辑(化学), 2006(6): 516-521.
ZHOU Y X, TANG H W, YANG Z Y, et al. Molecular basis for the difference in antifreeze activity between two insect antifreeze proteins[J]. Scientia Sinica (Chimica), 2006(6): 516-521.
- [24] 刘铭利, 白顺杰, 邱亮, 等. 虾壳源多肽酶解条件的优化及其抗冻活性和作用机制的探究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(3): 59-68.
LIU M L, BAI S J, QIU L, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for shrimp shell-derived peptides and investigation of their antifreeze activity and mechanism[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(3): 59-68.

(下转第 58 页)

3 结论

研究利用还原氨化反应将乳制品中的母乳寡糖进行荧光标记,用适用于分离不同类型糖链的糖谱色谱柱经液相色谱进行了分离分析,外标法定量。结果表明,该方法的精密度和回收率均满足试验检测的要求,可用于批量测定乳制品中 6 种母乳寡糖含量。鉴于目前母乳寡糖合成的特殊性及其在乳制品中缺乏的市场现状,针对不同年龄段的婴幼儿健康状况,开发出不同类型、有参考价值的产品需进一步研究。

参考文献

- [1] ZIVKOVIE A M, GERMAN J B, LEBRILIA C B, et al. Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota[J]. Pnas, 2011, 108(S1): 4 653-4 658.
- [2] BODE L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama[J]. Glycobiology, 2012, 22: 1 147-1 162.
- [3] EIDELMAN A I. Breastfeeding and the use of human milk[J]. Pediatrics, 2012, 129(3): E827-E841.
- [4] ANDERSON J W, JOHNSTONE B M, REMLEY D T. Breast-feeding and cognitive development: A meta-analysis[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1999, 70(4): 525-535.
- [5] VICTORA C G, BAHL R, BARROS A J D, et al. Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect[J]. Lancet, 2016, 387: 475-490.
- [6] DUIJTS L, JADDOE V W V, HOFMAN A, et al. Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy[J]. Pediatrics, 2010, 126(1): E18-E25.
- [7] ROLLINS N C, NDIRANGU J, BLAND R M, et al. Exclusive breastfeeding, diarrhoeal morbidity and all-cause mortality in infants of HIV-infected and HIV uninfected mothers: An intervention cohort study in Kwazulu Natal, South Africa[J]. PLoS One, 2013, 8(12): 10.
- [8] 逯莹莹, 刘鹏, 孙景珠, 等. 母乳低聚糖的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(12): 23-28, 33.
- LU Y Y, LIU P, SUN J Z, et al. Research progress of human milk oligosaccharides[J]. China Dairy Industry, 2018, 46(12): 23-28, 33.
- [9] 刘甜甜, 徐显皓, 孔晓, 等. 酿酒酵母代谢调控合成功能营养品: 进展与挑战[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(8): 10-21.
- LIU T T, XU X H, KONG X, et al. Metabolic regulation and synthesis of functional nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*: Progress and challenges [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(8): 10-21.
- [10] 姜毅康, 董玲, 刘鸿飞, 等. 母乳低聚糖与婴幼儿健康关系研究进展[J]. 食品与机械, 2024, 40(2): 1-8.
- JIANG Y K, DONG L, LIU H F, et al. Research advances on the association between human milk oligosaccharides and infant health [J]. Food & Machinery, 2024, 40(2): 1-8.
- [11] 揭良, 苏米亚, 贾宏信, 等. 母乳寡糖的研究进展[J]. 食品工业, 2020, 41(10): 258-261.
- JIE L, SU M Y, JIA H X, et al. Recent progress in research of human milk oligosaccharides[J]. The Food Industry, 2020, 41(10): 258-261.
- [12] THURL S, HENKER J, SIEGEL M, et al. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides[J]. Glycoconjugate Journal, 1997, 14(7): 795-799.
- [13] 韩瑶, 吕志华, 姜廷福, 等. 电喷雾多级串联质谱技术区分人乳寡糖异构体[J]. 分析化学, 2006, 34(9): 1 213-1 218.
- HAN Y, LU Z H, JIANG T F, et al. Application of electrospray ionization-collision induced dissociation-tandem mass spectrometry in differentiation isomers of human milk oligosaccharides[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(9): 1 213-1 218.
- [14] RUHAAK L R. Advances in analysis of human milk oligosaccharides[J]. Advances in Nutrition, 2012, 3(3): 406S-414S.
- [15] 陈坚, 邓洁莹, 李江华, 等. 母乳寡糖的生物合成研究进展[J]. 中国食品学报, 2016, 16(11): 1-8.
- CHEN J, DENG J Y, LI J H, et al. Advances in biosynthesis of breast milk oligosaccharides[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(11): 1-8.
- [16] 李晨晨, 李梦丽, 张涛. 人乳寡糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(9): 284-292.
- LI C C, LI M L, ZHANG T. Research progress of human milk oligosaccharides[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(9): 284-292.
- [17] RUHAAK L R, STEENVOORDEN E, KOELEMEN C A M, et al. 2-Picoline-borane: A non-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination [J]. Proteomics, 2010, 10(12): 2 330-2 336.
- [18] DALPATHADO D S, JIANG H, KATER M A, et al. Reductive amination of carbohydrates using $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 381(6): 1 130.
- Chemistry A, 2009, 113(16): 4 403-4 407.
- [25] 余璐涵, 陈旭, 蔡茜茜, 等. 鱼糜蛋白冷冻变性规律及调控方法研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(8): 1-8.
- YU L H, CHEN X, CAI X X, et al. Research progress of change rules in freezing denaturation of surimi protein and its regulatory methods[J]. Food & Machinery, 2020, 36(8): 1-8.
- [26] KIM J S, DAMODARAN S, YETHIRAJ A. Retardation of ice crystallization by short peptides [J]. The Journal of Physical Chemistry A, 2009, 113(16): 4 403-4 407.
- [27] XIANG H, YANG X H, KE L, et al. The properties, biotechnologies, and applications of antifreeze proteins [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 153: 661-675.
- [28] KHAN N M M U, ARAI T, TSUDA S, et al. Characterization of microbial antifreeze protein with intermediate activity suggests that a bound-water network is essential for hyperactivity [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 5 971-5 971.

(上接第 12 页)