

热稳定冰结构蛋白对小麦淀粉凝胶冻融稳定性的影响

贾春利¹, 黄卫宁^{1,*}, 邹奇波², 甘小红³, Patricia RAYAS-DUARTE⁴

(1.江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2.张家港福临门大家庭食品有限公司, 江苏 张家港 215632; 3.深圳市金谷园实业发展有限公司, 广州 深圳 518048; 4.俄克拉荷马州立大学农产品与食品研究中心, 美国 斯蒂尔沃特 74078-6055)

摘 要: 研究燕麦粉和女贞叶中热稳定冰结构蛋白(TSISP)对淀粉凝胶冻融稳定性的影响。应用差示扫描量热仪(DSC)、扫描电子显微镜(SEM)和质构仪分别研究燕麦粉、女贞叶 TSISP 对淀粉凝胶冻融后析水率、可冻结水含量、超微结构、硬度及弹性的影响。结果表明: 冻融过程显著地增加淀粉凝胶析水率、可冻结水含量, 严重地破坏淀粉凝胶超微结构、增加孔洞尺寸、减小孔洞均匀性, 最后导致淀粉凝胶硬度明显增大, 弹性明显减小; 而燕麦粉和女贞叶中 TSISP 的添加显著地减小淀粉凝胶冻融后析水率和可冻结水含量, 同时显著地改善淀粉凝胶超微结构, 使得淀粉凝胶孔洞增大幅度明显得到抑制, 孔洞均匀性更好, 结果也对淀粉凝胶质构产生明显的改善效果, 延缓硬度的增加和弹性的减小, 使得冻融后淀粉凝胶的总体品质得以提高。

关键词: 小麦淀粉凝胶; 冻融稳定性; 热稳定冰结构蛋白; 可冻结水; 超微结构; 质构

Influence of Thermalstable Ice-Structuring Proteins Extracted from Oat Flour and Chinese Privet Leaves on Freeze-Thaw Stability of Wheat Starch Gels

JIA Chun-li¹, HUANG Wei-ning^{1,*}, ZOU Qi-bo², GAN Xiao-hong³, Patricia RAYAS-DUARTE⁴

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Fortune Bakery Co. Ltd., Zhangjiagang 215632, China; 3. Shenzhen Jingyuan Industry Development Co. Ltd., Shenzhen 518048, China; 4. Food and Agricultural Products Research Center, Oklahoma State University, Stillwater 74078-6055, USA)

Abstract: The effect of thermostable ice-structuring proteins extracted from oat flour and Chinese Privet (*Ligustrum vulgare*) leaves separately added at 0.5% on the freeze-thaw stability of wheat starch gels was investigated. The syneresis, freezable water content, microstructure and texture of starch gels after going through different freeze-thaw cycles were analyzed using centrifugation, differential scanning calorimetry, scanning electron microscopy and texture analyzer, respectively. The results showed that as freeze-thaw process happened repeatedly, the syneresis and freezable water content of starch gels increased obviously, the microstructure was damaged seriously, ice cell cavities became larger and uneven, the hardness increased markedly, and the springiness decreased significantly. The introduction of TSISP extracted from oat flour and Chinese Privet (*Ligustrum vulgare*) leaves into wheat starch gels improved the freeze-thaw stability, which was indicated by a significant decrease in syneresis, freezable water content, the size of ice cell cavities and springiness and an increase in hardness.

Key words: wheat starch gels; freeze-thawing cycles; thermalstable ice-structuring protein; freezable water; microstructure; texture

中图分类号: TS201.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0083-05

收稿日期: 2011-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071595); 广东省教育部产学研结合项目(2010B090400292; 2011B090400592);

美国农业部国际合作项目(A-86269); 农业科技成果转化资金项目(2009GB23600520; 2011GB2C100017)

作者简介: 贾春利(1977—), 女, 工程师, 博士研究生, 研究方向为食品烘焙与发酵技术。

E-mail: chljjia@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 黄卫宁(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品烘焙与发酵技术。E-mail: wnhuang@jiangnan.edu.cn

淀粉作为食品中的一种多功能性成分,已在多种食品中得到广泛应用,如在布丁、酱汁及低脂食品中^[1]。然而,冻藏过程中冰晶的形成和增长,使得淀粉凝胶发生了相分离,解冻后形成淀粉富集区和淀粉匮乏区,随冻融循环增加,这种相分离程度逐渐增长,使得淀粉富集区内支链淀粉回生加剧^[2]。因此,解冻过程中析水现象发生了,水分从密集的网络析出^[3]。这导致食品质构及终产品质量的恶化^[4]。

冻融稳定性可以用来衡量淀粉承受冷冻和解冻过程引起的负面物理变化的能力。淀粉凝胶冻融稳定性的研究虽然较多,但是,这些研究大多数集中于如何修饰淀粉的物理特性或者使用添加剂(如胶体、蔗糖和氯化钠)控制水分活性^[4-10]。而 Li Lingling 等^[11]经过研究发现低温诱导冬小麦草冰结构蛋白(ice-structuring protein, ISP)显著提高了玉米和小麦淀粉凝胶的冻融稳定性,ISP通过抑制冰晶重结晶显著地减小了冻融后淀粉凝胶的析水率、冰晶熔化焓和硬度,这一研究为提高淀粉冻融稳定性开辟了新途径。

冰结构蛋白(ISP)也称为抗冻蛋白,可以保护机体免受冰晶伤害,减少低温环境导致的机体死亡^[12]。这类蛋白质具有热滞活性(thermal hysteresis activity, THA)(非依数性地降低溶液的冰点而不改变溶液熔点)和冰晶重结晶抑制作用(吸附在冰晶表面,通过吸附-抑制机理抑制冰晶增长)^[13-14]。大多数 ISP 都具有较低的热稳定性^[15-16],因此,开发新型热稳定性冰结构蛋白(thermal stable ice-structuring protein, TSISP)将对食品和生化行业中热加工工艺大有裨益^[17]。然而,关于 TSISP 的研究及应用却报道得极少,尤其是提取自植物的更少^[17-19]。

本实验探讨提取自燕麦粉及女贞叶的 TSISP 对小麦淀粉凝胶冻融稳定性的影响,具体体现在对淀粉凝胶析水率、可冻结水含量、微观结构、老化率及质构的影响,以期在淀粉在冷冻食品中的应用提供保障。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦淀粉 美国 Sigma-Aldrich 公司。

热稳定冰结构蛋白(TSISP):提取自燕麦粉和女贞叶,经差示扫描量热仪(DSC)测定,燕麦粉和女贞叶 TSISP 的最大热滞活性(THA)分别为 0.21℃ 和 0.27℃,测定方法参照 Hansen 等^[20]方法。

1.2 仪器与设备

TDL-5 离心机 上海安亭科学仪器厂;PYRIS 差示扫描量热仪(DSC) 美国 Perkin Elmer 公司;QUANTA-200 扫描电子显微镜 日本明石公司;TA-XT2i 质构仪 英国 Stable Micro Systems 公司。

1.3 方法

1.3.1 小麦淀粉凝胶的制备、冷冻及解冻

将小麦淀粉(含 0% TSISP、0.5% 燕麦粉 TSISP 或 0.5% 女贞叶 TSISP, TSISP 添加量基于淀粉质量添加)与水混合(淀粉干质量分数 8%),玻璃棒轻轻搅拌至混匀,置于 90℃ 水浴 25min,同时温和地搅拌,将热糊取出,于室温条件下冷却 1h。将冷却后的淀粉凝胶转移至 -18℃ 冰箱中冻藏 5d,于室温条件下解冻 2h,此为 1 次冻融循环,实验分别进行 0、1、3、5 次冻融循环,其中未经冻融循环样品冷却 2h 后测定。

1.3.2 淀粉凝胶析水率测定

经过 0、1、3、5 次冻融循环后,将装有淀粉凝胶的试管于 5000r/min 离心 15min,通过称量分离出水的质量计算析水率^[7]。

$$\text{析水率}/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (1)$$

式中: m_1 为析出水质量; m_2 为离心前淀粉凝胶质量。

1.3.3 淀粉凝胶热力学特性分析

取适量淀粉凝胶,放入 DSC 盘中,封盖后再按照 1.3.1 节所述进行冻融循环,应用 DSC 研究可冻结水含量。DSC 测试程序为:降温至 -20℃,维持 5min,再以 10℃/min 的速率升温至 90℃,测定淀粉凝胶体系冰晶熔化焓(ΔH_{ice})、淀粉老化焓(ΔH_{ret})。根据淀粉老化焓值计算淀粉凝胶老化率。

$$\text{老化率}/\% = \frac{\Delta H_{ret}}{\Delta H_{gel}} \times 100 \quad (2)$$

式中: ΔH_{ret} 为冻融循环后淀粉老化焓/(J/g); ΔH_{gel} 为淀粉糊化焓/(J/g)。

1.3.4 淀粉凝胶超微结构观察

将冻融后的淀粉凝胶切割,从中心部分取长方形片状,先用体积分数 2.5% 戊二醛进行固定,隔夜之后进行第 1 次漂洗,漂洗液 0.1mol/L 磷酸缓冲液,漂洗后再用体积分数 1% 四氧化二锇进行第 2 次固定,待样品充分吸收试剂后用 0.1mol/L 磷酸缓冲液冲洗,即第 2 次漂洗。然后室温条件下分别在体积分数 50%、70%、90%、100% 乙醇梯度脱水,用醋酸异戊酯置换出乙醇后,采用临界点干燥法进行干燥。经离子溅射喷金后,置于 500 倍扫描电镜(SEM)下观察样品超微结构,加速电压为 15kV^[21]。

1.3.5 淀粉凝胶质构分析

采用质构仪测定。淀粉凝胶的制备与 1.3.1 节中描述方法相同,加 75mL 淀粉糊置于 200mL 塑料烧杯中冷冻和冻藏,其中未冻融淀粉凝胶在冷却 2h 后进行测定。参数设定:探头类型为 50mm 圆柱探头,测试前速度 1mm/s,测试速度 1mm/s,测试后探头回程速度 10mm/s,

触发力 5g, 探头压缩部位为胶体的中心部位, 压缩至样品原高度的 40%。每组样品平行测定 3 次后取平均值^[22]。

1.4 数据处理

所有数据为 3 次平行测量的平均值, 运用 SAS 软件进行方差分析(ANOVA)和最小显著差异分析(LSD), 显著差异水平取 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 TSISP 对小麦淀粉凝胶冰晶熔化焓的影响

结合水和自由水(可冻结水)是水分子的两种存在状态^[23]。可冻结水含量影响淀粉凝胶的质量, 可冻结水含量少说明体系形成的冰晶量少, 反之说明冻藏过程中形成的冰晶量多, 而冰晶是冻藏过程中淀粉凝胶网络结构遭到破坏的主要原因, 因而冻藏过程中淀粉凝胶体系中可冻结水含量的多少对淀粉凝胶结构至关重要。前人研究^[24-25]结果显示可冻结水含量可以由 DSC 测得的冰晶熔化焓 ΔH 成功体现, 二者成正相关。

表 1 TSISP 对冻融小麦淀粉凝胶体系冰晶熔化焓 ΔH 的影响

Table 1 Effect of TSISP on ice melting enthalpy of wheat starch gel subjected to freeze-thaw cycles

冻融循环次数	冰晶熔化焓 ΔH /(J/g)		
	空白	0.5% 燕麦粉 TSISP	0.5% 女贞叶 TSISP
0	163.78 ^a	142.77 ^f	130.34 ^k
1	205.17 ^b	200.71 ^g	189.99 ^l
3	289.41 ^c	265.29 ^h	236.94 ^m
5	307.50 ^d	289.04 ⁱ	241.93 ⁿ

注: 同列字母不同, 表示受冻融循环影响显著($P < 0.05$); 同行字母不同, 表示受 TSISP 类别影响显著($P < 0.05$)。下同。

由表 1 可知, 所有淀粉凝胶样品经过冻融循环后, ΔH 随着冻融循环次数增多而逐渐增大, 说明冻融循环后, 淀粉凝胶体系中可冻结水含量显著增多了, 即更多的水分子随着冻融循环进行从淀粉凝胶网络结构中析出。经过同样的冻融循环后, 引入 TSISP 淀粉凝胶样品冰晶熔化焓 ΔH 显著小于空白样品(不含任何冰结构(ISP)的样品), 这可能是因为 TSISP 在范德华力、疏水相互作用和氢键作用下吸附到淀粉凝胶体系中冰核表面, 抑制冰核生长即抑制冰晶重结晶, 减小了冰晶对淀粉凝胶网络结构的破坏, 抑制了水分子从淀粉凝胶网络结构中离析出来。且引入女贞叶 TSISP 较燕麦粉 TSISP 减少淀粉凝胶体系可冻结水含量效果好。

2.2 TSISP 对小麦淀粉凝胶析水率的影响

由表 2 可知, 随着冻融循环次数增加, 3 个淀粉凝胶样品析水率均逐渐增大, 其中以引入女贞叶 TSISP 淀粉凝胶析水率最小, 而空白样品的析水率最大。空白

淀粉凝胶析水率范围为 15.6%~42.5%, 而含燕麦粉 TSISP 淀粉凝胶析水率范围为 13.3%~37.3%, 含女贞叶淀粉凝胶析水率范围为 11.9%~35.7%, 经过 5 次冻融循环后, 女贞叶 TSISP 较空白淀粉凝胶析水率减小 6.8%, 燕麦粉 TSISP 较空白淀粉凝胶析水率减小 5.2%, 说明随着冻融循环的进行, 淀粉凝胶网络结构中析出越来越多的水分子。而燕麦粉和女贞叶 TSISP 的引入, 显著地阻止了淀粉凝胶体系中水分子的析出, 而其中女贞叶 TSISP 效果明显更好, 这可能与 TSISP 来源不同导致的结构不同引起的。这一结果与上述冰晶融化焓研究结果基本吻合, 说明冻融循环导致了淀粉凝胶体系中水分子不断析出, 可冻结水含量增加, 而 TSISP 的添加有效地阻止了析水率的增加。

表 2 TSISP 对冻融循环淀粉凝胶析水率的影响

Table 2 Effect of TSISP on syneresis of wheat starch gel subjected to freeze-thaw cycles

冻融循环次数	析水率/%		
	空白	0.5% 燕麦粉 TSISP	0.5% 女贞叶 TSISP
0	15.6 ^a	13.3 ^c	11.9 ⁱ
1	27.9 ^b	23.8 ^f	21.1 ^j
3	39.2 ^c	35.9 ^g	33.2 ^k
5	42.5 ^d	37.3 ^h	35.7 ^m

2.3 TSISP 对小麦淀粉凝胶老化焓及老化率的影响

表 3 TSISP 对冻融小麦淀粉凝胶老化焓值(ΔH_{ret})和老化率的影响

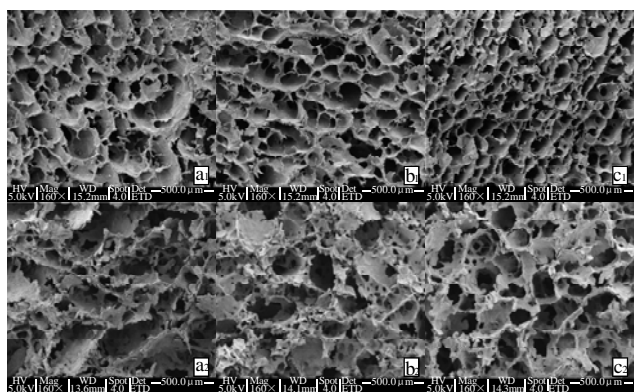
Table 3 Effect of TSISP on ice retrogradation enthalpy and rate of wheat starch gel subjected to freeze-thaw cycles

冻融循环次数	ΔH_{ret} /(J/g)			老化率/%		
	空白	0.5% 燕麦粉 TSISP	0.5% 女贞叶 TSISP	空白	0.5% 燕麦粉 TSISP	0.5% 女贞叶 TSISP
1	2.04 ^a	0.6 ^c	0.54 ⁱ	10.99 ^a	5.46 ^c	5.29 ⁱ
3	4.69 ^b	2.06 ^f	1.80 ^j	25.27 ^b	18.74 ^f	17.62 ^j
5	5.83 ^c	3.22 ^g	2.79 ^k	31.41 ^c	29.30 ^g	27.31 ^k

DSC 测定后发现, 空白、含燕麦粉 TSISP 和含女贞叶 TSISP 淀粉凝胶样品的糊化焓分别为 18.56、10.99J/g 和 10.21J/g。冻融后淀粉凝胶老化焓和老化率如表 3 所示。分析发现, 未经过冻融循环淀粉凝胶糊化焓值较冻融循环后老化焓值大, 说明冻融过程中只有部分支链淀粉分子发生重结晶。而随着冻融循环次数增多, 所有淀粉凝胶样品的老化焓值均逐渐增大, 引入 TSISP 后淀粉凝胶老化焓值明显有所减小, 其中以女贞叶 TSISP 减小幅度更为显著。淀粉凝胶的老化率也随着冻融循环次数增加而逐渐增大, 而含 TSISP 样品的老化率明显减小, 且含女贞叶 TSISP 老化率减小幅度相对较大。这

些结果说明, 冻融循环使得淀粉凝胶老化程度加深, 淀粉分子的重新结晶, 导致与淀粉分子结合的部分水分子析出, 印证了上述析水率结果。而 TSISP 的引入, 延缓了淀粉分子的老化, 即延缓了淀粉分子的重新结晶, 故而也减少了析出的水分子, 同样印证上述结果。这些结果可能与 TSISP 抑制冰晶重结晶相关, 而燕麦粉和女贞叶 TSISP 效果不同可能与不同来源导致的不同结构有关。

2.4 TSISP 对小麦淀粉凝胶超微结构的影响



a₁、a₂. 空白淀粉凝胶; b₁、b₂. 含 0.5% 燕麦粉 TSISP 淀粉凝胶; c₁、c₂. 含 0.5% 女贞叶 TSISP 淀粉凝胶。

图 1 TSISP 对冻融循环 1 次(a₁、b₁和 c₁)和 5 次(a₂、b₂和 c₂)后淀粉凝胶超微结构的影响(×160)

Fig.1 Effect of TSISP on microstructure of wheat starch gel subjected to 1 (a₁, b₁, c₁) and 5 (a₂, b₂, c₂) freeze-thaw cycles

由图 1 可知, 经过 1 次冻融循环后, 淀粉凝胶网络结构中孔洞分布比较均匀, 孔洞较小, 孔壁几乎无小孔出现, 其中空白淀粉凝胶体系孔洞最不均匀, 大空洞最多, 尺寸最大, 而含女贞叶 TSISP 淀粉凝胶孔洞尺寸最小最均匀, 孔壁完好。经过 5 次冻融循环后, 3 个淀粉凝胶样品孔洞尺寸都明显增大, 均匀性变差, 孔壁出现很多小孔, 受破坏程度明显加深, 其中空白淀粉凝胶样品中出现大的椭圆形孔洞, 可能是几个小孔洞孔壁破坏合并而成, 而含燕麦粉和女贞叶 TSISP 淀粉凝胶孔洞增加幅度相对较小, 孔壁受破坏程度也明显较小, 其中含女贞叶 TSISP 的淀粉凝胶孔洞尺寸最小最均匀, 孔壁遭到破坏程度也最小。这些结果说明在冻融循环过程中, 淀粉凝胶体系中可能形成大的冰晶体, 对淀粉凝胶网络结构造成破坏, 而燕麦粉和女贞叶 TSISP 却对这一破坏有显著抑制作用, 且女贞叶 TSISP 效果明显更好。

2.5 TSISP 对小麦淀粉凝胶质构的影响

由表 4 可知, 3 个淀粉凝胶样品的硬度均随着冻融循环次数增加而显著增大, 而弹性却显著减小, TSISP

的引入显著的延缓了这一趋势, 使得淀粉凝胶硬度增大和弹性减小的趋势得到明显延缓, 其中女贞叶 TSISP 作用效果好于燕麦 TSISP 的作用效果, 这一结果可能与上述研究中冻融循环加速淀粉凝胶老化, TSISP 延缓淀粉凝胶老化有关, 即 TSISP 通过抑制淀粉凝胶体系中冰晶形成和重结晶, 减少冰晶对淀粉凝胶超微结构的破坏及淀粉凝胶中水分子的析出, 减小了淀粉凝胶的老化速率, 改善了质构, 这一研究与 Li Lingling 等^[11]的研究结果基本一致。燕麦粉与女贞叶 TSISP 作用效果差异可能与它们来源不同结构不同有关。

表 4 TSISP 对冷冻小麦淀粉凝胶质构的影响

Table 4 Effect of TSISP on texture of wheat starch gel subjected to freeze-thaw cycles

冻融循环次数	空白		0.5% 燕麦粉 TSISP		0.5% 女贞叶 TSISP	
	硬度/g	弹性/g	硬度/g	弹性/g	硬度/g	弹性/g
1	109.78 ^b	0.98 ^b	41.88 ^f	0.97 ^d	29.14 ⁱ	0.97 ^d
3	409.64 ^c	0.96 ^c	341.11 ^g	0.95 ^e	306.77 ^k	0.94 ^f
5	506.16 ^d	0.96 ^c	440.63 ^h	0.95 ^e	412.35 ^l	0.93 ^g

3 结 论

经过研究燕麦粉、女贞叶 TSISP 对淀粉凝胶冻融稳定性的影响, 结果发现冻融过程显著地增加了淀粉凝胶析水率、可冻结水含量, 严重地破坏了淀粉凝胶超微结构、增加了孔洞尺寸、减小了孔洞均匀性, 最后导致淀粉凝胶硬度明显增大, 弹性明显减小; 而燕麦粉和女贞叶 TSISP 的引入显著地减小了淀粉凝胶冻融后析水率和可冻结水含量, 同时显著地改善了淀粉凝胶超微结构, 使得淀粉凝胶孔洞增大幅度明显得到抑制, 孔洞均匀性更好, 结果也对淀粉凝胶质构产生了明显的改善效果, 即延缓了硬度的增加和弹性的减小, 使得冻融后淀粉凝胶的总体质量得以提高, 为淀粉在冷冻食品中的应用提供了保障。但是, 燕麦粉和女贞叶 TSISP 显示出了不同效果, 这可能与它们来源、结构不同有关, 因而在今后的研究中, 有必要对 TSISP 的构效关系进行深入的研究。

参考文献:

- [1] HERMANSSON A M, SVEGMARK K. Developments in the understanding of starch functionality[J]. Trends in Food Science & Technology, 1996, 7(11): 345-353.
- [2] YUAN R C, THOMPSON D B. Freeze-thaw stability of three waxy maize starch pastes measured by centrifugation and calorimetry[J]. Cereal Chemistry, 1998, 75(4): 571-573.
- [3] KARIM A A, NORZIAH M H, SEOW C C. Methods for the study of starch retrogradation[J]. Food Chemistry, 2000, 71(1): 9-36.
- [4] RAHMAN M S. Food preservation by freezing[M]//RAHMAN M S. Handbook of food preservation. New York: Marcel Dekker, 1999: 259-284.

- [5] BAKER L A, RAYAS-DUARTE P. Freeze-thaw stability of amaranth starch and the effects of salt and sugars[J]. Cereal Chemistry, 1998, 75(3): 301-307.
- [6] TAKEITI C, FAKHOURI F, ORMENESE R, et al. Freeze-thaw stability of gels prepared from starches of nonconventional sources[J]. Starch/Sträke, 2007, 59(3): 156-160.
- [7] ARUNYANART T, CHAROENREIN S. Effect of sucrose on the freeze-thaw stability of rice starch gels: correlation with microstructure and freezable water[J]. Carbohydrate Polymer, 2008, 7(3): 514-518.
- [8] MUADKLAY J, CHAROENREIN S. Effects of hydrocolloids and freezing rates on freeze-thaw stability of tapioca starch gels[J]. Food Hydrocolloid, 2008, 22(7): 1268-1272.
- [9] PONGSAWATMANIT R, SRIJUNTHONGSIRI S. Influence of xanthan gum on rheological properties and freeze-thaw stability of tapioca starch [J]. Journal of Food Engineering, 2008, 88(1): 137-143.
- [10] SAE-KANG V, SUPHANTHARIKA M. Influence of pH and xanthan gum addition on freeze-thaw stability of tapioca starch pastes[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 65(3): 371-380.
- [11] LI Lingling, KIM Y S, HUANG Weining, et al. Effects of ice structuring proteins on freeze-thaw stability of corn and wheat starch gels[J]. Cereal Chemistry, 2010, 87(5): 497-503.
- [12] DEVRIES A L, KOMATSU S K, FEENEY R E. Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes [J]. Journal of Biological Chemistry, 1970, 245(11): 2901-2908.
- [13] DEVRIES A L. Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water[J]. Method Enzymol, 1986, 127(8): 293-302.
- [14] GRIFFITH K V, EWART K V. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods[J]. Biotechnology Advances, 1995, 13(3): 373-402.
- [15] CHENG C H C, DEVRIES A L. Structures of antifreeze peptides from the antarctic eel pout, *Austrolycichthys brachycephalus*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 997(1): 55-64.
- [16] LI X M, HEW C L. Structure and function of an antifreeze polypeptide from ocean pout, *Macrozoarces americanus*: role of glutamic acid residues in protein stability and antifreeze activity by site-directed mutagenesis[J]. Protein Engineering, 1991, 4(8): 1003-1008.
- [17] QIU Liming, MA Ji, WANG Jing, et al. Thermal stability properties of an antifreeze protein from the desert beetle *Microdera punctipennis*[J]. Cryobiology, 2010, 60(2): 192-197.
- [18] PUDNEY P D A, BUCKLEY S L, SIDEBOTTOM C M, et al. The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*)[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003, 410(2): 238-245.
- [19] SIDEBOTTOM C, BUCKLEY S, PUDNEY P, et al. Heat-stable anti-freeze protein from grass[J]. Nature, 2000, 406: 256.
- [20] HANSEN T N, BAUST J G. Differential scanning calorimetric analysis of antifreeze protein activity in the common mealworm, *Tenebrio molitor* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1988, 957(2): 217-221.
- [21] ARUNYANART T, CHAROENREIN S. Effect of sucrose on the freeze-thaw stability of rice starch gels: correlation with microstructure and freezable water[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(3): 514-518.
- [22] WANG Lan, YIN Zihua, WU Jia, et al. A study on freeze-thaw characteristics and microstructure of Chinese water chestnut starch gels[J]. Journal of Food Engineering, 2008, 88(2): 186-192.
- [23] AKON H, TOSHIR L. DSC investigation of the states of water in poly(vinyl alcohol) membranes[J]. Polymer, 1985, 26(8): 1207-1211.
- [24] TOMMI J, LAAKSONEN H Y. Thermal, dynamic-mechanical, and dielectric analysis of phase and state transitions of frozen wheat doughs [J]. Journal of Cereal Science, 2000, 32(3): 281-292.
- [25] PABLO D, ALBERTO E, MARIA C A. Effect of freezing and frozen storage on the gelatinization and retrogradation of amylopectin in dough baked in a differential scanning calorimeter[J]. Food Research International, 2003, 36(4): 357-363.