孙军柯, 吴雨菲, 林欣怡, 等. 基于分子模拟技术的鱼源废弃物抗冻肽筛选与鉴定 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(7): 132−140. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030342
SUN Junke, WU Yufei, LIN Xinyi, et al. Screening and Identification of Antifreeze Peptides from Fish-derived Waste Using Molecular Modeling Technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(7): 132−140. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030342

· 研究与探讨 ·

基于分子模拟技术的鱼源废弃物抗冻肽筛选与鉴定

孙军柯[1], 吴雨菲[1], 林欣怡[1], 汪艳蓉[1], 刘洪艳[1,2,*]
（1.天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457;
2.海洋资源化学与食品技术教育部重点实验室, 天津 300457）

摘　要: 目的：本研究旨在运用分子模拟技术与实验验证相结合的方法，从鱼源废弃物中筛选抗冻肽（antifreeze peptides，AFP），并探究其与冰晶的作用机制。方法：以鳕鱼胶原蛋白为原料，借助模拟酶解技术筛选产生活性肽效率最高的蛋白酶，并利用 Peptide Ranke、CryoProtect、ToxinPred 和 ExPASy 等数据库，对模拟酶解产物进行抗冻肽筛选及理化性质分析，随后采用分子对接和分子动力学模拟探究抗冻肽与冰晶的作用机制。最后，通过固相合成法合成筛选得到的抗冻肽，并运用差示扫描量热法（differential scanning calorimetry，DSC）鉴定抗冻肽 AFP2（AGSSGPGGER）的热滞活性（thermal hysteresis activity，THA）。结果：从模拟酶切 Peptide Cutter 数据库提供的 39 种蛋白酶中，筛选出胰蛋白酶为最适蛋白酶。从胰蛋白酶产生的 103 条肽段中，筛选出 11 条无毒、无过敏性且水溶性良好的抗冻肽。抗冻肽 AFP2 与冰晶的结合能为−130.45 kcal/mol，通过氢键与疏水相互作用与冰晶结合，在结合过程中通过调节自身构象来增强结合的稳定性。抗冻肽 AFP2 展现出较高的抗冻活性，其热滞活性达 0.9 ℃，在冻融循环中仅形成 12.29% 的冰晶。结论：本研究基于分子模拟技术从鱼源胶原蛋白中快速、高效地筛选鉴定出 1 条高活性的抗冻肽，为鱼源废弃物开发抗冻肽提供可行途径，为鱼源废弃物的资源化利用提供理论基础。

关键词: 鱼源废弃物, 模拟酶解, 抗冻肽, 分子对接, 热滞活性
中图分类号: TS254.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)07−0132−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030342
本文网刊:

Screening and Identification of Antifreeze Peptides from Fish-derived Waste Using Molecular Modeling Technology

SUN Junke[1], WU Yufei[1], LIN Xinyi[1], WANG Yanrong[1], LIU Hongyan[1,2,*]
（1.College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
2.Key Laboratory of Marine Resource Chemistry and Food Technology, Tianjin 300457, China）

Abstract: Objective: This study aimed to screen antifreeze peptides (AFP) from fish-derived waste and elucidate their mechanisms of interaction with ice crystals by integrating molecular simulation with experimental validation. Methods: Cod skin collagen was used as the substrate. Simulated enzymatic hydrolysis was employed to identify proteases with optimal bioactive peptide yield. The hydrolysates were analyzed using Peptide Ranker, CryoProtect, ToxinPred and ExPASy databases to evaluate antifreeze potential and physicochemical properties. Molecular docking and dynamics simulations were employed to characterize AFP-ice binding mechanisms. Finally, the screened antifreeze peptides were synthesized using solid-phase synthesis, and differential scanning calorimetry (DSC) was applied to identify the thermal hysteresis activity (THA) of antifreeze peptide AFP2 (AGSSGPGGER). Results: Trypsin demonstrated the highest efficiency among

收稿日期: 2025−03−28
基金项目: 国家自然科学基金（42306106）; 国家级大学生训练创新计划（202410057145）。
作者简介: 孙军柯（2000−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物技术, E-mail: junkesun@163.com。
*** 通信作者:** 刘洪艳（1977−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 海洋生物技术, E-mail: hongyanliu1214@163.com。

39 proteases screened via the Peptide Cutter database. Eleven non-toxic, non-allergenic, and good water solubility AFPs were identified from 103 peptides. The binding energy between antifreeze peptide AFP2 and ice crystals was −130.45 kcal/mol. AFP2 bound to ice crystals and dynamically adjusted its conformation during the binding process to enhance the interaction stability via hydrogen bonding and hydrophobic interactions. Antifreeze peptide AFP2 exhibited high antifreeze activity, with thermal hysteresis activity of 0.9 ℃ and only 12.29% ice crystal formation during freeze-thaw cycles. Conclusion: This study efficiently screened and identified a highly active antifreeze peptide from fish-derived collagen using molecular simulation technology, providing a feasible approach for developing antifreeze peptides from fish waste and a theoretical foundation for the resource utilization of fish-derived byproducts.

Key words: fish-derived waste; simulated enzymatic hydrolysis; antifreeze peptides; molecular docking; thermal hysteresis activity

我国是全球渔业资源最丰富的国家之一，同时也是世界水产加工大国。2023 年，我国水产品总产量为 7116.17 万吨，其中养殖产量达 5809.61 万吨，鱼类养殖产量尤为突出，达 2977.30 万吨[1]。在鱼类加工过程中，会产生大量副产物，如鱼鳞、鱼皮和鱼骨等，其质量约占鱼体总质量的 30%~60%[2]。这些副产物的蛋白质含量丰富，可达其干重的 49.22%~57.92%[3]。然而，这些副产物大多未经合理处理便被废弃，形成大量的鱼源废弃物，带来了渔业资源的浪费和环境污染问题[4]。因此，鱼源废弃物的资源化利用是推动渔业产业可持续发展的有效突破口。

冷冻储存是保证食品品质的传统方法，但在冷冻过程中，食品中的冰晶形成、脂质氧化和蛋白质变性等问题难以避免，导致食品劣变[5]。为了维持冷冻贮藏过程中食品品质的稳定，商业上常采用添加抗冻剂的方法。常见的抗冻剂（如多聚磷酸盐类、糖类和醇类等）存在影响人体健康和食品风味的潜在风险[6−7]。因此，开发新型、安全且高效的抗冻剂已成为食品工业行业的迫切需求。抗冻肽（antifreeze peptides, AFP）是一类具有抗冻活性的蛋白质水解物，能够有效降低冰晶损伤导致的不良影响，减少冷冻对食品天然组织结构和性质的破坏，被视为优质的抗冻剂[8−9]，其具有来源广、副作用低、安全性高等特点[10]。鱼源废弃物因其丰富的蛋白质资源，为抗冻肽的规模化生产提供了可持续的原料基础，同时可实现渔业加工产生的废弃物的资源化利用。

酶解法是制备抗冻肽的常用方法，通常涉及酶解、分离、纯化、鉴定及活性验证等一系列复杂步骤，存在实验过程繁琐、周期长且成本高的问题[11]。随着蛋白质和多肽数据库、生物活性预测工具以及分子对接软件等生物信息学工具的涌现[12]，基于分子模拟技术的活性肽制备方法，因具有高通量筛选能力、减少实验的盲目性、节约研究时间和成本的特点，受到了研究者的青睐。彭莉娟等[13] 应用计算机模拟酶解指导蛋白质定向酶解，从模拟酶切软件 PeptideCutter 提供的 39 种蛋白酶中筛选出胰蛋白酶为最适用酶，并利用胰蛋白酶成功获得了具有高活性的 ACE 抑制肽，证实了计算机模拟酶解在减少筛选水解用酶盲目性方面的有效性。Wu 等[14] 借助蛋白质数据库利用模拟酶解和分子对接技术，从构建的含有 363 个肽段组成的鲍鱼源肽库中，鉴定出 10 个对 Keap1-Nrf2 相互作用具有最强抑制作用的鲍鱼衍生肽，并通过细胞实验与分子对接结果确定 DEDEDEDK 为最活跃的抗氧化肽，证明了通过分子模拟技术筛选活性肽的低成本和高效性。Xuan 等[15] 通过计算机模拟酶解、分子对接和分子动力学方法从 529 个寡肽中，成功筛选到 9 种新型抗氧化肽和抗炎肽（ARRF 和 ARNF），并揭示了它们与 TLR4 和 Keap1 受体的结合模式。鉴于计算机分子模拟技术具备缩短研发周期与降低成本的显著优势，本文借助模拟酶解、生物信息学筛选、分子对接和分子动力学模拟等技术手段，实现了鱼源废弃物开发活性肽潜力的快速评估。

本研究基于计算机的分子模拟技术，以鱼源胶原蛋白为研究对象，首先采用模拟酶解获得鱼源多肽，并结合 Peptide Ranke、CryoProtect、ToxinPred 和 ExPASy 等数据库筛选抗冻肽，随后，借助分子对接和分子动力学模拟技术探究抗冻肽与冰晶的作用机制，最后通过差示扫描量热法（differential scanning calorimetry, DSC）测定合成抗冻肽的热滞活性（thermal hysteresis activity, THA），以期为新型抗冻肽的开发提供理论参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

肽段 AGSSGPGGER（纯度≥95%）　上海科肽生物科技有限公司合成；牛血清蛋白（bovine serum albumin, BSA）　北京索莱宝科技有限公司。

AL204 电子天平　上海梅特勒-托利多仪器有限公司；DSC3500 Sirius 差示扫描量热仪　德国耐驰 NETZSCH。

1.2　实验方法

1.2.1　计算机辅助挖掘鱼源活性肽　从 UniProt 蛋白质数据库（https://www.uniprot.org/）中获取鳕鱼胶原蛋白（A0A8C5CNN6）的氨基酸序列信息，随后借助 ExPASy_PeptideCutter 平台（https://web.expasy.org/peptide_cutter/）中提供的 39 种酶对其进行模拟酶解[16]，依据式（1）计算各酶的理论水解度。选取水解度位居前七的酶，分别将所得的肽段在 Peptide

Ranker(http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/)数据库中进行生物活性预测[17]。

$$A(\%) = \frac{a}{N} \times 100 \quad \text{式（1）}$$

式中：A表示蛋白酶的理论水解度；a表示蛋白质序列中模拟酶解后所得的片段数量；N表示蛋白质中氨基酸残基的数量。

1.2.2 抗冻肽的筛选及性质预测 使用抗冻蛋白/抗冻多肽数据库 CryoProtect(http://codes.bio/cryoprotect/)筛选抗冻肽[18]，通过 ToxinPred 数据库(http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/)预测抗冻肽的毒性[19]，AllerTOP V.2.0 数据库(https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/index.html/)预测抗冻肽的致敏性[20]，Innovagen 数据库(http://www.innovagen.com/)预测抗冻肽的水溶性[21]。最后，通过 BIOPEP-UWM 数据库(https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep/start_biopep.php/)将上述筛选后的肽段与数据库中已被报道的生物活性肽进行比对，筛选出未报道过的肽段用于后续研究。在 ExPASy_protparam 数据库(http://web.expasy.org/protparam/)分析抗冻肽的理化性质(等电点、净电荷、疏水性和稳定性)[22]。

1.2.3 分子对接 从 Materials Project 数据库(https://legacy.materialsproject.org/)获取冰晶的 PDB 格式结构模型(ID:mp-703459, DOI:10.1557/mrc.2019.94)，选择 Ice Ih 型冰晶结构作为受体。使用 Discovery Studio 2019 软件构建选定抗冻肽片段的三维模型：通过“Build and Edit Protein”模块构建初始肽段结构，再经“Minimize and Refine Protein”模块进行“Full Minimization”完全能量最小化，获得能量最优化的抗冻肽结构作为配体。将 Ice Ih 冰晶结构作为受体，以 PDB 文件格式导入 HEX 8.0.0 软件；将优化后的抗冻肽结构作为配体导入。在 HEX 中，以受体为中心定义尺寸为 10×10×10 Å的对接盒子进行分子对接[23]。对接结果使用 Lig-Plot+软件分析相互作用二维(2D)图，使用 PyMOL 2.2.0 软件分析并可视化三维(3D)结构图。

1.2.4 分子动力学模拟 参照 Wu 等[24]方法稍作修改。在分子动力学模拟中，首先基于 TIP4P 模型引入虚原子的 OPLS-AA 力场参数构建冰相力场，将目标多肽置于冰面上方 1 nm 处，通过 Packmol 程序以 TIP4P 水分子对体系进行溶剂化处理，最终构建形成尺寸为 6 nm×5 nm×7 nm 的周期性盒子。模拟过程基于 Gromacs-2024.4 软件执行，所有模拟均施加周期性边界条件以维持粒子数恒定。系统构建完成后，先进行 50000 步能量最小化，继而对能量最小化后的体系开展 100 ps 的 NVT 系综平衡。非键相互作用的截断距离设定为 12 Å，长程静电力采用粒子网格 Ewald(PME)算法进行计算。通过 V-rescale，维持体系温度为 253 K(耦合常数 0.2 ps)；压强控制采用 C-rescale 算法，保持体系压强为 1 bar。采用 Lincs 算法对氢键进行约束，设置时间步长为 2 fs，最终对模型系统进行 50 ns 的分子动力学模拟。

1.2.5 抗冻肽的固相合成 由上海科肽生物科技有限公司采用固相合成法，合成抗冻肽 AFP2(AGSSGPGGER)，并采用高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)和质谱(mass spectrometry, MS)对合成肽进行纯度检测及相对分子质量检测，要求合成肽段的纯度>95%。

1.2.6 热滞活性测定 利用差示扫描量热法鉴定合成肽段的 THA，参照韩梅等[7]方法稍作修改。上样量为 10 μL，用去离子水配制 20 mg/mL 的 BSA 溶液(对照组)和抗冻肽 AFP2 溶液。以 2 ℃/min 的速度从室温降至−20 ℃，再以相同的速率升至 20 ℃，以确定熔点(T_m)。以 2 ℃/min 的速率降低到−20 ℃ 保持 2 min，再以 2 ℃/min 的速率上升到保留温度(T_h)，保持 2 min 使其处于熔融态，后以 2 ℃/min 的速率降温到−20 ℃。使用 Proteus 热分析软件计算样品的熔化焓(ΔH_m)、结晶开始温度(T_0)和放热焓(ΔH_f)，THA 与样品中冰的含量(φ)计算公式如下：

$$THA = T_h - T_0 \quad \text{式（2）}$$

$$\varphi(\%) = 1 - \frac{\Delta H_f}{\Delta H_m} \times 100 \quad \text{式（3）}$$

式中：T_h表示保留温度，℃；T_0表示结晶开始温度，℃；ΔH_f表示样品放热焓，J/g；ΔH_m表示样品熔化焓，J/g。

1.3 数据处理

采用 PyMOL 2.2.0、Lig-Plot+软件对分子对接结果进行作图，Origin 2021、Proteus 软件对热滞活性结果进行作图和数据分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的筛选

模拟酶解是一种通过计算机模拟技术来预测蛋白质或肽段在特定酶作用下水解产物的方法[25]。本研究借助在线数据库 ExPASy Peptide Cutter 内收录的 39 种酶，对鳕鱼胶原蛋白进行模拟酶解，并通过 Peptide Ranker 数据库预测水解产物中的生物活性肽。统计分析发现，蛋白酶 K、胃蛋白酶(pH>2)、胃蛋白酶(pH1.3)、Asp-N 内肽酶、胰蛋白酶、低特异性糜蛋白酶和嗜热菌蛋白酶这 7 种蛋白酶的理论水解度分别为 32.90%、9.6%、7.62%、8.58%、7.67%、8.68% 和 17.89%。这些蛋白酶具有较高的水解效率，均产生了不少于 100 条肽段。其中，蛋白酶 K 酶解产生 228 种肽段，共 432 条，是产生肽段数量最多的蛋白酶。嗜热菌蛋白酶次之，产生 162 种肽段，共计 236 条。其余五种酶产生的肽段数量在 100~126 条范围内，它们平均产生了 116 条肽段。

生物活性肽是一类由蛋白质水解产生的多肽，其长度通常介于 2 至 20 个氨基酸之间[26]。Peptide Ranker 分数能够反映肽段具有生物活性的可能性，

当肽段的 Peptide Ranker 分数高于 0.4 时，则通常被认为具有生物活性[17]。依据肽段长度指标（长度介于 2~20 个氨基酸的肽段占肽段的比例）、Peptide Ranker 评分指标（肽段 Peptide Ranker 分数高于 0.4 的肽段占肽段的比例）以及活性肽比例指标（同时符合上述两种指标的肽段占总肽段的比例），对不同蛋白酶的酶解产物进行分析，筛选出最佳蛋白酶。具体结果如图 1 所示。

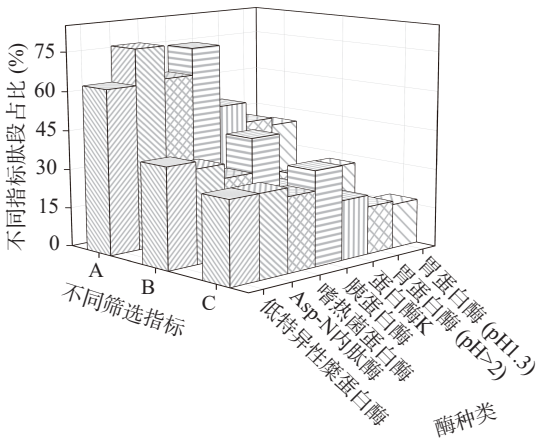


图 1　模拟酶解肽段统计

Fig.1　Peptides from virtual enzymatic hydrolysis

注: A: 肽段长度指标; B: Peptide Ranker 评分指标; C: 活性肽比例指标。

由图 1 可知，在 7 种蛋白酶的模拟酶解产物中，Asp-N 内肽酶产生的肽段中有 76.92% 的肽段长度为 2~20 个氨基酸，它是产生该长度肽段效率最高的酶。胰蛋白酶与之相当，2~20 个氨基酸肽段的比例为 74.76%。基于 Peptide Ranker 得分（>0.4），胰蛋白酶产生高于 0.4 阈值的肽段比例最高，占总肽段数的 43.69%。综合肽段长度和 Peptide Ranker 得分（>0.4）指标，胰蛋白酶产生活性肽的比例最高，达 35.92%。然而，其它 6 种酶的酶解产物中活性肽平均比例为 24.99%，胰蛋白酶较它们的平均值高出 10.93%。这表明胰蛋白酶在生物活性肽的挖掘方面具有显著的优势。徐嘉欣等[27] 的研究表明，采用 6 种不同蛋白酶酶解珍珠层制备抗氧化肽，胰蛋白酶酶解制得的酶解液 DPPH 自由基清除率显著高于其他酶解液（P<0.05）。Lin 等[28] 对 14 种蛋白酶的模拟酶解产物进行神经保护活性预测，发现胰蛋白酶是产生神经保护肽百分比最高（85.29%）的蛋白酶。Wang 等[29] 使用胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味酶和中性酶对太平洋鲱鱼进行水解，发现胰蛋白酶产生的水解产物表现出最高的细胞抗氧化活性（49.21%），并从中鉴定出两条具有显著抗氧化活性的肽段，分别为 LHDELT 和 KEEKFE。

2.2　抗冻肽的筛选

虚拟筛选是一种快速、可靠、高效的生物活性肽筛选方法[30]。本研究借助抗冻蛋白/抗冻多肽 CryoProtect 数据库可以通过肽段的序列，预测肽段是否属于抗冻肽的特点。从胰蛋白酶模拟酶解产生的 37 条活性肽中筛选出 31 条抗冻肽。随后，对 31 条抗冻肽分别进行毒性、过敏性及水溶性预测，以期获得安全性、适用性和功能性上均表现良好的抗冻肽，筛选结果见表 1。

表 1　抗冻肽的毒性、过敏性和水溶性预测结果

Table 1　Predicted toxicity, allergenicity and water solubility of antifreeze peptides

肽段序列	毒性	过敏性	水溶性	氨基酸个数	分子量（Da）
GNR	无毒	非致敏	好	3	345.36
GDR	无毒	非致敏	好	3	346.34
MFR	无毒	非致敏	好	3	452.57
NPAR	无毒	非致敏	好	4	456.50
GGPGER	无毒	非致敏	好	6	571.59
SPDGTR	无毒	非致敏	好	6	631.64
APDPYR	无毒	非致敏	好	6	717.78
AGSSGPGGER	无毒	非致敏	好	10	873.88
GPSGSSGSAGK	无毒	非致敏	好	11	890.91
GMTGSPGSPGPDGK	无毒	非致敏	好	14	1244.34
GMTGPIGPPGSGGAPGDK	无毒	非致敏	好	18	1552.72
GR	无毒	致敏	好	2	231.25
GAR	无毒	致敏	好	3	302.33
GMK	无毒	致敏	好	3	328.37
GHR	无毒	致敏	好	3	368.40
TCR	无毒	致敏	好	3	378.45
GGPGAVGPK	无毒	致敏	好	9	738.84
GPAGIAGAR	无毒	致敏	好	9	768.87
GAAGLPGLK	无毒	非致敏	差	9	782.94
AGPSGAAGAR	无毒	致敏	好	10	813.87
GSSGPQGAR	无毒	致敏	好	9	815.84
GPEGPAGSR	无毒	致敏	好	9	826.86
ADDANVMR	无毒	致敏	好	8	890.97
MCHPDWK	有毒	致敏	好	7	916.08
GETGPAGAAGPAGPSGPR	无毒	致敏	好	18	1196.24
GPPGSQGAGGAPGPK	无毒	致敏	好	15	1234.33
GESGPSGPAGPAGAR	无毒	致敏	好	15	1267.32
GFPGLPGPSGEVGK	无毒	致敏	好	14	1298.46
GPAGPPGATGFPGAAGR	无毒	致敏	差	17	1437.58
DGMSGLPGPSGPSGPR	无毒	致敏	好	16	1468.60
GEGGAAGVQGPPGSAGEEGK	无毒	致敏	好	20	1711.76

利用 ToxinPred 数据库对 31 条抗冻肽进行毒性预测，结果表明，仅 MCHPDWK 肽段被预测出具有毒性，其余 30 条肽段均未显现出毒性。随后，采用 Aller TOP 数据库评估这 31 条抗冻肽进行致敏性预测，结果显示仅存在 12 条肽段无过敏性，可知鳕鱼胶原蛋白经胰蛋白酶酶解后会产生较多致敏性肽段。考虑到多肽的水溶性是其在机体内转运分布的基础，是应用食品、生物及材料化学研究时的重要指标[31]，并对这些肽段进行了水溶性测定，Innovagen 数据库的预测结果显示，29 条肽段的水溶性被判定为“好”。最终，获得 11 条兼具无毒、无过敏性及水溶性好的抗冻肽，长度由 3~18 个氨基酸组成，

分子量小于 2000 Da。通过与 BIOPEP-UWM 数据库对比，这些抗冻肽均为未被报道的新型抗冻肽。

2.3　抗冻肽的理化性质分析

基于肽段的氨基酸特征以及净电荷、等电点和亲水性等指标，对上述筛选获得的 11 条抗冻肽进行理化性质分析。如图 2A 所示，抗冻肽的氨基酸特征表现为：N 端首个氨基酸(N1)和 C 端第三位氨基酸(C3)主要由 Gly 组成，占比均达 55%，N 第二位氨基酸(N2)则主要由 27% 的 Pro、18% 的 Asp 和 Gly 占据，C 第二位氨基酸(C2)则主要由 18% 的 Gly 和 Asp 占据。N3 主要由 Arg、Ser、和 Asp 占据，占比分别为 27%、18% 和 18%。C 端首个氨基酸(C1)位置则由 Arg 或 Lys 占据，这是由于 Arg 或 Lys 是胰蛋白酶的切割位点所致。抗冻肽的活性可能与其 N 端和 C 端的 Gly、Asp 和 Arg 等亲水性氨基酸有关，这些氨基酸可与冰晶形成氢键，可使肽段吸附在冰晶上，阻碍冰晶的生长。此外，Pro 和 Ser 等疏水性氨基酸可提供非极性环境，减少水分子的聚集，进一步抑制体系中冰晶的形成[32−33]。

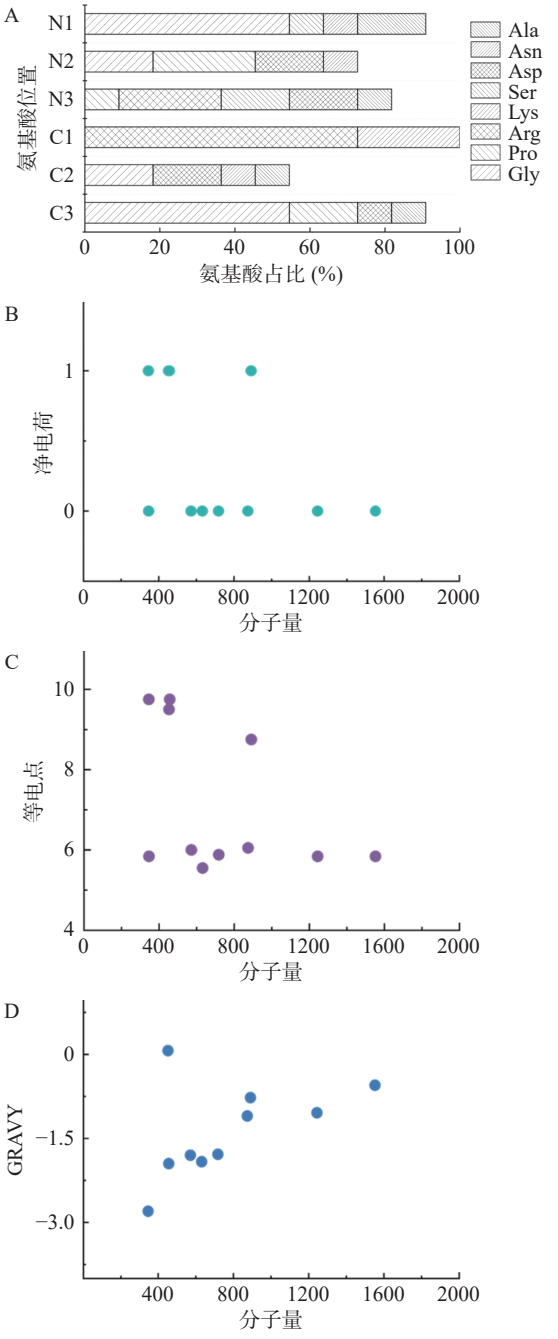


图 2　抗冻肽的理化性质

Fig.2　Physicochemical characterization of antifreeze peptides

注：A：N 端和 C 端氨基酸图谱；B、C、D：抗冻肽的净电荷、等电点、GRAVY 分布。

分析可知，11 条抗冻肽的 N 端和 C 端的氨基酸位置特征符合 Gly-X1-X2(X 代表任意氨基酸)序列结构，该结构对于源自胶原蛋白肽的抗冻活性至关重要[34]。江文婷等[35] 从鱼源胶原蛋白分离出的含有 Gly-X1-X2 序列结构的 GPR 和 GPAGGK 抗冻肽，发现它们能够阻碍蛋白侧链聚集和结构的改变。Wang 等[36] 从鲨鱼胶原蛋白获得含有 Gly-X1-X2 序列结构的抗冻肽，对保加利亚乳杆菌有很好的低温保护活性，冷冻处理后存活率可达 90.28%。

预测抗冻肽肽段的静电荷、等电点和平均亲水性(GRAVY)是解析其结构和功能关系的重要一步。由图 2B 可知，11 条抗冻肽的净电荷为 0 或+1，说明带正电与带负电氨基酸的数量接近。结合图 2C 可知，存在 7 条抗冻肽等电点在 6 附近，4 条抗冻肽大于 8。即抗冻肽等电点大多小于 7，表明其含有较多的酸性氨基酸[37]。而 GRAVY 值作为评估肽段疏水性的重要指标，当数值小于 0 时，可判定肽段为亲水性。如图 2D 所示，在 11 条抗冻肽中，有 10 条属于亲水性肽段，这一结果与 Liu 等[38] 研究结果相似，进一步证实多数抗冻肽具有亲水性特征。

2.4　抗冻肽的分子对接分析

为了评估抗冻肽在外界环境中能否稳定发挥活性，本研究利用 Expasy_protparam 数据库对其稳定性进行了预测[39]。根据该数据库的判定标准，不稳定指数(Instability Index)小于 40 的肽段可被视为稳定的抗冻肽。此外，相关研究表明，含有 6 至 14 个氨基酸的肽段通常被认为是抗冻肽的理想长度[40]。基于上述标准，最终仅有 AFP1(GGPGER)、AFP2(AGSSGPGGER)和 AFP3(GPSGSSGSAGK)3 条抗冻肽被选中，用于后续与冰晶的分子对接研究。结合能(Etotal)可用于评估受体与配体之间复合物的稳定性，较低的结合能值通常表示配体与受体之间的相互作用更为稳定[41]。氢键作为抗冻肽与冰晶结合的主要作用力，特异性地使其吸附在冰晶表面，并通过 Kelvin 效应有效抑制冰晶的生长[42−43]。抗冻肽 AFP1、AFP2 和 AFP3 与冰晶分子的 Etotal 值分别为−124.07、−130.45 和−127.90 kcal/mol，与冰晶分子形成的氢键个数分别是 2、7 和 2 个。这表明，3 条肽段与冰晶的相互作用是放热的，该过程是不可逆的，可以与冰晶之间形成稳定的相互作用。本研究综合结合能和与冰晶形成的氢键数，选择结合能最低和形成氢键最多的抗冻肽 AFP2 与冰晶进行作用机

制分析。抗冻肽 AFP2 所在位置、AFP2 分子模型及与冰晶对接结果见图 3。

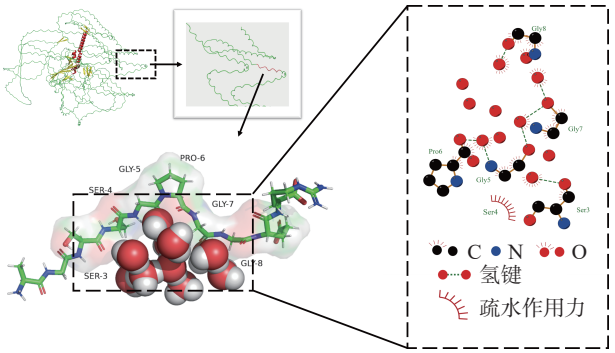


图 3　抗冻肽 AFP2 的空间结构及对接结果

Fig.3　Spatial structure and docking results of the antifreeze peptide AFP2

由图 3 可知，抗冻肽 AFP2 三维结构倾向于折叠成无规则卷曲。抗冻肽 AFP2 通过 Gly、Ser、Pro 多个氨基酸与冰晶形成 7 条氢键，其中 Gly5、7、8 与冰晶形成了 5 条氢键。Yang 等[44] 运用分子对接技术，深入探讨了抗冻肽与冰晶的相互作用机制，发现抗冻肽 EGPRAGGAPG 与冰晶形成的氢键中有一半是由 Gly 贡献的，而抗冻肽 GEAGPAGPAG 与冰晶形成的全部氢键均由 Gly 形成。由此可见，抗冻肽-冰晶体系中氢键主要由 Gly 贡献，Gly 在抗冻肽与冰晶结合中起着重要作用。此外，Ser4 与冰晶之间存在疏水作用力，即抗冻肽 AFP2 还可以通过疏水作用力与冰晶相互作用[45]。李军等[46] 发现抗冻肽（KAADSFNHKAF）吸附到冰晶表面抑制其生长，通过疏水作用阻止周围的水分子靠近冰面，改变冰面的曲率从而抑制了水的结冰。由此可见，抗冻肽 AFP2 通过吸附-抑制机制实现其冷冻保护功能：抗冻肽 AFP2 通过氢键作用吸附于冰晶表面，并借助疏水作用力形成的空间位阻效应阻碍水分子向冰晶界面迁移，从而抑制冰晶的形成与生长，实现高效的抗冻保护作用。

2.5　抗冻肽的动力学模拟分析

本研究运用分子动力学模拟技术，模拟抗冻肽 AFP2 与冰晶的相互作用过程，并通过分析均方根偏差（root mean square deviation，RMSD）和回旋半径（radius of gyration，Rg）探究抗冻肽 AFP2 与冰晶的构象变化和结构的稳定性[47]。结果如图 4 所示。

RMSD 值可衡量分子在动力学模拟过程中，相对于初始结构位置的平均原子位移，进而反映其整体构象的稳定性[48]。图 4A 所示，在 50 ns 模拟过程中，0~10 ns 内 RMSD 值呈快速上升趋势，表明抗冻肽在与冰晶结合时进行了构象调整。随后，在 10~50 ns 内 RMSD 值在 0.60~0.88 nm 范围内波动，表明抗冻肽 AFP2 与冰晶的结合构象趋于动态平衡。RMSD 值先上升后趋于稳定的趋势表明，抗冻肽 AFP2 在与冰晶结合后逐渐达到稳定状态，其构象

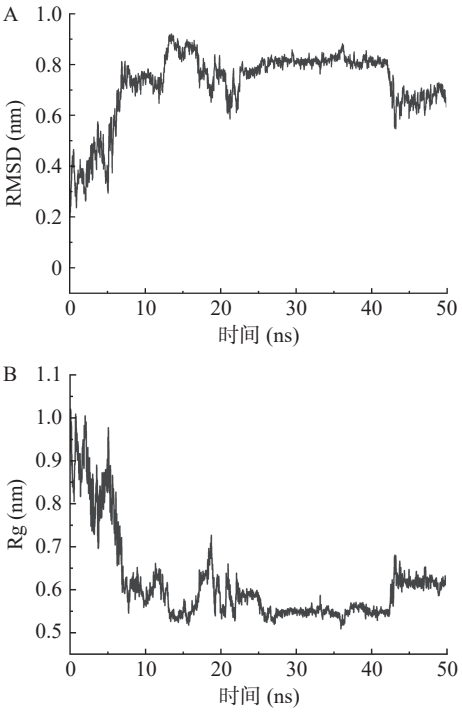


图 4　抗冻肽 AFP2 与冰晶的 RMSD 值（A）和 Rg 值（B）曲线图

Fig.4　RMSD (A) and Rg (B) profiles of the antifreeze peptide AFP2 complexed with the ice crystals

调整主要集中在结合初期，而在结合后期表现出较高的结构稳定性。Rg 是所有原子到分子质心距离的平方平均值的平方根，用于描述分子三维结构紧凑性程度，Rg 值越小，表明分子结构越紧密[49]。由图 4B 可知，在模拟初期 0~10 ns 内，Rg 值由 1.01 nm 快速下降至 0.58 nm，表明抗冻肽 AFP2 在与冰晶的结合过程中，三维结构逐渐收缩。这可能是由于抗冻肽 AFP2 中 Gly、Ser 和 Pro 等残基与冰晶形成稳定的氢键，限制了分子链的伸展，同时疏水性残基向内部聚集，进而降低了 Rg 值。随后在 10~50 ns 内，Rg 值逐渐稳定在 0.60 nm 左右，表明抗冻肽 AFP2 的空间结构折叠紧密，这使其更有利于其在狭小的冰晶缝隙中吸附。

综上所述，通过对 RMSD 和 Rg 的动态分析可知，抗冻肽 AFP2 在与冰晶作用过程中，通过调节自身构象紧凑性以提升与冰晶结合的稳定性，促使其更有效地吸附于冰晶表面。抗冻肽 AFP2 通过这种稳定的吸附，改变周围冰面的曲率，使得局部冰点温度降低，达到抑制冰晶重结晶的目的。

2.6　抗冻肽的质谱表征

随后，对抗冻肽 AFP2（AGSSGPGGER）进行了固相合成，结果见图 5 和图 6。HPLC 图谱显示，主峰尖锐且基线分离良好，峰面积为 95.29%，即合成肽的纯度大于 95%。质谱图显示，双电荷离子峰的质核比为 437.85 Da，即其实际相对分子质量为 873.70 Da，与该肽段的理论分子量 873.88 Da 高度吻合。综上，通过固相合成成功获得高纯度的抗冻肽 AFP2。

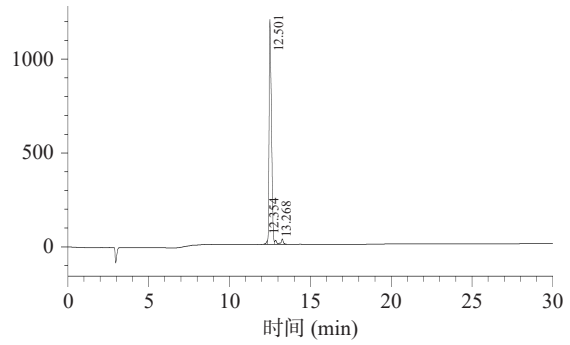


图 5 抗冻肽 AFP2 的 HPLC 图

Fig.5 HPLC graph of antifreeze peptide AFP2

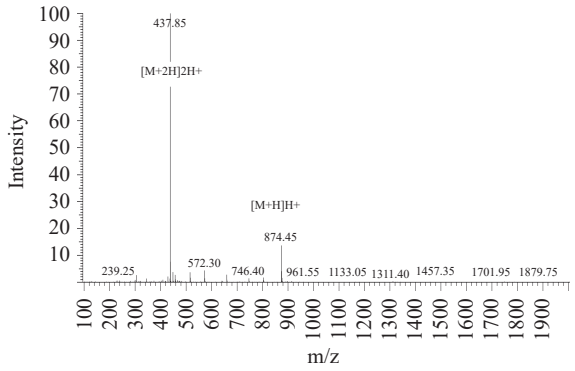


图 6 抗冻肽 AFP2 的质谱图

Fig.6 Mass spectrometry spectrum of antifreeze peptide AFP2

2.7 抗冻肽的抗冻活性鉴定

THA 反映的是抗冻肽在不改变熔点的情况下，显著降低溶液凝固点的能力，可作为评价抗冻肽活性强弱的指标[50]。本研究以 BSA 为对照，采用差示扫描量热法对抗冻肽 AFP2的 THA 及其在冻融过程中冰晶的含量进行分析。

DSC 热流曲线分析显示(图 7)，BSA 和抗冻肽 AFP2 分别在−4.2 ℃ 和−5.4 ℃ 处呈现结晶峰，而抗冻肽 AFP2 表现出更明显的相变温度滞后现象，可知抗冻肽 AFP2 体系的凝固点被延迟，经计算 BSA 的 THA 为 0.2 ℃，而抗冻肽 AFP2 的 THA 达到 0.9 ℃(表 2)。根据抗冻活性特性，抗冻肽的 THA 大于 0.6 ℃ 则具有高抗冻活性[51]，因此抗冻肽 AFP2 可被归类为高活性抗冻肽。此外，抗冻肽 AFP2 仍展现出良好的抑制冰晶生长特性，由表 2 可知，含有抗冻肽

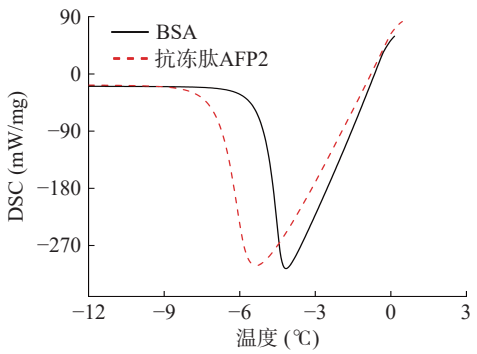


图 7 BSA 和抗冻肽 AFP2 的 DSC 热流曲线

Fig.7 DSC heat curves of BSA and antifreeze peptide AFP2

表 2 抗冻肽 AFP2 热力学特性

Table 2 Thermodynamic characteristics of antifreeze peptide AFP2

样品名	T_h(℃)	T_0(℃)	THA(℃)	ΔH_m(J/g)	ΔH_f(J/g)	φ(%)
BSA	0	−0.2	0.2	31507	−17945	43.04
抗冻肽AFP2	0.3	−0.6	0.9	28707	−5179	12.29

AFP2 的体系中冰晶含量(φ)为 12.29%，仅为 BSA 体系中冰晶含量(43.04%)的 1/3，抗冻肽 AFP2 的体系中的冰晶含量较 BSA 体系中明显偏低。这可能与抗冻肽 AFP2 中 Gly-X1-X2 三肽重复序列有关，三肽重复序列赋予其高柔性分子结构，增强其与冰晶界面的结合能力，从而利于破坏冰核中水分子的有序结构，进而减少冰晶的形成和生长。可知，抗冻肽 AFP2 是一条高活性的抗冻肽，可作为一种优良的抗冻剂。

3 结论

本研究通过计算机辅助模拟酶解鳕鱼胶原蛋白，首先，从模拟 Peptide Cutter 提供的 39 种蛋白酶中确定了胰蛋白酶是产生活性肽最适的蛋白酶。并进一步借助 CryoProtect、Toxin Pred 等多个数据库，从 37 条活性肽中筛选出 11 条无毒、无过敏性且水溶性良好的抗冻肽。接着，基于肽段的稳定性、长度指标及分子对接结果，选择探究抗冻肽 AFP2(AGSSGPGGER)与冰晶的作用机制。分子对接和分子动力学模拟结果显示：抗冻肽 AFP2 主要由 Gly 与冰晶形成氢键，并调整自身构象增强与冰晶结合；利用疏水作用力改变冰面的曲率，降低水的结晶温度，实现抑制冰晶重结晶目的。最后，热滞活性实验证实，抗冻肽 AFP2 THA 达 0.9 ℃，其冻融过程中冰晶含量仅为 12.29%，与无抗冻活性的牛血清蛋白冻融体系相比，冰晶含量减少 30.75%，表明抗冻肽 AFP2 是一条高活性的抗冻肽。综上，本研究利用分子模拟技术从鳕鱼胶原蛋白中成功获得一条抗冻肽，为实现鱼源废弃物高值化利用及天然抗冻剂的开发提供理论依据。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2024 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024. [Bureau of Fisheries Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center. 2024 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024.]

[2] CHALAMAIAH M, KUMAR D B, HEMALATHA R, et al. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review[J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 3020−3038.

[3] TAO Y, PARK J W. Comprehensive review: By-products

from surimi production and better utilization[J]. Food Science and Biotechnology, 2023, 32(14): 1957−1980.
[4] DANIELA C, CHIARA L, FORTUNATO E P, et al. Fish waste: From problem to valuable resource[J]. Marine Drugs, 2021, 19(2): 116.
[5] LIU Z L, YANG W G, WEI H M, et al. The mechanisms and applications of cryoprotectants in aquatic products: An overview[J]. Food Chemistry, 2023, 408: 135202.
[6] SUN Y, ZHANG M, BHANDARI B, et al. Ultrasound treatment of frozen crayfish with chitosan nano-composite water-retaining agent: Influence on cryopreservation and storage qualities[J]. Food Research International, 2019, 126: 108670.
[7] 韩梅, 欧阳及锦, 陈秀娟, 等. 超声辅助虾头自溶制备热滞活性产物的工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(15): 196−204. [HAN M, OUYANG J J, CHEN X J, et al. Research on process of ultrasound-assisted autolysis of shrimp head to prepare active products with thermal hysteresis activity[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(15): 196−204.]
[8] 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, 2020, 20(1): 542−562.
[9] CHEN X, WU J H, LI X Z, et al. Investigation of the cryoprotective mechanism and effect on quality characteristics of surimi during freezing storage by antifreeze peptides[J]. Food Chemistry, 2022, 371: 131054.
[10] CHEN X, 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, 2021, 61(20): 3436−3449.
[11] LEON MADRAZO A, SEGURA CAMPOS M R. *In silico* prediction of peptide variants from chia (*S. hispanica* L.) with antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant potential[J]. Computational Biology and Chemistry, 2022, 98: 107695.
[12] OLSEN T H, YESILTAS B, MARIN F I, et al. AnOxPePred: Using deep learning for the prediction of antioxidative properties of peptides[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 21471.
[13] 彭莉娟, 王伟, 张赛赛, 等. 基于模拟酶切的酪蛋白定向酶解探究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 214−216. [PENG L J, WANG W, ZHANG S S, et al. Study on directed enzymatic preparation from casein based on simulated peptide-cut[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(3): 214−216.]
[14] WU J N, WANG X Y, QIAO K, et al. Screening and antioxidant activities evaluation of peptides from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino)[J]. Food Science & Nutrition, 2025, 13(2): e70028.
[15] XUAN Y X, RUAN H C, LIU H Y, et al. Identification of novel antioxidant and anti-inflammatory peptides from bovine hemoglobin by computer simulation of enzymolysis, molecular docking and molecular dynamics[J]. Current Research in Food Science, 2024, 9: 100931.
[16] 孙晨松, 陈雯祺, 陈盈盈, 等. 基于分子对接虚拟筛选含酪氨酸残基的 ACE 抑制三肽[J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 20−27. [SUN C S, CHEN W Q, CHEN Y Y, et al. Virtual screening of ace inhibitory tripeptides containing tyrosine residues based on molecular docking[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(16): 20−27.]
[17] AHMED S A, EL-BASSIONY T, ELMALT M L, et al. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins[J]. Food Research International, 2015, 74: 80−88.
[18] MA X, WANG W X, SHI H M, et al. Identification of novel antifreeze peptides from yak skin gelatin ultrasound-assisted enzymatic hydrolysate[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2024, 111: 107102.
[19] GUPTA S, KAPOOR P, CHAUDHARY K, et al. *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73957.
[20] DIMITROV I, BANGOV I, FLOWER D R, et al. AllerTOP v. 2-a server for in silico prediction of allergens[J]. Journal of Molecular Modeling, 2014, 20(6): 2278.
[21] 李淼, 冯洁芳, 马钰荣, 等. 黄鸡低聚肽抗疲劳及肽段结构序列研究[J]. 食品工业科技, 2025, 46(17): 411−419. [LI M, FENG J F, MA Y R, et al. Study on the antifatigue effect and peptide sequence of oligopeptides derived from yellow chicken[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(17): 411−419.]
[22] 纪慧卓, 陈嘉钰, 李欣, 等. 大黄鱼蛋白源 ACE 抑制三肽的虚拟筛选、体外活性验证及分子机制[J]. 食品工业科技, 2021, 42(6): 125−129. [JI H Z, CHEN H Y, LI X, et al. Screening, *in vitro* activity and molecular mechanism of ACE inhibitory tirpeptides from larimichthys crocea protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(6): 125−129.]
[23] GHOORAH A W, DEVIGNES M, SMAÏL-TABBONE M, et al. Protein docking using case-based reasoning[J]. Proteins, 2013, 81(12): 2150−2158.
[24] WU J, RONG Y, WANG Z, et al. Isolation and characterisation of sericin antifreeze peptides and molecular dynamics modelling of their ice-binding interaction[J]. Food Chemistry, 2015, 174: 621−629.
[25] DU Z J, COMER J, LI Y H. Bioinformatics approaches to discovering food-derived bioactive peptides: Reviews and perspectives[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2023, 162: 117051.
[26] AHMED M, VERMA K A, PATEL R. Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2020, 18: 100315.
[27] 徐嘉欣, 罗哲, 何安, 等. 南珠贝壳珍珠层源抗氧化肽的制备及对酪氨酸酶的抑制活性[J]. 食品工业科技, 2025, 46(6): 1−10. [XU J X, LUO Z, HE A, et al. Preparation of antioxidant peptides derived from nacre of Nanzhu shell and their inhibitory activity against tyrosinase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(6): 1−10.]
[28] LIN L, LI C, ZHANG T, et al. An *in silico* scheme for optimizing the enzymatic acquisition of natural biologically active peptides based on machine learning and virtual digestion[J]. Analytica Chimica Acta, 2024, 1298: 342419.
[29] WANG X, YU H, XING R, et al. Preparation and identification of antioxidative peptides from pacific herring (*Clupea pallasii*) protein[J]. Molecules, 2019, 24(10): 1946.
[30] ZHENG X Y, MA J, ZHANG A, et al. Bioactive peptides from millet bran glutelin-2: Identification, virtual screening, inhibitory mechanism towards angiotensin-I-converting enzyme, stability, antihypertension, and ferrous-transmembrane absorption[J]. Food Bioscience, 2025, 63: 105595.
[31] 陈艳楠, 邱智军, 刘学强, 等. 紫贻贝(*Mytilus edulis*)蛋白计算机模拟消化物活性的生物信息学分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(15): 185−192. [CHEN Y N, QIU Z J, LIU X Q et al. Bioinformatics analysis of the bioactivities of in silico digest from *Mytilus edulis* proteins[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(15): 185−192.]
[32] JENKELUNAS J P, LI-CHAN C E. Production and assess-

ment of Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates as cryoprotectants for frozen fish mince[J]. Food Chemistry, 2018, 239: 535−543.

[33] ZENG Y L, LI W, LIU Y, et al. Antifreeze peptides preparation from tilapia skin and evaluation of its cryoprotective effect on *Lacticaseibacillus rhamnosus*[J]. Foods, 2022, 11: 857.

[34] CAO S Q, CAI J X, WANG X Z, et al. Cryoprotective effect of collagen hydrolysates from squid skin on frozen shrimp and characterizations of its antifreeze peptides[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 174: 114443.

[35] 江文婷, 陈旭, 蔡茜茜, 等. 基于分子对接技术研究鱼源抗冻多肽与鱼肌球蛋白的相互作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(20): 29−38. [JIANG W T, CHEN X, CAI X X, et al. Prediction of interaction between fish-derived antifreeze peptides and fish myosin by molecular docking[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 29−38.]

[36] WANG S Y, ZHAO J, CHEN L, et al. Preparation, isolation and hypothermia protection activity of antifreeze peptides from shark skin collagen[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 55(1): 210−217.

[37] 尹浩, 朱将雄, 钟宇, 等. 汉麻籽中靶向抑制胰脂肪酶/胆固醇酯酶多肽的快速鉴定筛选及活性探究[J]. 食品工业科技, 2025, 46(9): 114−123. [YIN H, ZHU J X, ZHONG Y, et al. Insights into rapid screening and activity investigation of novel hemp seed pancreatic lipase/cholesterol esterase inhibitory peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(9): 114−123.]

[38] LIU M, BAI S, JIANG Z, et al. Identification and isolation of a novel antifreeze peptide from crayfish shells[J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 198: 116030.

[39] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. The Proteomics Protocols Handbook, 1999, 112: 531−552.

[40] PRATIWI R, MALIK A A, SCHADUANGRAT N, et al. CryoProtect: A web server for classifying antifreeze proteins from nonantifreeze proteins[J]. Journal of Chemistry, 2017, 2017: 1−15.

[41] TURAB N A A, TAJ M, MUSTAFA H G, et al. Advancements in docking and molecular dynamics simulations towards ligand-receptor interactions and structure-function relationships[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2018, 18(20): 1755−1768.

[42] XU Z, CAO S A, ZHU Z X, et al. Characterization and the mechanism underlying the cryoprotective activity of a peptide from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Food Chemistry, 2024, 435: 137512.

[43] 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.]

[44] YANG F J, JIANG W T, CHEN C, 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): 14148−14156.

[45] BAARDSNES J, DAVIES L P. Contribution of hydrophobic residues to ice binding by fish type III antifreeze protein[J]. BBA - Proteins and Proteomics, 2002, 1601(1): 49−54.

[46] 李军, 符禹婷, 俞健, 等. 两条鲢鱼小清蛋白源抗冻肽的活性及作用机制比较[J]. 食品与机械, 2024, 40(4): 7−12. [LI J, FU Y T, YU J, et al. Comparison of the activities and cryoprotective mechanism of two antifreeze peptides derived from silver carp parvalbumin[J]. Food & Machinery, 2024, 40(4): 7−12.]

[47] ABBAS K, SHUJAIT S A, TAHIR M K, et al. Combined drug repurposing and virtual screening strategies with molecular dynamics simulation identified potent inhibitors for SARS-CoV-2 main protease (3CLpro).[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2020, 39(13): 1−12.

[48] 谭龙斌, 张倩, 于志鹏, 等. 罗非鱼皮胶原蛋白肽结构鉴定及抗氧化机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(18): 190−198. [TAN B L, ZHANG Q, YU Z P, et al. Structural identification and antioxidant mechanism of Tilapia skin collagen peptides [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(18): 190−198.]

[49] RAYMOND J A, DEVRIES A L. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977, 74(6): 2589−2593.

[50] CAO L, MAJURA J J, LIU L, et al. The cryoprotective activity of tilapia skin collagen hydrolysate and the structure elucidation of its antifreeze peptide[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 179: 114670.

[51] 欧阳及锦, 刘璐, 韩梅, 等. 基于外源氨基酸超分子组装改良罗非鱼皮胶原蛋白肽热滞活性的初步研究[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(6): 100−107. [OUYANG J J, LIU L, HAN M, et al. Improvement of the thermal hysteresis activity of tilapia skin collagen peptides through supramolecular assembly with exogenous amino acid[J]. China Food Additives, 2024, 35(6): 100−107.]