

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A23G 9/02

A23G 9/04

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97196688.5

[45]授权公告日 2002 年 3 月 27 日

[11]授权公告号 CN 1081444C

[22]申请日 1997.7.4 [24]颁证日 2002.3.27

[21]申请号 97196688.5

[30]优先权

[32]1996.7.26 [33]EP [31]96305497.8

[32]1996.7.26 [33]EP [31]96305498.6

[86]国际申请 PCT/EP97/03635 1997.7.4

[87]国际公布 W098/04146 英 1998.2.5

[85]进入国家阶段日期 1999.1.22

[73]专利权人 尤尼利弗公司

地址 荷兰鹿特丹

[72]发明人 R·A·芬恩 D·内德哈姆

K·斯马尔乌德

[56]参考文献

WO9222581 1992.12.23 C07K15/10

WO9222581 1992.12.23 C07K15/10

审查员 李斌卫

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 具有防冻肽的冷冻食品、其制备方法及适用于冷冻糖食的冰淇淋混合料

[57]摘要

用于生产包含 AFP 的冷冻食品的方法,其中选择各种条件使得产品中的冰晶体的长径比为 1.9-3.0。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

- 1.用于生产包含防冻肽的冷冻食品的方法，其中选择各种条件使得产品中冰晶体的长度除以宽度得到的长径比大于1.9。
- 5 2.根据权利要求1的方法，其中所述长径比为1.9-3.0。
- 3.根据权利要求1的方法，其中所述影响长径比的各种条件为：冷冻速率、冷冻期间产品的流动性、贮存温度和时间、产品的配方和防冻肽的性质和数量以及这些条件的综合。
- 4.根据权利要求1的方法，其中所述冷冻食品是冷冻糖食。
- 10 5.包含0.0001-0.5%（重量）防冻肽的冷冻糖食，所述食品的冰晶体的长径比大于1.9。
- 6.根据权利要求5的冷冻糖食，其中所述长径比为1.9-3.0。
- 7.根据权利要求5的冷冻糖食，其中所述防冻肽选择性粘合于冰晶体的主棱柱平面或次棱柱平面。
- 15 8.包含权利要求5的糖食作为独立单元的冷冻糖食，其中所述独立单元的结构与所述冷冻产品的其余部分的结构形成对比。
- 9.根据权利要求8的冷冻糖食，它包含与薄的冻果子露层交替的薄的冰淇淋层，其中所述冻果子露层包含0.0001-0.5%（重量）的防冻肽，且冰晶体的长径比为1.9-3.0。
- 20 10.适用于制备权利要求5的冷冻糖食的冰淇淋混合物。

说明书

具有防冻肽的冷冻食品、其制备方法
及适用于冷冻糖食的冰淇淋混合料

5

本发明技术领域

本发明涉及用于制备含有各种 AFP 的食品的方法和涉及含有各种 AFP 的食品。

10

本发明背景

长期以来人们建议采用各种防冻肽 (AFP) 来改进食品对冻结的忍受能力。

15

在文献中例如参见 Marilyn Griffith 和 K. Vanya Ewart 在《Biotechnology Advances》, (第 13 卷, 第 3 期, 第 375-402 页, 1995 年) 中对防冻蛋白已有描述。各种防冻性能一般具有以下一种或多种性能: 热滞后现象、冰再结晶抑制、控制冰晶体的形状以及与冰核的相互作用。

20

热滞后现象是 AFP 最为人所熟知的性能, 而且人们通常利用此性能来检验 AFP 的存在。热滞后现象是由于含有热滞后活性的 AFP 的溶液降低其表观冻温度而又不影响其熔融温度所引起的。关于热滞后实验的 AFP 源的鉴别广泛见述于文献中, 例如参见 John G Duman 在 Cryobiology 30 (第 322-328 页 (1993)) 中的描述。

25

冰再结晶抑制是 AFP 的另一个性能。这种活性也被称为冰晶体成长抑制现象。该性能可以通过在某一个时间处比较冰晶体在存在 AFP 和没有 AFP 的情况下晶体的大小来进行测试。该方法在测试鱼的 AFP 中的应用见述于美国专利第 5,118,792 号中 (DNA Plant Technology Corporation)。

AFP 的第三个性能是其影响冰晶体形状的能力。该性能是由于

AFP 选择性粘合于冰晶体的某些表面上，并因此而限制晶体在这些方向上的生长所造成的。然后具有六方双锥形状的晶体的存在被认为是存在 AFP 的表征。例如，在 WO 92/22581 (Waterloo 大学) 中描述了该方法用于测试细胞外冬黑麦 AFP 的活性。

5 AFP 的第四个性能是其抑制冰成核剂活性的能力。AFP 和冰成核剂之间的这种相互作用可以例如导致热滞后现象的加剧。例如在 WO 96/40973 (University of Notre dame du Lac) 中测试了该性能。

长期以来人们建议采用各种 AFP 来改进食品对冻结的忍受能力。人们已经提出了 AFP 的许多应用。

10 例如，人们建议采用 AFP 用于增强生物材料的低温贮藏能力(WO 91/12718, Agouron Pharmaceuticals, WO 91/10361, (The Regents of the University of California)。人们也建议采用各种 AFP 来防止例如化妆品或药物中脂质体的泄漏 (参见 WO 96/20695)。另一个可能的应用是通过其中包含 (或通过转基因从中制得) 的 AFP 来增强植物对冷冻的忍受能力 (参见 J. Cell. Biochem. Suppl. 卷 14e, 1990 年, 第 303 页, XP002030248, Lee 等, 摘要 R228)。也有人建议将鱼的 AFP 用于食物如用于冷冻的保加利亚奶酒或冰淇淋中 (美国专利第 15 5,620,732 号 Pillsbury 和 WO 96/11586, HSC Research and development limited partnership)。

20 然而迄今还未能以工业规模应用 AFP。本申请人认为缺乏工业上实行的其中一个原因是，虽然已经报道过许多 AFP，但在实践中在实际的工业产品的实行时遇到了许多严重的问题。

本申请人已经发现，这些问题的一个关键原因是在文献中已经描述的大量 AFP 中，只有有限的一批 AFP 才可以适用于每一种应用；本 25 申请人也发现，选择适宜的 AFP 取决于所需的应用和/或欲获得的产品属性。

WO 90/13571 公开了通过化学或重组 DNA 技术制得的防冻肽。这些 AFP 可适用于食物如冰淇淋中。其实施例 3B 显示，如果将水-冰

混合物与 0.01% (重量) 的 AFP 一起冷冻进薄膜(film)中便改变了冰晶体的形状。

WO 92/22581 公开了来自植物的 AFP。该文献也描述了一种用于通过将植物叶子渗入萃取介质中而无须使植物细胞破裂从植物的细胞外空隙中萃取多肽组分的方法。

WO 94/03617 公开了从酵母中制备 AFP 及其在冰淇淋中的应用。WO 96/11586 描述了通过微生物制备鱼的 AFP。

本发明目的在于提供具有相对较硬但脆的结构 of 冷冻食物，所述结构在低温下能保持较长的贮存期。

一些文献已经建议可以使用 AFP 以正面影响冷冻甜食如冰淇淋的结构性能。然而这些文献的大多数都不能说明在实践中如何真正得到这些有利的各项性能。

WO 96/11586 (未预先公开) 描述了鱼的防冻多肽在冷冻发酵食物中的应用。该文献没有提及硬而脆的产品。

WO 96/39878 (未预先公开) 描述了通过使用一种特殊的冷冻法将 AFP 应用于冰淇淋上。用于该应用的适宜 AFP 可衍生自南极鱼、北极(arctic)鱼、蚯蚓和昆虫的血液和肌肉组织。该文献也没有提及硬而脆的产品。

我们惊奇地发现，只要改变加工条件，使得冰晶体的形状满足特殊的要求，便可将各种 AFP 方便地结合到冷冻食品中，从而得到所需的产品性能。

因此在第一方面，本发明涉及用于生产包含 AFP 的冷冻食品的方法，其中选择各种条件使得产品中的冰晶体的长径比大于、优先为 1.9-3.0。

如果将食品冷冻，则冰晶体会布满整个食品。如果 AFP 包括在即将冷冻的食品中，则这样做通常会导致冰-再结晶性能发生有利变化。含有 AFP 产品的冰晶体的聚集可使产品变脆。

许多消费者喜欢较硬且较脆的冷冻食品或其中的成分，如冰淇淋

或冻果子露。例如在冷冻糖食中松脆的冻果子露可用作一种吸引人的成分，一大群消费者也喜欢较硬的冰淇淋。

我们惊奇地发现，利用 AFP 能配制一方面较硬且较脆的、另一方面具有改进的冰再结晶抑制性能的冷冻食品。本申请人惊奇地发现，如果产品中冰晶体的长径比大于 1.9、优选为 1.9-3 时，可以得到这个综合各种有利性能的食品。

冰晶体的长径比定义为冰晶体长度与宽度之比。长径比大于、优选为 1.9-3 对应于拉长的、形状不是圆形的冰晶体。可通过任何适宜的方法来确定晶体的长径比。一种优选的方法示于实施例 1 中。优选长径比为 2.0-2.9、更优选为 2.1-2.8。

优选本发明的冷冻食品是脆的。优选可观察到断裂行为的最小层厚度小于 10mm、更优选为 1-5mm。断裂行为可进行测定（通过制备不同厚度的各层并确定在哪一层发生最小厚度断裂行为）或如述于实施例中从杨氏模量来计算断裂行为。

在食品配制和随后的冷冻过程中有几个参数可以影响即将形成的冰晶体的长径比。在下面将给出影响长径比的各种因素的例子。本申请人相信，选择这些条件使得冰晶体的长径比在所需范围内完全是本领域技术人员力所能及的事。

影响冰晶体长径比的一个因素是冷冻食品的速度。一般而言，增加冷冻速度将导致冰晶体长径比的降低。在本文中冷冻温度可影响冷冻速度，进而影响冰晶体的长径比。在本文中有时优选包括一个硬化步骤（如在低于华氏-30 度的温度下）的冷冻方法。贮存温度和贮存时间同样影响长径比，较高的贮存温度和/或较长的贮存时间有利于形成较高的长径比。

影响冰晶体长径比的另一个影响因素是冷冻期间产品的流动性。例如，如果将液体冻果子露或冰淇淋混合物冷冻，则静止冷冻将得到很高的冰晶体长径比，而搅拌冷冻得到较低的长径比。高速剪切混合将得到更低的长径比。

影响冰晶体长径比的再一个因素是各种成分的存在及其用量。例如存在易于形成网络结构的成分（如树胶或脂肪）的产品比没有这些成分的产品具有较低的长径比。其他成分也将导致较低的长径比，例如较高固体含量如较高糖含量可产生较低的长径比。

5 最后，存在的 AFP 的性质和数量也可导致长径比发生变化。一些 AFP 似乎有利于形成低的长径比，而另一些 AFP 则似乎导致较高的长径比。在实施例中描述了选择这些 AFP 的一个适宜的测试方法。AFP 数量上的不同也可以导致长径比发生变化。

10 根据第二个实施方案，本发明涉及用于生产含有 AFP 的冷冻食品的方法，其中选择配方、冷冻条件和贮存条件使得产品中的冰晶体的长径比为 1.9-3。

本发明的方法可以应用于任何含有 AFP 的冷冻食品。适宜产品的例子是酱油、麦片等。优选的食品是冷冻的糖食如冰淇淋和冻果子露。

15 本申请人发现，用于本发明方法中的 AFP 可来自各种来源如植物、鱼、昆虫和微生物。可用天然存在的种类，也可用通过遗传修饰获得的种类。例如可将微生物或植物经基因修饰后表达 AFP，然后根据本发明使用这些 AFP。

20 可如下使用遗传操作技术来生产 AFP：通过含有所需多肽的基因构成物可使合适的宿主细胞或有机体转化。可将编码多肽的核苷酸序列插入到编码转录和转译所需元件的适宜表达载体中，并且以一种在合适的条件下（如以适当的定向及正确的读框且具有合适的靶序列和表达序列）可将其表达出来的方式进行。构成这些表达载体所需的各种方法对于本领域技术人员是众所周知的。

25 可以采用多种表达体系来表达编码序列的多肽。这些体系包括（但不限于此）细菌、酵母昆虫细胞体系、植物细胞培养体系和所有用合适表达载体的所有转化的植物体系。

采用所需多肽的核酸构成物可以转化很多种植物和植物细胞体系。优选的实施方案包括（但不限于此）玉米、西红柿、烟草、胡萝

卜、草莓、油菜籽和制糖甜菜。

出于本发明的原因，优选的 AFP 衍生自鱼（即它们直接从鱼中获得或通过其他有机体经转基因所产生的鱼蛋白）。特别优选的是 III 型鱼蛋白的用途，最优选的是述于我们未预先公开的案子 PCT/EP96/02936（WO 97/2343）中的 HPLC 12。

对于一些天然来源，AFP 可能由一种或多种不同的 AFP 的混合物所组成。

最好选择具有显著冰再结晶抑制性能的那些 AFP。在实施例中有用于测定再结晶性能的适宜实验。根据本发明最好 AFP 能提供一种再结晶时冰的颗粒大小-优选根据实施例来测量-小于 $20\mu\text{m}$ 、更优选为 $5-15\mu\text{m}$ 。我们相信具有特定长径比的较小颗粒的冰晶体对于获得所需的结构特征尤其有利。

本发明一个相当有利的实施方案涉及产品的配方，选择该配方使得在产品制备过程中可以使用静止冷冻的条件，而同时仍可获得上述限定的长径比。

这些食品的例子是：冷冻的糖食混合物如在室温或冷藏温度下贮存的冰淇淋混合料和冻果子露混合料。适宜的产品形式是例如包装于如袋中或小香包中的粉末混合物。所述混合物在例如添加水和任选的其它成分及充气（任选）后可以形成冷冻食品的基础。

适宜混合物的另一个例子是液体混合物（任选经过充气），如需要，可以在添加其他成分和任选进一步充气后将其冷冻。

很明显上述混合物的优点是，AFP 成分的存在使得混合物可在静止的条件下如在商店或家庭冷冻室中进行冷冻。

可以很方便地将这些混合物包装于密闭容器中（如纸板箱、袋子、盒子、塑料容器等）。对于单份包装，包装的大小一般为 10-1000 克。对于多份包装，包装的大小可高达 500 千克。通常包装大小为 10-5000 克。

如上所述，其中使用 AFP 的优选食品是冷冻糖食如冰淇淋或冻果

子露。基于最终食品的重量计，优选 AFP 的含量为 0.0001-0.5%（重量）。如果使用干混合物或浓缩物，则为了确保在最终冷冻食品中含量能在上述范围内，其浓度可高些。

5 我们惊奇地发现，本发明的组合物可以含很低数量的 AFP，但其质量仍然良好。

迄今人们仍普遍相信为了获得再结晶性能的合理改进需要相当高含量的 AFP。其原因是人们普遍认为 AFP 对冰晶体的表面起着相当重要的作用，因而为了得到一个合理的效果需要很高的含量如 0.01%（重量）或更高。

10 我们现在也惊奇地发现，如果使用低含量的 AFP，对于冷冻食品可以获得改进的再结晶性能和增加了的温度忍受能力。

我们惊奇地发现 AFP 的含量可以低至 0.1-50ppm 而在冷冻的糖食中仍能提供足够的再结晶性能和温度忍受能力。虽然本申请人决不希望受缚于任何理论，但其原因可能是冷冻糖食固体与 AFP 之间的相互作用为抑制晶体生长提供了一个极好的途径。AFP 最常见的含量为 1-40ppm、特别优选为 2-10ppm。

出于本发明的原因，术语“冷冻糖食”包括含有冷冻糖食如冰淇淋的牛奶、冷冻保加利亚奶酒、冷冻果汁水、果汁冰水、牛奶冻和冷冻乳蛋糕、冻果子露、粗粒冰糕(granitas)和冷冻水果酱。对于一些应用则不太优选 AFP 用在冷冻发酵食品中。

20 优选固体在冷冻糖食（如糖、脂肪、香料等）中的含量大于 30%（重量）、更优选为 40-70%（重量）。

优选在冷冻糖食中防冻肽选择性粘合于冰晶体的主棱柱平面或次核平面。

25 在本发明的一个相当优选的实施方案中，使用硬而松脆的冷冻糖食配方来得到与冰糖食相对比的结构。优选这些冰糖食在其结构中含有根据本发明的含 AFP 的组合物作为独立单元。例如较软的冰淇淋核心可以覆盖一层薄的本发明的组合物并以此提供较硬而松脆的一个外层包围冰淇淋核心。另一个实施方案可以是如冰糖食中的夹杂物般的加入本发明的制剂。第三个实施方案可以是冰淇淋与本发明制

30

剂各层之间的更迭, 得到与冰淇淋层交替的薄松脆的各层。优选的冷冻糖食, 包含与薄的冻果子露层交替的薄的冰淇淋层, 其中所述冻果子露层包含 0.0001-0.5% (重量) 的防冻肽, 且冰晶体的长径比为 1.9-3.0。

5 实施例 I

通过混合以下成分得到用于制备冰淇淋的预制混合物:

成分	% (重量)
脱脂奶粉	10.00
蔗糖	13.00
10 麦芽糖糊精 (MD40)	4.00
刺槐豆胶	0.14
熔融奶油	8.00
单酸甘油酯 (棕榈酸酯)	0.30
香草醛	0.01
15 AFP (III 型 HPLC-12, 参见 WO 97/2343)	0.01 或 0 (对照物)

水 余量

该混合物可方便地贮存于室温下如贮存在塑料容器中。

20 这些混合物通过在 2000psi 和 65°C 下进行均化并在 5°C 老化后过夜可用来制备冰淇淋。使用冷冻机 (装有以 240 转/分旋转的固体搅拌器的 MF50 SSHE Technohoy) 将混合物冷冻。挤出温度为 -4.5°C, 膨胀量为 110%。然后使产品在 -35°C 下冷冻, 并在 -80°C 下贮存。

贮存两个月后, 根据本发明的组合物的结构明显好于对照样品。

实施例 II

25 由以下配方制备冰淇淋:

成分	% (重量)
脱脂奶粉	10.00
蔗糖	13.00
麦芽糖糊精 (MD40)	4.00
30 刺槐豆胶	0.14

单酸甘油酯（棕榈酸酯）	0.30
香草醛	0.01
AFP（III型HPLC-12）	0.01 或 0（对照）
水	余量

5 制备方法同实施例 I。

将两种产品的样品于-18℃下、在 Prolan 环境的小室中平衡约 12 小时。通过将一薄层的冰淇淋涂抹在薄玻璃片的中央来制得显微镜载玻片。

10 将每一个载片都转移到温度控制的显微镜载物台（在-18℃下）上，在其中收集冰晶体（约 400 个单独的冰晶体）的图像并通过一个视频摄影机将其传递到影像贮存和分析系统。

15 通过手工拉(drawing)图像周边使贮存的冰晶体图像突出(highlight)，然后突出整个晶体。然后用计算完成最长直线（长度）、最短直线（宽度）和长径比（长度/宽度）所需的像素数量的影像分析软件来测量突出的晶体的图像。

计算晶体的平均长径比。

对于对照样品，长径比为 1.45。

对于含有 AFP 的样品，长径比为 2.24。

实施例 III

20 通过计算冰淇淋的断裂行为，来测定实施例 IV 的冰淇淋的脆性。使用三点弯曲实验(3-point bend test)来测量杨氏模量。

25 通过制备条状冰淇淋、将其在冷冻柜中平衡 18 个小时并转移到温度室(temperature cabinet)中来测量杨氏模量。如述于 Handbook of plastics Test Methods (第二版)(R. P. Brown 编辑, George Godwin Ltd. 出版, 1981 年)中将条状冰淇淋放置于三点弯曲试验台上。以 50 毫米/分的形变速度(deformation speed)马上进行样品测试。从力-形变曲线中测量到起始斜率，并用于根据下式计算杨氏模量：

$$\text{杨氏模量 (Pa)} = \frac{\text{斜率} \cdot L}{4 \cdot B \cdot W}$$

式中 L=光束跨距 (110mm), B=样品宽度, W=样品高度。通常测试 8 个样品以得到一个平均的杨氏模量值。

使用由 Williams & Cawood 在 Ploymer Testing 9 15-26 (1990 年)中所述的计算方法可以计算出断裂韧度。

5 结果如下: 对于对照样品, 计算出需要 966 米的厚度以获得一个松脆层。对于含有 AFP 的样品在厚度为 3mm 处已经发现脆性 (断裂行为)。这就清楚地表明了本发明产品改进了脆性。两个样品均得到相对较软的产品。

实施例 IV

10 本实施例描述了有利于形成本发明中所优选的晶体形状的那些 AFP 的选择工艺。

在正常的情况下冰晶体是沿着晶体的 a-轴生长的。如果存在 AFP, 则生长情况发生变化。这种选择性影响晶体形状可以解释为: AFP 易于粘合到冰晶体的某些部位, 而通过这样做即抑制了冰晶体在
15 这些方向上的生长。粘合可以在例如棱柱的表面 (垂直于 a-轴) 上或在锥体平面 (凸出于(projecting off)这些平面) 上。

本申请人现已发现, 通过选择那些易于粘合到棱柱平面的 AFP 可以发现例如有利于形成根据本发明的长径比的 AFP。选择这些按特异性粘合的 AFP 的工艺可以是任何适宜的工艺。一个适宜的测试使用所谓
20 的“单冰晶体‘半球体’生长试验”, 它是基于 Knight C. A., C.C. Cheng 和 A.L. DeVries 在 Biophys. J. 第 59 卷 (1991 年) 第 409-418 页的 Adsorption of α -helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes 中所述的技术进行的。

25 一个绝缘良好的 5 升塑料烧杯装满去离子水, 并放置在 -1 °C 的温控室中。然后使其从顶部开始缓慢冷冻。两天后约 4 厘米厚冰的单晶体覆盖了烧杯。使用单晶体 X-射线衍射方法来测定该晶体的结晶定

向。将大约 2 厘米规格的冰立方体从大的单晶体上切割下来，使得其一个平面平行于棱柱平面，另一个平行于底面。由此制得了定向的冰的单晶体。

5 使用一个由黄铜指形冷冻器(cold finger) (直径约 1 厘米) 组成的装置，使定向的晶种在其中进行冷冻。首先将晶种挖空使得晶种可与之配合。然后使冷冻剂通过指形器循环，而晶种则变得冷冻，牢牢地附在指形器上。

10 然后将具有晶种的指形器浸入含有正在研究的物质溶液的 100 毫升绝缘烧杯中。溶液的初始温度是室温 (约 18 °C)，唯一的冷却由指形冷冻器提供。起初晶种部分溶解，但后来生长成单晶半球体。几个小时 (6-8 小时) 后形成直径为 5-7 厘米的半球体。

使用不同的 AFP 溶液来进行试验。所用的 AFP 溶液的 AFP 浓度为 10^{-3} 毫克/毫升。

15 然后将半球体从指形冷冻器中移走，放置到 -15 °C 的温控室中。将其表面刮削并使其留在温控室中至少过夜 (16 小时或更长)。通过一个内置的风扇使空气经温控室循环。其间冰的表层发生蒸发。冰半球体的表面因而变成一个光滑的镜面。然而对于含有 AFP 的半球体而言，在表面上可看到粗糙的小块(patch)。这些小块是 AFP 粘合于半球体表面之处。大的 AFP 分子防止冰分子发生蒸发，因此一簇粗糙的 AFP 分子积累在 AFP 选择性粘合到冰上的表面之处。由于半球体的定向是已知的，这些粗糙小块与底部方向和棱柱方向之间的角距离可通过光学测角器测量，因而可以很容易地确定粘合平面的性质。

20 该测试可用来选择易于粘合到棱柱主平面和次平面的那些 AFP。例如来自美洲拟鲾或来自阿拉斯加海鲾的 I 型 AFP 易于粘合到 (20-21) ¹ 的粘合部位，而来自南极鳕鱼的 AFGP 易于(ten)粘合到 (10-10) ^{3 或 5} 的粘合部位，来自南极江鳕的 AFP III 则易于粘合到 (10-10) ^{2 或 3} 的粘合部位。

使用上述测试方法来确定那些有利于形成较高冰晶体长径比的

AFP 将完全是本领域技术人员力所能及的事。为了测试其在本发明冷冻食品中的适应性，可以制造出实际的产品，并且可以测定产品中晶体的长径比。

实施例 V

5 用于确定再结晶时的冰晶体大小的实验。

将含有 AFP 的样品在水中的溶液调节到蔗糖含量为 30%（重量）（如果样品的起始含量大于 30%，则通过稀释来调节，如果起始含量较低，则加入蔗糖至达到 30%的含量）。

10 通常该实验可以适用于任何适宜的含有 AFP 和水的组合物。通常 AFP 在这种实验组合物中的含量不是很关键的，它可以为例如 0.0001-0.5%（重量）、更优选为 0.0005-0.1%（重量）、最优选为 0.001-0.05%（重量），例如为 0.01%（重量）。

15 将 3 μ L 的一滴样品置于 22 毫米宽的条状盖玻片上。然后将直径为 16 毫米的盖玻片放置于其上，在样品上加上 200 克的重物以确保载玻片厚度均匀。盖玻片的边缘用纯的指甲清漆密封。

将载玻片放置于 Linkham THM 600 的温控显微镜载物台上。使载物台迅速冷却（50 $^{\circ}$ C/分）到 -40 $^{\circ}$ C 以得到大量的小晶体。然后将载物台的温度迅速升高（50 $^{\circ}$ C/分）到 -6 $^{\circ}$ C 并保持在该温度下。

20 使用 Leica Aristoplan 显微镜观察在 -6 $^{\circ}$ C 时的冰相。使用偏振光条件及 λ 板来增强冰晶体的对比度。通过 35 毫米的照相显微镜记录冰相在 T=0 和 T=1 小时的状态。藉此小于 20 μ m、更优选为 5-15 μ m 的平均颗粒大小（目测平均数）代表用于根据本发明的产品中的优选 AFP。