

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97198219.8

[45]授权公告日 2002年5月15日

[11]授权公告号 CN 1084598C

[22]申请日 1997.7.4

[21]申请号 97198219.8

[30]优先权

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

[32]1996.7.26 [33]EP [31]96305499.4

[32]1996.11.19 [33]EP [31]96308362.1

[32]1997.3.14 [33]EP [31]97301719.7

[32]1997.3.14 [33]EP [31]97301733.8

[86]国际申请 PCT/EP97/03637 1997.7.4

[87]国际公布 WO98/04148 英 1998.2.5

[85]进入国家阶段日期 1999.3.25

[73]专利权人 尤尼利弗公司

地址 荷兰鹿特丹

[72]发明人 L·J·拜尔斯 D·F·达林

C·J·杜塞 R·A·芬恩

P·J·利尔福德 A·J·麦克阿瑟

D·内德哈姆 C·塞德伯托姆

K·斯马尔伍德 M·F·斯马尔伍德

[56]参考文献

WO9222581A 1992.12.23

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 卢新华 温宏艳

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 冷冻甜食制品

[57]摘要

只要能够限制冰晶生长,植物抗冻蛋白掺加到冷冻甜食制品中就是有利的。

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



权 利 要 求 书

1. 包含一种或多种来源于植物的抗冻多肽的冷冻糖食制品, 其中在含水组合物中的抗冻多肽经过快速冷冻至 -40°C 或更低接着在 -6°C 下储藏 1 小时后的平均冰晶大小小于 $15\mu\text{m}$,

5 条件是抗冻肽不是来自小蔓长春花的抗冻肽, 它位于植物细胞的胞外空间并且具有 36kD、30kD、24kD、22kD、11kD、9kD 或 5kD 的分子量。

2. 权利要求 1 的冷冻糖食制品, 其中抗冻多肽来自 *mohriodes* 耳蕨、*bitematus* 毛茛、*antartica* 假山毛榉、*fontanum* 卷耳、*Colobanthus quitensis*、酸模、爆竹柳、普通帚石楠、*Aceana magellanica*、豌豆、*saccheraroides* 槭、酢浆草属、毛鹤草属、胡萝卜、小蔓长春花、蔓长春花、
10 花葱属、醉鱼草属、连翘属、洋接骨木、*squarrosus* 灯心草、*aquatilis* 苔草、*tenuis* 薊股蕨、*antartica* 发草、*contracta* 羊茅、紫羊茅、*Parodiochloa flabellata*、高山梯木草、早熟禾、草地早熟禾、*Rostkovia magellanica*、竹、*Chorisodontium aciphyllum*、钩枝镰刀蕨、圆枝猫尾蕨、*alpestre* 金发
15 蕨、*nigricans* 树发、*regalis* 美血衣、*Himantormia lugubris*、袋衣、*subrudecta* 梅花衣、*farinaceae* 树花、*glabrum* 珊瑚枝、*antartica* 石脐、*subfloridana* 松萝、*trivialis* 早熟禾、*perenne* 毒麦、绒毛草、*sterilis* 雀麦和 *contracta* 羊茅。

3. 权利要求 2 的冷冻糖食制品, 其中抗冻多肽来自苔藓科。

20 4. 权利要求 3 的冷冻糖食制品, 其中抗冻多肽来自 *nigricans* 树发、*regalis* 美血衣、*Himantormia lugubris*、袋衣、*subrudecta* 梅花衣、*farinaceae* 树花、*glabrum* 珊瑚枝、*antartica* 石脐、*subfloridana* 松萝。

5. 权利要求 2 的冷冻糖食制品, 其中抗冻多肽来自 *squarrosus* 灯心草或毛鹤草属。

25 6. 权利要求 2 的冷冻糖食制品, 其中抗冻多肽经过 60°C 以上温度至少 30 秒热处理后仍保持它们限制冰晶生长的能力。

7. 权利要求 6 的冷冻糖食制品, 其中抗冻多肽经过 60°C 以上温度 1 分钟以上热处理后仍保持它们限制冰晶生长的能力。

8. 权利要求 6 的冷冻糖食制品, 其中抗冻多肽来自 *saccheraroides* 槭、
30 竹、醉鱼草属、圆枝猫尾蕨、*farinaceae* 树花、*subfloridana* 松萝、连翘属、酢浆草属、*trivialis* 早熟禾、*perenne* 毒麦、绒毛草、*sterilis* 雀麦、*Parodiochloa flabellata*、*antartica* 发草、*aquatilis* 苔草、*Colobanthus*

quitensis 和 tenuis 藟股颖、contracta 羊茅、早熟禾。

9. 权利要求 1 的冷冻糖食制品，其中抗冻多肽来自非毒性植物。

10. 权利要求 2 的冷冻糖食制品，其中抗冻多肽是来自冬黑麦的 32kDa 蛋白。

5 11. 权利要求 2 的冷冻糖食制品，其中制品基本上不含来自冬黑麦的抗冻多肽。

说明书

冷冻糖食制品

发明领域

5 本发明涉及包含 AFPs 的冷冻食品。

发明背景

抗冻蛋白 AFP 在现有文献中已有描述，例如可见 Marilyn Griffith 和 K.Vanya Ewart 的《生物技术进展》(Biotechnology Advance) Vol 13, No 3, pp 375-402, 1995。抗冻蛋白一般具有以下一种或几种特征：热滞、抑制冰再结晶、控制冰晶形状以及
10 与冰成核体的相互作用。

热滞是 AFPs 最有名的特性，并且一般用该特性来测试 AFPs 的存在。热滞起因于含热滞后活性 AFP 的溶液的表观结冻温度降低而没有影响融化温度。通过热滞测试 AFP 源的鉴别方法在很多文献中有所描述，如可见 John G. Duman 的《低温生物学》(Cryobiology) 30, 322-328 (1993)。
15

抑制冰再结晶是 AFPs 的另一个特性。该活性还称为冰晶生长抑制性。这个特征可以通过比较存在 AFP 和不存在 AFP 的晶体在某一时间点的冰晶大小来测定。US 专利 5,118,792 (DNA 植物技术公司 (DNA Plant Technology Corporation)) 中描述了该方法在测试鱼 AFPs 中的应用。
20

AFPs 的第三个特性是它们影响冰晶形状的能力。该特性来自 AFPs 对冰晶某些表面的选择性结合，并因此限制了冰晶沿某个方向进行生长。然后，六角形双锥体状冰晶的存在被认为是存在 AFP 的征兆。例如在 W092/22581 (滑铁卢大学 (University of Waterloo)) 中报导了以上述方法测试胞外冬黑麦 AFPs 活性。
25

AFPs 的第四个特性是它们对冰成核物质的活性的抑制能力。AFP 和冰成核体之间的相互作用可以(例如)导致增加的热滞。这个特性在如 W096/40973 (University of Notre dame du Lac) 中进行了测试。
30

AFPs 已被提出用于改进产品的冷冻耐受性。就此内容提出了很多申请。

例如，AFPs 被提出用于增强生物材料的冷保藏性

(W091/12718, Agouron Pharmaceuticals, W091/10361, The Regent of the University of California). 还提出了 AFPs 用于防止如化妆品和药物中的脂质体的渗漏. 其它可能的应用是通过包含 AFP(或在其中转基因生产)来增加植物的冷冻耐受性(参见《细胞生物化学杂志增刊》(J. Cell. Biochem. Suppl.) Vol. 14e, 1990, P303 XP002030248, Lee et al, 摘要 R228). 还提出鱼的 AFPs 可用于食品中例如冷冻酸奶或冰淇淋 (US 5,620,732 Pillsbury 和 W096/11586, HSC 研究和发限股份公同).

然而, 至今 AFPs 的使用还没有形成商业规模. 本申请人认为缺乏商业实现的一个原因是在于虽然描述了很多 AFPs, 但在实际中真正用于商业产品时会遇到很严重的问题.

本申请人发现这些问题的一个关键原因是在现有技术中描述的大量 AFPs 仅有固定的几个 AFPs 可以在各自的应用中适宜地使用; 本申请人还发现这种选择使用 AFPs 取决于所需的用途和/或所要达到的产品的属性.

AFPs 的特别理想的来源是植物原料. 从植物原料中可以相当容易地获得相对大的量, 而且可以运用相对简单的分离过程来获得含 AFP 的浓缩物. 此外, 使用来自植物原料的 AFPs 据信被较喜欢天然蔬菜来源而不是例如鱼 AFPs 的消费者所偏爱.

Marilyn Griffith 和 K. Vanya Ewart 在《生物技术进展》Vol. 13, No. 3, pp 375-402, 1995 中给出了 27 种高等植物种类的目录, 在这些植物种类中发现了抗冻活性. 该文中还提出了 AFPs 的可能的广泛用途.

申请人发现, 如果选择对植物 AFPs 用途的特定应用, 则需要进行特定的测试来选择在该应用中可以得到有利使用的 AFPs 的有限组.

因此, 本发明的目的是提供那些可以在冷冻糖食制品中得到有利使用的植物 AFPs.

申请人出人意料地发现了尽管事实上大量的植物包含 AFPs, 但仅有限组的植物包含能够给冷冻糖食制品提供良好质地的 AFPs. 还出人意料地发现了可以使用相对简单的测试方法来选择适宜的 AFPs.

因此, 本发明的第一个方面涉及包含一种或多种来自植物的 AFPs



的冷冻甜食制品, 其中 AFPs 在水中经过快速冷冻至 -40°C 接着在 -6°C 下储藏 1 小时后具有小于 $15\mu\text{m}$ 大小的冰晶(如下描述测定), 条件是抗冻肽不是来自小蔓长春花的抗冻肽, 它位于植物细胞的胞外空间并且具有 36kD、30kD、24kD、22kD、11kD、9kD 或 5kD 的分子量。

5 发明背景

很多现有文献提出可能可以使用 AFPs, 以便有益影响冷冻甜食制品如冰淇淋的质地性。然而大部分这些文件没有提供怎样可以在实践中确实得到这些有益特性的方法。

其它文件描述了鱼 AFPs 的使用。

10 WO96/11586 讲述了在冷冻的发酵食品中使用鱼抗冻多肽。该文件没有讲述在这些制品中使用得自植物的特定 AFPs。

WO 96/39878 描述了在冰淇淋中使用 AFP。适合该应用的 AFPs 可以来自南极鱼、北极鱼、虫和昆虫的血液和肌肉组织。也没有提及可以使用植物 AFP。

15 US 5, 118, 792 的实施例 3B 中描述了通过纯化的 A-Saf5 融合蛋白来抑制雪糕混合物的再结晶。该文件也没有提及使用来自植物的 AFPs。

WO 92/22581 描述了得自冬黑麦胞外空间的多种多肽。总体上描述了这些多肽的很多可能的用途, 其中有冰淇淋。然而没有提及到应当选择多肽来获得良好品质的冰淇淋。申请人发现仅仅来自冬黑麦的特定蛋白质适合在冰淇淋中使用(参见实施例)。

20 申请人发现至今未被列举出的许多植物中包含显著含量的 AFPs。另一方面, 发现并非所有的含 AFP 植物提供适宜类型的 AFP, 以有益影响冷冻甜食的质地。申请人的目标在于提供对植物源的新的选择, 这些植物源一方面出人意料地提供良好的 AFP 特性, 另一方面能够有益影响冰淇淋的质地性。

具体说, 申请人发现了可以选择适宜 AFPs 的方法, 即在含水组合物中选取包含 AFP 的组合物、将该组合物快速冷冻至 -40°C 或更低、接着在 -6°C 下储藏 1 小时。经过这些条件下储藏 1 小时后, 适宜的 AFPs 产生小于 $15\mu\text{m}$ 大小的冰晶, 更优选 $5-14\mu\text{m}$, 首选 $8-12\mu\text{m}$ 。快速冷冻的温度最好是 -40°C 至 -100°C , 优选 -80°C 。

测定该特性的适宜测试方法在实施例 I 中作详细描述。

30 一般, 测试可以适用于任何适宜的含 AFP 和水的组合物。一般来

说，测试组合物的 AFP 含量没有严格的限制并可以是例如 0.0001-0.5wt%，优选 0.0005-0.1wt%，首选 0.001-0.05wt%，例如 0.01wt%。含水组合物中的水含量为 30wt%或更高是有利的，例如 50wt%-99.999wt%。

5 可以使用包含 AFP 和水的任何适宜的组合物来进行测试。如果需要，可以存在添加剂，例如蔗糖或缓冲剂。但一般来说不必要获得纯化形式的 AFP。为正常的实际使用，制备成植物原料的液体提取物或汁液就可以，其中所说的提取物或汁液然后可以进行测试。实施例 II 给出了制备适宜液体组合物的适宜方法。

10 用于测试适宜 AFPs 的正常植物要处于冷的条件下。例如，可以测试在冷气候下生长的植物，如南极植物。或者，植物是可以在冬季期间收获的，优选在 12 月-3 月，更优选 1-2 月，首选 1 月(北半球)，或 6 月-9 月，更优选 7-8 月，首选 7 月(南半球)。

15 申请人对大量的植物作了上述的测试。结果在实施例 III 和 IV 中给出。

20 AFPs 的优选来源来自 *mohriodes* 耳蕨、*bitermatus* 毛茛、*antartica* 假山毛榉、*fontanum* 卷耳、*Colobanthus quitensis*、酸模、爆竹柳、普通帚石楠、*Aceana magellanica*、豌豆、*saccheraroides* 槭、酢浆草属、毛鹤草属、胡萝卜、小蔓长春花(长春花)、蔓长春花、
25 花葱属、醉鱼草属、连翘属、洋接骨木、*squarrosus* 灯心草、*aquatilis* 苔草、*tenuis* 翦股颖、*antartica* 发草、*contracta* 羊茅、紫羊茅、*Parodiochloa flabellata*、高山梯木草、早熟禾(芨芨草)、草地早熟禾(六月禾)、*Rostkovia magallanica*、竹(Bambosoideae)、*Chorisodontium aciphyllum*、钩枝镰刀藓、圆枝猫尾藓、*alpestre*
30 金发藓、*nigricans* 树发、*regalis* 美血衣、*Himantormia lugubris*、袋衣、*subrudecta* 梅花衣、*farinaceae* 树花、*glabrum* 珊瑚枝、*antartica* 石脐、*subfloridana* 松萝、*trivialis* 早熟禾、*perenne* 毒麦、绒毛草、*sterilis* 雀麦和 *contracta* 羊茅。

30 申请人认为基于本发明说明书给出的指导，本领域技术人员将完全能够选择来自植物的其它适宜的 AFPs。这些 AFPs 的使用也包含在本发明的保护范围内。

在一个实施方案中，特别适于在食品中使用的是满足上述定义的

冰晶大小并且是得自非或低毒性植物的那些植物 AFP。在该内容中，
优选得自胡萝卜、草、竹子等的 AFP。

从上述来源中另一个优选的选择是得自苔藓科的 AFPs，具体说是
得自 *nigricans* 树发、*regalis* 美血衣、*Himantormia lugubris*、袋
5 衣、*subrudecta* 梅花衣、*farinaceae* 树花、*glabrum* 珊瑚枝、
antartica 石脐、*subfloridana* 松萝。这些 AFPs 在冷冻糖食制品中
表现出特别优良的特性。

其它表现特别良好活性的 AFPs 得自 *squarrosus* 灯心草或毛鹤草
属。

10 对某些应用来说，选择那些经过 60℃ 以上温度、首选 80-105℃
热处理至少 30 秒、更优选超过 1 分钟、10 分钟甚至超过 1 小时后仍
保持它们限制冰晶生长能力的 AFPs (如上测试所示)。具有热稳定性的
适宜植物源是例如 *saccharoides* 槭、竹、醉鱼草属、圆枝猫尾藓、
farinaceae 树花、*subfloridana* 松萝、连翘属、酢浆草属、*trivialis*
15 早熟禾、*perenne* 毒麦、绒毛草、*sterilis* 雀麦、*Parodiochloa*
flabellata、*antartica* 发草、*aquatilis* 苔草、*Colobanthus*
quitensis 和 *tenuis* 薊股颖、*contracta* 羊茅、早熟禾。

除上述植物外，申请人还测试了得自黑麦(冬黑麦)的 AFPs。WO
92/22581 中描述了很多冬黑麦 AFPs。申请人吃惊地发现得自冬黑麦
20 的 32kDa 蛋白质满足上述冰晶大小测试，而得自冬黑麦的其它蛋白质
不满足测试(参见实施例 IX)。出于本发明的目的，如果利用得自冬黑
麦的 AFPs，则优选使用 32kDa 蛋白质。

本发明的其它优选实施方案涉及满足上述测试、不是来源于冬黑
麦的织物 AFP 在冷冻糖食制品中的应用。

25

发明详述

本发明的冷冻制品包含至少一种得自植物来源的 AFP。

AFPs 可以通过任何适宜的方法从植物来源中获得，例如上述文件
中描述的分离方法。或者，可以通过以下方法从植物中提取 AFPs，例
30 如通过由植物(部位)制备植物提取物然后通过可选择的浓缩步骤。实
施例中给出了获得所说提取物的示例性适宜方法。

还可以将微生物或植物进行基因修饰表达 AFPs，然后将 AFPs 应

用于本发明中。

可以使用基因操作技术来生产与从天然含 AFPs 的植物来源中直接获得的 AFPs 具有至少 80%、更优选 95%以上、首选 100%同源性的 AFPs。出于本发明的目的，这些具有高水平同源性的 AFPs 也属于术语“得自植物的 AFP”的范围。出于本发明的目的，术语“得自植物的 AFP”优选不包括天然存在于非植物来源如鱼和通过转基因途径由植物生产的 AFPs。

基因操作技术可以如下使用：通过包含所需多肽编码区的基因构建体来转化适宜的宿主细胞或生物。

可以将用于编码多肽的核苷酸序列插入合适的表达载体。所说的载体编码用于转录和翻译的必要的元件，并且以它们在适宜条件下（例如，以适当的取向和正确的读框并且具有适宜的目标和表达序列）被表达的方式。

构建这些表达载体需要的方法对本领域技术人员来说是公知的。

很多表达系统均可以用来表达多肽编码序列。其中包括（但不限于此）细菌、酵母、昆虫细胞系统、植物细胞培养系统和全部用适宜表达载体转化的植物。

可从上述来源中获得的 AFPs 可以用于任何适宜的冷冻糖食制品中。本发明中术语“冷冻糖食制品”包括含乳冷冻糖食，例如冰淇淋、冷冻酸奶、果汁冰糕（sherbet）、加果汁的冰水（sorbet）、冻牛奶和冷冻的蛋奶糕、水冰、粗粒冰糕（granitas）以及冷冻的水果泥。出于某些目的不优选在发酵冷冻食品中使用。

基于最终的产品，AFPs 在冷冻糖食制品中的含量优选为 0.0001-0.5wt%，更优选 0.0005-0.3wt%，首选 0.001-0.2wt%。

冷冻糖食中固形物含量（如糖、脂肪、调味料等）优选为 2wt%以上，更优选 4-70wt%。

如果需要，本发明的冷冻糖食制品可以是经过充气的，例如达到 50-500%的膨胀度。

本发明冷冻糖食制品的制备方法可以选自任何适宜的制备方法。AFPs 一般可以在制备过程的任何阶段加入，例如它可以在第一步的成分预混合阶段加入或以后在制备过程的后期阶段加入。对一些应

用来说，有时优选在生产过程的相对晚的阶段加入 AFPs，例如在制品的(部分)预冷冻之后。

5 冷冻糖食制品的冷冻方法可以选自任何适宜的冷冻方法，并且可以选择性包括充气步骤，例如充气到 50-300%膨胀度。对于某些目的，包括冷硬化步骤的冷冻方法是有利的，例如在 -30°F 或更低温度下。

对一些应用来说，冷冻糖食制品中包含两种或多种 AFPs 混合物是有利的。一个原因例如可以是将要使用的 AFP 的植物来源中包含了一种以上 AFP，并且是较容易添加的，这是因为例如它们同时存在于将要使用的植物提取物中。或者，添加来自不同来源的一种以上的 AFP 10 有时可能是需要的。

现在，将通过以下实施例的方式举例说明本发明。

实施例 I

测定快速冷却接着 -6°C 下储藏 1 小时后的冰晶颗粒大小的试验

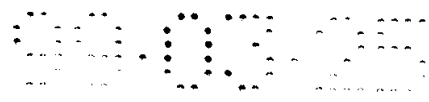
15 优选的方法如下：

Ia: 使用改进的“液滴(splat)测定”(Knight et al 1988)测定抗冻活性。测定中，将 $2.5\mu\text{l}$ 的 30%(w/w)蔗糖溶液转移到干净、适当标定的、16mm 圆形盖片上。将第二个盖片放在溶液滴的顶部并且夹在手指和拇指之间挤压在一起。将该夹层物放入到在干冰的箱中保持 20 在 -80°C 的己烷浴中。当全部夹层物制备完时，使用在干冰中预冷的镊子将夹层物从 -80°C 己烷浴中转移至观察室中，其中装有保持在 -6°C 下的己烷。一旦转移至 -6°C ，可见夹层物由透明变成不透明外观。通过影像摄像机记录下图像并且抓拍到图像分析系统中(LUCIA, 尼康)，使用 20x 的物镜。在 0 时间记录每个液滴的图像并且在 60 分 25 钟之后再记录一次。

或者(不优选)，可以如下测定特性：

Ib: 将包含水的含 AFP 制品的样品调整为 30wt%蔗糖含量(如果样品开始的含量超过 30wt%，则采用稀释，如果开始含量低于 30wt% 30 则添加到 30wt%)。

将 $3\mu\text{l}$ 的样品滴放在 22mm 盖片上。然后将 16mm 直径的盖片放在顶上并在样品上放置 200g 的重量以确保均匀的载片厚度。用澄清指甲涂剂密封盖片的边缘。



将载片放在 Linkham THM 600 控温显微镜载片台上。将载片台快速冷却至 -40°C (每分钟 50°C)，得到无数小冰晶。然后将载片台温度快速提升至 -6°C (每分钟 50°C) 并且保持在该温度下。

5 使用莱卡 Aristoplan 显微镜观测 -6°C 下的冰相。使用偏振光条件以及 λ 板来增强冰晶的对比度。通过 35mm 显微照相术在 $T=0$ 和 $T=1$ 小时记录冰相的状态(冰晶的大小)。平均颗粒大小(可视测定, 数值平均)小于 $15\mu\text{m}$ 说明 AFP 适合在冷冻糖食制品中使用。

实施例 II

10 含 AFP 和水的组合物的获得方法

A. 用研杵和研钵(冷却至 4°C)将植物部分的新鲜组织如根、茎、芽或叶在保持在冰上的等体积的缓冲液 A 中碾磨(例如 10mM EDTA, 20mM 抗坏血酸, 用 Tris 缓冲至 pH7.4)。将匀浆通过一层或多层平纹细布过滤, 并且在进一步使用前保持在冰上。

15 该方法一般可以适用于大部分植物并且提供了包含 AFP 的新鲜植物汁。一般来说可以适用完整植物, 但出于实际的原因有时可以仅使用植物的部分(如木质树的叶、根类植物的根和草类植物的茎)。

20 B. 从能够耐热的植物来源中提取 AFPs 的方法。该示例性的方法是通过使用混合草。很明显, 该方法可以等效应用于其它热稳定性种类。

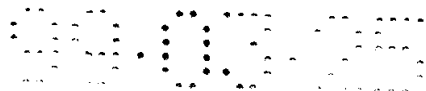
在 1 月份剪切混合草组织(trivialis 早熟禾、perenne 毒麦、绒毛草、sterilis 雀麦), 该月的平均温度为 3.5°C , 确保植物适当的冷适应。将草组织快速运送到实验室中以进一步处理和用水彻底洗涤除掉污垢。

25 将 500g 剪切的草放入 650 Watt 微波炉中并且在满功率下加热 5 分钟, 温度从 85°C 升高到 100°C 。然后将草剪切物冷却至室温。

加热步骤后, 通过过滤从剪切物中分离出富含 AFP 的汁液。将剪切物在等体积水的存在下连续搅拌 5 分钟, 然后通过 3 层平纹细布压榨。

30 实施例 III

各种植物的筛选。在 1 月份(中冬季)收割非南极植物。中夏季(2-3 月份)收获南极植物。



除非另外说明，使用根来根据实施例 IIa 所述的方法制备含 AFP 的汁液。

将样品经过实施例 Ia 的测试。用正号 (+) 表示适合在冷冻糖食制品中使用的 AFPs。

- 5 此外，如下测定汁液的热滞：将熔化的制品放在载玻片上 (Camblab Cambridge, 径长 0.1mm)，来测定含 AFPs 制品的样品热滞。载玻片末端用软石蜡密封。使用气溶胶冷冻喷雾器将冰引入样品中。然后玻片浸入到温度调节为 -0.1°C 的乙醇浴中。平衡 5 分钟后查看样品，如果冰完全融化则每次 0.1°C 逐步降低浴温，接着平衡。重复这些步骤直至温度达到样品中存在少量冰晶。在该温度下平衡之后，每
- 10 分钟 0.01°C 地逐步降低浴温。冰从平衡晶体开始增大时的温度记录为样品的冻结点。然后从冻结点开始每分钟 0.01°C 地升高温度直至所有冰晶融化，由此来测定样品的熔点。该温度是样品的融化温度。融化温度和结冻温度之间的差是热滞。具有显著程度热滞的 AFPs 用正号
- 15 (+) 表示。获得以下结果：

植物名称	热滞	再结晶抑制性(实施例 I)
木贼	+	-
白云杉	+	-
兜状荷包牡丹	+	-
堇菜属 sp.	+	-
羽衣甘蓝	+	-
芜菁	+	-
欧洲油菜	+	-
野胡萝卜	+	+
小蔓长春花	+	+
马铃薯	+	-
早熟禾	+	-
草地早熟禾	+	-
黑麦	+	*)
皱叶欧芹	+	-
药用鼠尾草	+	-

*)注: 仅 29-32kDa 的蛋白质具有活性

这些结果清楚地说明虽然很多植物显示出热滞, 但仅有少部分通过再结晶的试验。

5 实施例 IV

各种植物的筛选。在 1 月份(中冬季)收割非南极植物。中夏季(2-3 月份)收割南极植物。

除非另外说明, 使用根来根据实施例 IIa 所述的方法制备含 AFP 的汁液。

10 将样品经过实施例 Ia 的测试。适合在冷冻糖食制品中使用的 AFPs 用正号(+)表示。

植物名称	RI 测试
溪木贼	-
scolopendrium 铁角蕨	-
mohriodes 耳蕨	+
欧洲赤松	-
glauca 云杉	-
柏木属 sp.	-
月桂属	-
biternatus 毛茛	+
荷苞牡丹属	-
三球悬铃木	-
荨麻属	-
fraxinifolia 枫杨	-
antartica 假山毛榉	+
oblique 假山毛榉	-
垂枝榉	-
甜菜	-
fontanum 卷耳	+
Colobanthus quitensis(漆姑草)	+
酸模	+

芍药属	-
金丝桃属	-
蜀葵属	-
堇菜属	-
银白杨	-
白柳 "Britzensis"	-
daphnoides 柳	-
爆竹柳	+
aria 花楸	-
Prassica napus	-
糖芥属	-
普通帚石楠	+
报春属	-
绣球属	
景天属	-
Aceana magellanica	+
单子山楂	-
洵子属 sppx2	-
草莓属 x 凤梨属	-
斗蓬草属	-
金雀花属	-
豌豆	+
蚕豆	-
紫苜蓿	-
瑞香属	-
桉属	-
珊瑚木属	-
冬青属	-
saccheraroides 槭	+
漆树属	-
酢浆草属	+

毛鹤草属	+
长春藤属	-
胡萝卜	+
欧洲防风	-
蔓长春花属	+
花葱属	+
迷迭香属	-
醉鱼草属	+
连翘属	+
花白蜡树	-
pileata 忍冬	-
洋接骨木	+
葛苣	-
蒜叶婆罗门参	-
菊芋	-
squarrosus 灯心草	+
aquatilis 苔草	+
tenuis 翦股颖	+
antartica 发草	+
contracta 羊茅	+
紫羊茅	+
Parodiochloa flabellata	+
高山梯木草	+
早熟禾	+
草地早熟禾	+
Rostkovia magallanica(草)	+
竹(Bambosoideae sp)	+
亚美尼亚蓝壶花	-
大头蒜 cv Alaska	-
洋葱	-
Chorisodontium aciphyllum	+

钩枝镰刀藓	+
圆枝猫尾藓	+
扁枝平藓	-
alpestre 耳蕨	+
金发藓	-
拟金发藓	-
Racomitrium lanuginosum	-
capillofolium 泥炭藓	-
沼泽泥炭藓	-
nigricans 树发	+
regalis 美血衣	+
Himantormia lugubris	+
袋衣	+
subrudecta 梅花衣 a	+
farinaceae 树花	+
glabrum 珊瑚枝	+
antartica 石脐	+
Subfloridan 松萝	+

实施例 V

通过混合以下成分制作用于制备冰淇淋的液体预混物:

配料	wt%
脱脂奶粉	11.390
蔗糖	3.410
麦芽糊精 (MD40)	4.000
槐树豆胶	0.072
玉米糖浆 63DE	20.705
瓜尔豆胶	0.048
Genulacta L100	0.020
奶油	9.015
部分水解纤维素粉 RC581	0.240



明胶	0.140
单酸甘油酯(棕榈酸酯)	0.450
香草	0.010
AFP(实施例 IIb)	0.100 或没有(对照)
水	余量

*注: 所添加的 AFP 是使用一些外加水作为稀释剂的浓缩 AFP 溶液, 百分比指 AFP 的量。

该混合物可以方便地在 85℃ 下巴氏灭菌 15 秒并且装罐冷藏。

5 该混合物可以用于制备冰淇淋, 常规家用混合机将其搅打成约 100% 的膨胀度, 接着在家用冷冻机中静止冷冻。

本发明的组合物比对照样品具有明显较好的质地。

使用以下植物来源可以获得同等的结果: saccheraroides 槭、竹、醉鱼草属、圆枝猫尾藓、farinaceae 树花、subfloridana 松萝、连翘属、酢浆草属、trivialis 早熟禾、perenne 毒麦、绒毛草、sterilis 雀麦、Parodiochloa flabellata、antartica 发草、aquatilis 苔草、Colobanthus quitensis 和 tenuis 翦股颖、contracta 羊茅、早熟禾。

实施例 VI

15 通过混合以下成分制作用于制备冰淇淋的液体预混物:

配料	wt%
脱脂奶粉	10.00
蔗糖	13.00
麦芽糊精(MD40)	4.00
槐树豆胶	0.14
乳脂肪	8.00
单酸甘油酯(棕榈酸酯)	0.30
香草	0.01
AFP(实施例 IIb)	0.01 或没有(对照)
水	余量

*注: 所添加的 AFP 是使用一些水稀释的浓缩 AFP 溶液, 百分比指 AFP 的量。

将配料在室温下混合接着在 89℃ 下进行 60 秒的巴氏灭菌。将混合物无菌分装成 500ml 包装，密封并在室温下储藏。

用常规的家用的混合机将混合物搅打成约 70% 的膨胀度接着在静止条件下用家用冷冻机冷冻制备成冰淇淋。经过两个月的储藏之后，本发明的组合物具有比对照样品明显较好的质地。

实施例 VII

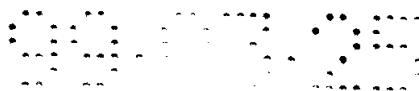
本实施例描述胡萝卜 AFP 的分离和测序。对其它 AFPs 可以使用相似的方法。

10 用预冷的研杵和研钵将适应冷环境的胡萝卜的胡萝卜根组织在 3 体积 (w/v) 缓冲液中匀浆 (20mM 抗坏血酸, 10mM EDTA, 50mM Tris/HCl, pH7.2), 并且过滤通过一层平纹细布。4℃ 下将滤液在 6,000g 离心 10 分钟; 收集上清液并且 4℃ 下在 100,000g 下离心 1 小时。该步骤中的 100,000g 上清液称为可溶性馏分, 而沉淀物称为微粒体馏分。

15 将上清液上样于 30ml 快速流动 Q Sepharose (Pharmacia) 柱, 该柱用 50mM Tris/HCl pH7.4 预先平衡过, 流速为 5ml/min, 所说的流速由 HiLoad 泵 P-50 提供, 通过 Gradifrac 低压色谱系统 (Pharmacia) 在 4℃ 下进行控制, 并且通过 UV 检测器 (Monitor 102, Pharmacia) 在 20 OD 280 下检测洗脱液, 记录在图形记录器上 (REC 102, Pharmacia)。收集 5ml 的馏分。用 50mM Tris/HCl pH7.4 以相同的流速洗涤色谱柱, 直至 OD 280 回到 0。然后使用 150ml Tris/HCl pH7.4 中的 0-0.4M NaCl 梯度, 接着用 2M NaCl 洗柱。按照实施例 I 对洗脱馏分进行液滴测定。

25 收集含抗冻活性的馏分并且使用聚乙二醇如下进行浓缩: 将馏分转移到 10kDa 截止透析管中 (Sigma), 该管已在自来水中洗涤过, 在 50mM EDTA pH7.5 中煮沸 10 分钟并且在 mili Q 水中漂净。用分子量 15,000-20,000 的固体聚乙二醇化合物 (Sigma) 盖住装有将要浓缩样品的透析管, 并且在 4℃ 下保温最多 4 小时, 或者直至透析管内的样品体积减少达 10 倍。

30 将从 Q Sepharose 柱中收集的浓缩物上样于苯基 Sepharose 柱, 或 SMART superdex 75 凝胶渗透色谱柱或 FPLC superdex 75 凝胶渗透色谱柱。



如下通过凝胶渗透色谱纯化胡萝卜根抗冻蛋白:

20 μ l 等分样品上样于 SMART superdex 75 柱 (Pharmacia), 该柱
预先用含 0.15M NaCl 的 50mM Tris/HCl pH7.4 (缓冲液 E) 平衡过,
流速为 40 μ l/min, 并且通过凝胶渗透以相同的流速用平衡缓冲液分
5 离组分。在 OD 280 和 OD 215 下检测洗脱液。在 0.85 和 0.89ml 之间
收集 80 μ l 馏分, 在 0.89 和 1.24ml 之间收集 40 μ l 馏分, 在 1.24 和
3.0ml 之间收集 100 μ l 馏分。通过测定蓝色葡萄聚糖溶液的保留体积
作为柱的外水容积, 为 0.91ml。使用 10 μ l 含 5mg/ml BSA (Mr 66kDa,
保留体积 (V_e)=1.02ml)、3mg/ml 碳酸酐酶 (Mr 29kDa, V_e =1.22ml)、
10 2mg/ml 细胞色素 C (Mr 12.4kDa, V_e =1.41ml) 和 2mg/ml 抑酶肽 (Mr
6.5kDa, V_e =1.59ml) 的溶液校准 superdex 柱, 用 V_e/V_o 对分子量对
数作图得到标准曲线。通过实施例 I 的液滴测定鉴定含抗冻活性的馏
分, 其活性峰保留体积为 1.16ml, 表观分子量为 40kDa。这些测定证
实了冷适应胡萝卜的 38kDa 谱带是抗冻肽。

15 根据 Laemmli (1970) 使用 Biorad 微型系统进行 SDS-PAGE。将要
通过 SDS-PAGE 分析的样品溶解于 SDS-PAGE 样品缓冲液中 (Laemmli
1970), 在干热块上 (Techne) 100 $^{\circ}$ C 下加热 5 分钟并且室温下在
10,000g 下离心 3 分钟。将样品 (10 μ l-50 μ l) 上样于微型凝胶
(Biorad, 0.75、1.0 或 1.5mm 厚, 10、12、15% 丙烯酰胺或 10-20% 梯
20 度丙烯酰胺 (由 Biorad 预先倒胶)) 并且电泳分离。将分离的多肽固定
在凝胶中并且用考马斯蓝 (0.1% (w/v) 考马斯亮蓝在乙酸/甲醇/mili
Q 水中 (5:4:31 体积)) 着色, 或者使用 Biorad 银染试剂盒根据制造
商的说明银染。将凝胶在 Biorad 凝胶空气干燥机中的两片 Gelair
collophane 之间根据制造商的说明进行干燥。使用 Sigma 高和低范
25 围分子量标记试剂盒根据制造商的说明测定 SDS-PAGE 上的表观分子
量。

用冷适应的胡萝卜根和非冷适应的胡萝卜根进行离子交换色
谱。所得的 SDS-PAGE 凝胶显示冷适应的胡萝卜根中存在约 38kDa 的
谱带。这个谱带在非冷适应的根中量少得多。因此这个 (约) 38kDa 的
30 谱带具有抗冻活性。

对于蛋白测序, 按以上实施例的描述纯化约 38kDa 的胡萝卜根蛋
白, 然后为确保进一步纯化, 从 SDS PAGE 凝胶上切下将要被测序的

样品，然后在聚丙烯酰胺凝胶切片中原位进行蛋白分解性消化。

将高纯度的约 38 kDa 蛋白质的制备物上样到 12%聚丙烯酰胺凝胶上，其中仍含有一些少量的杂质蛋白。上样 3 个泳道，每个泳道 2 μ g 蛋白质，并且在凝胶中电泳直至染料前缘到达凝胶末端。然后用 0.2% 考马斯亮蓝 (w/v)、30%甲醇 (v/v)、1%乙酸 (v/v) 给凝胶着色 20 分钟，然后用 30% 甲醇退色直至可以显现蛋白带。通过用上样在相邻泳道的分子量标记进行比较鉴定出 38 kDa 条带，并且用解剖刀刀片切下各泳道的条带，注意排除杂质条带。

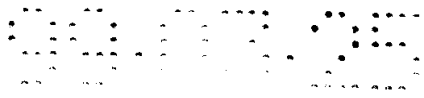
将凝胶切片转移到干净的 eppendorf 管中并且用 0.5ml 的 50% 乙腈 (v/v)、100mM Tris/HCl, pH8.5 洗涤两次。洗涤除去一些考马斯染料并且还使凝胶切片部分脱水。然后从管中取出凝胶切片并且在实验室台上进行空气干燥直至它们明显收缩并开始卷起。然后将它们转移回 eppendorf 管，并且首先用含 1 μ g 内切蛋白酶 Lys C (Boehringer Mannheim) 的 100mM Tris/HCl, pH8.5 10 μ l 再水合。这个蛋白酶特异裂解赖氨酸残基羧基端一侧的多肽链。向凝胶切片进一步加入 Tris 缓冲液直至它们完全再水合，然后将它们在 37 $^{\circ}$ C 下保温 16 小时。

保温之后将 1 μ l 的三氟乙酸添加到管中以停止反应，然后用 0.3ml 的 60% 乙腈 (v/v)、0.1% TFA (v/v) 在 30 $^{\circ}$ C 下洗涤两次，洗涤 30 分钟。这再次使凝胶切片部分脱水引起它们收缩并且洗脱产生的肽。将上清液转移到另一干净的 eppendorf 管，然后在离心式蒸发器中干燥 2 小时直至样品接近干燥，并且用 0.1% TFA 再悬浮至 0.1ml 的体积。

然后通过反相 HPLC 在 Smart 微型纯化系统 (Pharmacia) 中分离肽。将肽消化物上样在用 0.1% TFA (溶剂 A) 平衡过的 C18 柱上 (2.1x100mm)，流速为 0.1 ml/min。然后使用 0-70% 梯度的溶剂 B (90% 乙腈 v/v, 0.085% TFA v/v)，用 70 分钟的时间以相同的流速洗脱柱。在 214nm 下检测光密度并且在馏分收集器中通过手工步进收集各个肽的峰值。通过上样到 492 型 Perkin Elmer 蛋白序列分析仪使用按制造商推荐的液相化学循环来对多肽测序。

在 38kDa 条带中分析了许多多肽片段 (A-E) 并且具有基本上同以下一致的序列：

(A) LEU-PRO-ASN-LEU-PHE-GLY-LYS



(B) ILE-PRO-GLU-GLU-ILE-SER-ALA-LEU-LYS

(C) LEU-THR-X-LEU-ASP-LEU-SER-PHE-ASN-LYS

(D) SER-LEU-ARG-LEU-SER-SER-THR-SER-LEU-SER-GLY-PRO-VAL-
PRO-LEU-PHE-PHE-PRO-GLN-LEU-X-LYS

5 (E) X-X-GLU-VAL-ILE-PRO-X-GLN-LEU-SER-THR-LEU-PRO-ASN-LEU-
LYS

如下制作用于生成抗冻蛋白的细胞培养物:

基于 Gamborg 和 Wetter 1975、Torres 1989、Dodds 和 Roberts 1985 的方法开始新细胞的培养。

10 冷适应的胡萝卜(秋王):首先通过用 10% 梯普尔洗涤剂洗涤将储藏根表面消毒,接着在流动水下洗涤然后在流动水下漂净 15 分钟。将其中可用的胡萝卜(以大小计)去皮。然后将根无菌切割成 0.5cm 的切片,将其放在 70% v/v 乙醇中 10 分钟,同时振摇,接着放入 10% v/v Domestos + 2 滴吐温 20(Sigma)中 25 分钟,也同时振摇。然后,
15 用无菌蒸馏水洗涤切片 3 次。使用无菌解剖刀通过切片切割成大约 0.5cm 直径的圆柱形,并将剩余部分切割成 2-3mm 长,将这些组织片(外植体)无菌转移到含 30g/l 蔗糖、10mg/l 吲哚乙酸(IAA)、0.1mg/l 激动素和 8g/l 专用琼脂的固体 MS 培养基上,该培养基装在 60ml Sterilin 容器中。将外植体在 20℃ 下黑暗处培养。

20 当必要时,将所得的愈伤组织分成更小的部分,接种到新培养基上。然后由活跃生长的愈伤组织开始悬浮培养。

另外,从利兹大学的生物化学和分子生物学系获得胡萝卜细胞悬浮培养品系(NOR 和 OX6)。将 10ml 这些培养物在含 25g/l 蔗糖和 1mg/l 2,4-D 的新鲜 Murashige 和 Skoog 培养基(Sigma)每 7 天进行传代培养。培养物在定轨振荡培养箱中 150rpm 下 25℃ 黑暗培养。
25

对 NOR 培养物进行如下冷处理:

将 18x5ml 7 天 NOR 培养物添加到 18x100ml 装有 45ml 胡萝卜 MS 培养基的锥形瓶中。按前描述将培养物在 25℃ 下培养 4 天,然后将培养箱温度降低至 4℃。旋即去掉两个烧瓶并且按前述收获细胞和培养基,此时为 t=0。剩余的烧瓶在 t=8h、1d(1 天)、2d、4d、7d、9d、
30 11d 和 14d 时收获,一式两份。

使用 NOR 和 OX6 的较大培养物重复冷适应性处理,在 25℃ 下生

长 4d 和 7d 之后转移至 4℃。在 t=0、t=7d 和 t=14d 时收获培养物。除收获外，在每个时间点测定每种培养物的 PCV。

如下制备用于实施例 I 液滴测定的 NOR 冷适应细胞：使用研杵和研钵将快速冷冻的细胞在液氮中研磨成细粉。将粉状样品再悬浮于 2x 5 体积的 10mM EDTA +20mM 抗坏血酸中，旋转混合 30 秒然后在 10,000g 下离心 10 分钟。使用缓冲液对照作为负对照对 10μl 等分的上清液进行液滴测定。在冷适应的细胞和培养基中可以检测到 RI 活性但在非冷适应的样品中没有。

如下分析 NOR 培养物的培养基样品。通过添加 100μl 的 1M 10 Tris/HCl pH7.4 缓冲 NOR 胡萝卜培养基。然后上样于 1ml Q Sepharose 柱 (Pharmacia)，流速为 1ml/min，用 3ml 等分的含 0.5M NaCl 的 50mM Tris/HCl pH7.4 洗脱结合的分子。收集 1ml 馏分。

同样使用阴离子交换法分馏出 t=0、2d、4d、7d、11d 的冷适应 15 培养基样品和 t=7d 的非冷适应培养基样品。通过实施例 I 描述的夹层液滴测定法测试馏分的活性。

如下通过凝胶渗透色谱法纯化培养基的抗冻活性。将上述 14 个 20 来自 Q Sepharose 柱的冷适应 0.5M NaCl 洗脱物 (馏分 2) 用丙酮沉淀并且将沉淀物再悬浮于 50μl 的 50mM Tris/HCl+0.15M NaCl pH7.2 中。然后在 10,000g 下离心 10 分钟，并且将 20μl 上样到 Pharmacia SMART 系统的 Superdex 75 凝胶渗透柱上。流速 40μl/min 且流动相是 50mM Tris/HCl+0.15M NaCl pH7.2。收集 80μl 的馏分并且液滴测定。使用来自 Q Sepharose 柱的 t=14d 非冷适应 0.5M NaCl 洗脱物和新鲜培养基重复该过程。

可以按以上所述通过 SDS PAGE 进行活性蛋白质的进一步分离。

25

实施例 VIII

通过将新拔的冷适应的胡萝卜在冷水中洗涤来制备来自冷适应性胡萝卜根的根提取物。除去顶部并且使用家用榨汁机 (Russell Hobbs, 9915 型) 提取汁液。将汁液冷冻成 1 升的块状物并且在 -20℃ 30 下储藏，然后再收集用于在冰淇淋中的用途试验。

将胡萝卜 AFP 添加到以下冰淇淋配方中

配料	重量份
脱脂奶粉	10.000
蔗糖	13.000
MD 40	4.000
槐树豆胶	0.144
Genulacta L100	0.016
MGP	0.300
乳脂肪	8.000
香草	0.012
水	64.528
胡萝卜提取物(来自冷适应胡萝卜, 每 kg 含 1-10mg AFP)	4.472

将上述配方冷冻并且充气到 106% 的膨胀度制备冰淇淋。

对新鲜样品和已在 -10°C 下储藏 10 天的溢处理样品进行测定。

作为比较, 按相同方式测定不含胡萝卜提取物的样品。测定如下

5 进行:

将样品在 -18°C 下于 Prolan 环境室中平衡大约 12 小时。每批冰淇淋中选择 3 个样品作为代表, 并且在低温控制器温度控制室中通过从每个块的中央涂一薄片冰淇淋到显微玻片上来制备每个的载片。向载片滴加一滴白色酒精然后盖上盖片。之后将每个载片转移到控温显微镜载物台 (Leit LaborLux S, Leica x10 物镜, 温度 -18°C)。收集冰晶的图像 (大约 400 个单独的冰晶) 并且通过影像摄像机 (三洋 CCD) 传送到图像储存和分析系统 (LEICA Q520MC)。

15 通过绘画出周边然后将整个晶体加亮来人工突出储藏冰晶的图像。然后使用图像分析软件测定加亮冰晶的图像, 所说的软件计算完成最长直线 (长)、最短直线 (宽)、长宽比所需要的像素数目。将每批冰淇淋各个冰晶的数据输入电子制表软件, 在其中进行数据组的分析, 以发现平均和标准的偏差。

使用 Housfield H10KM 通用试验机、Housfield 100N 负荷电池和 10 cm 圆柱形不锈钢探针进行冰淇淋的硬度测定。在设定为 -18°C

的 Prolan 温度控制室中通过 16 小时的保温用 486ml 冰淇淋块制备冰淇淋样品。

从 Prolan 温度控制室中取出冰淇淋块并放入 Housfield H10KM 通用试验机中。将 10cm 圆柱形探针以 400mm/min 的恒速推进冰淇淋块中，达到 20mm 的深度。记录推压时的最大力并且表示为冰淇淋的硬度。如果观察到样品有断裂或脆性裂缝，则在右栏中指示出来。

获得以下结果

样品	冰晶大小参数				原料特性	
	平均 冰晶长度/ μm	平均 冰晶宽度/ μm	平均 冰晶成形系数/-	平均 冰晶长宽比/-	硬度 /N	脆性裂 缝观察 比 n
胡萝卜 AFP -新鲜	26.79 \pm 1.3	19.00 \pm 0.9	1.15 \pm 0.013	1.43 \pm 0.024	40.8	是
胡萝卜 AFP -溢处理	33.48 \pm 1.3	24.61 \pm 0.9	1.13 \pm 0.013	1.37 \pm 0.020	59.9	是
对照 -新鲜	33.67 \pm 1.1	24.79 \pm 0.8	1.12 \pm 0.008	1.38 \pm 0.018	27.3	否
对照 -溢处理	61.77 \pm 2.7	46.54 \pm 2.0	1.11 \pm 0.010	1.37 \pm 0.020	32.7	否

可以得出以下结论:

- a) 初始冰晶大小在含胡萝卜 AFP 的冰淇淋中较小，因此胡萝卜 AFP 抑制了再结晶抑制性。
 - b) 胡萝卜 AFP 冰淇淋的冰晶阻碍了它们再结晶的过程。
 - c) 胡萝卜 AFP 冰淇淋的冰晶形状与常规冰淇淋可见的冰晶形状没有显著差别。
 - d) 含胡萝卜 AFP 的冰淇淋的原料特性与常规冰淇淋相比有所改进。
- 15 即，冰淇淋比常规冰淇淋硬但仍比含如鱼 AFP 的冰淇淋软。其次，含胡萝卜 AFP 的冰淇淋观察到有裂缝。

使用毛鹤草属或 squarrosus 灯心草可以获得同样非常良好的结果。

实施例 IX

本实施例描述从冬黑麦中分离各种蛋白质以及其测试。

5 将经过 30 天冷适应的黑麦植物的叶切割成 3cm 长并且用蒸馏水彻底洗涤以除去任何细胞内含物。将叶片在纸巾上轻拍干燥并且全部浸入 5mM EDTA、10mM 抗坏血酸、2mM 乙酸、2mM 苯甲脒和 1mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的提取介质中。然后在布其勒烧瓶中真空浸润 60 分钟，之后取出叶子并且完全拍干。然后将它们沿纵向排列在切掉的塑料注射器管中并且在 2000xg 下温和离心 30 分钟。将质外体提取物收集在注射器下面的 eppendorf 管中。

10 使用 Amicon 超滤器用 PM10 膜将质外体提取物浓缩 7 倍。通过将 50 微升的浓缩质外体提取物上样到 SMART 分离系统的大小排阻 Superdex 75 PC 3.2/3.0 (分离范围 3-70kDa) 色谱柱上来进行初始纯化，所说的系统均来自 Pharmacia。缓冲液是 pH 为 9.5 的 50mM Tris/HCl。分离在 50 μ l/min 流速下进行并且收集 50 μ l 馏分直到体
15 积为 2.5ml，并且按实施例 1 的描述进行再结晶的测定。

将活性馏分上样到强阴离子交换 MonoQ FPLC 柱 (Pharmacia) 上，该柱用 pH9.5 的 50mM Tris/HCl 平衡过，并且使用直到 0.5M NaCl 线性梯度的相同缓冲液洗脱蛋白质。用 25 分钟的时间将洗脱缓冲液添加到浓度 0.5M 的 NaCl 中，保持 10 分钟并在 15 分钟内减少到 0M。
20 在 1ml/min 的流速下进行色谱并收集 1ml 馏分。将经实施例 I 测试为阳性的馏分在 7000rps 的 Centrican PM10 离心式浓缩机中浓缩，直至体积减少为 50 μ l 并且第二次上样在 S75 柱上。满足实施例 1 测试的馏分具有一个在大约 150mM 盐处的峰。

在 SDS PAGE 上分离该活性馏分 (与实施例 VII 方法相同)。这证
25 实了 32kDa 是活性馏分。

冬黑麦的 32kDa 馏分在用于制备糖食制品的用途中可能是有利的。