

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2012年3月1日(01.03.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/026596 A1

- (51) 国際特許分類:
A23L 3/37 (2006.01) C07K 14/46 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/069338
- (22) 国際出願日: 2011年8月26日(26.08.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-189723 2010年8月26日(26.08.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ニチレイフーズ(NICHIREI FOODS INC.) [JP/JP]; 〒1048402 東京都中央区築地六丁目19番20号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小柳津 新一(OYAIZU Shinichi) [JP/JP]; 〒1048402 東京都中央区築地六丁目19番20号 株式会社ニチレイ内 Tokyo (JP). 井上 敏文(INOUE Toshifumi) [JP/JP]; 〒2610002 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイフーズ 研究開発部内 Chiba (JP). 鍛冶 大輔(KAJI Daisuke) [JP/JP]; 〒2610002 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイフーズ 研究開発部内 Chiba (JP). 大森 敏伸(OOMORI Toshinobu) [JP/JP]; 〒2610002 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイフーズ 研究開発部内 Chiba (JP). 小泉 雄史(KOIZUMI Takeshi) [JP/JP]; 〒2610002 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイフーズ 研究開発部内 Chiba (JP). 石井

寛崇(ISHII Hirotaka) [JP/JP]; 〒2610002 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイフーズ 研究開発部内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 棚井 澄雄, 外(TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR INCREASING THERMAL HYSTERESIS ACTIVITY, METHOD FOR REDUCING THERMAL INACTIVATION OF THERMAL HYSTERESIS ACTIVITY, AND COMPOSITION FOR INCREASING THERMAL HYSTERESIS ACTIVITY

(54) 発明の名称: 熱ヒステリシス活性増加方法、熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法、及び熱ヒステリシス活性増加用組成物

(57) Abstract: The present invention relates to a method for increasing the thermal hysteresis activity exhibited by a composition which contains an antifreeze protein and water, said method comprising adding, to the water, the antifreeze protein and one or more substances selected from the following group (A) of additives. According to the present invention, a method, whereby the thermal hysteresis activity of an antifreeze protein is further increased, can be provided. Group (A) of additives: organic acids, organic acid salts, inorganic salts, amino acids, amino acid salts, ammonium salts, saccharides, sugar alcohols, urea, guanidine hydrochloride, spermidine, spermine and N,N-dimethylformamide.

(57) 要約: 本発明は、不凍蛋白質と水とを含む組成物の示す熱ヒステリシス活性を増加させる方法であって、前記水に、前記不凍蛋白質と下記添加剤群Aから選ばれる何れか一種以上の物質とを混合することを含む、前記熱ヒステリシス活性を増加させる方法に関する。本発明によれば、不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性をさらに増加させる方法を提供できる。添加剤群A: 有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、スベルミジン、スペルミン、及びN, N-ジメチルホルムアミド

WO 2012/026596 A1

明 細 書

発明の名称：

熱ヒステリシス活性増加方法、熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法、
及び熱ヒステリシス活性増加用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、熱ヒステリシス活性増加方法、熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法、及び熱ヒステリシス活性増加用組成物に関する。

本願は、2010年8月26日に、日本に出願された特願2010-189723号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 不凍蛋白質 (Antifreeze Protein; AFP) は、水溶液中の氷の結晶表面に結合することによって、前記氷の結晶の成長を抑制する作用、及び前記水溶液の凝固点を低下させる作用を有する。このような性質をもつ不凍蛋白質は、1969年に南極に生息する魚の血漿から発見されたのを端緒に、現在までに、魚類、昆虫、植物、微生物、又は担子菌類など生物界の広範な領域から種々の不凍蛋白質が発見されている。

[0003] 前記不凍蛋白質を含む水溶液は熱ヒステリシスと呼ばれる特異な性質（融点と凝固点が異なる性質）を有することも知られている。

まず、不凍蛋白質を含む水溶液を冷却して完全に前記水溶液を凍結させて氷にする（ステップ1）。次に徐々に昇温させると前記氷が融解する温度として融点が求まる（ステップ2）。つづいて再度徐々に温度を下げると融点以下であるにも関わらず、氷の結晶が成長しない温度帯が観測され、さらに温度を下げると一気に氷の結晶が成長する温度として凝固点が求まる（ステップ3）。このときの融点と凝固点の温度差は、不凍蛋白質の活性を示す指標として使用されており、それは熱ヒステリシス活性 (ΔT) と呼ばれている。

[0004] 水溶液中の不凍蛋白質の濃度と前記溶液の熱ヒステリシス活性との関係は

、ある濃度までは熱ヒステリシス活性の増加と正の相関を示すが、ある濃度を超えると、それ以上高濃度にしても熱ヒステリシス活性が増加しなくなる。

[0005] 魚類由来の公知の不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性は0. 1～2℃程度であるが、昆虫由来の不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性は、約10℃に達するものも知られる。魚類由来の不凍蛋白質の水溶液における含有濃度を高くした場合であっても、昆虫由来の不凍蛋白質が示す熱ヒステリシス活性（例えば $\Delta T = 5^{\circ}\text{C}$ ）に達する例は知られていない。

[0006] このような熱ヒステリシス活性を有する不凍蛋白質を、アイスクリームや冷凍食品に混合することによって、前記アイスクリームの口どけを滑らかにすることや前記冷凍食品における氷結晶成長による食品素材の劣化を防ぐこと等が検討されている。不凍蛋白質を産業用途に用いるためには、安価で大量に不凍蛋白質を供給できる方法が必要であり、例えば、魚類由来の不凍蛋白質をグラム単位で製造する方法が開示されている（特許文献1参照）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2004-083546号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、昆虫以外の不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性は必ずしも十分ではないので、前記熱ヒステリシス活性をさらに増加させる方法が望まれている。また、不凍蛋白質を含む食品等を加熱して殺菌することを想定した場合に、前記加熱による前記熱ヒステリシス活性の低下を抑制できることが望まれている。

[0009] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性をさらに増加させる方法を提供することを課題とする。

また、本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、不凍蛋白質を含む

食品等を加熱して殺菌することを想定した場合に、前記加熱による前記熱ヒステリシス活性の低下を抑制する方法を提供することを課題とする。

さらに、本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性を増強させることができる、又は不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性の、加熱による低下を抑制することができる、熱ヒステリシス活性増加用組成物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明の請求項 1 に記載の熱ヒステリシス活性増加方法は、不凍蛋白質と水とを含む組成物の示す熱ヒステリシス活性を増加する方法であって、前記水に、前記不凍蛋白質と下記添加剤群 A から選ばれるいずれか一種以上とを溶解することを特徴とする。

添加剤群 A ; 有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、スペルミジン、スペルミン、及び N, N-ジメチルホルムアミド

[0011] 本発明の請求項 2 に記載の熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法は、不凍蛋白質と水とを含む組成物の示す熱ヒステリシス活性が、加熱処理の後で低下してしまう程度を減少させる方法であって、前記水に、前記不凍蛋白質と下記添加剤群 B から選ばれるいずれか一種以上とを溶解することを特徴とする。

添加剤群 B ; 有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、アセトン、ジオキサン、2-クロロエタノール、及び N, N-ジメチルホルムアミド

[0012] 本発明の請求項 3 に記載の熱ヒステリシス活性増加用組成物は、不凍蛋白質と添加剤とを含む熱ヒステリシス活性増加用組成物であって、前記添加剤には、有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、スペルミジン、スペルミン、アセトン、ジオキサン、2-クロロエタノール、及び N, N-ジメチルホルムアミドのうち何れか一種以上が含まれることを特徴とする、熱ヒス

テリシス活性増加用組成物。

[0013] 本発明の請求項4に記載の熱ヒステリシス活性増加方法は、請求項1において、前記不凍蛋白質が魚類由来であることを特徴とする。

本発明の請求項5に記載の熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法は、請求項2において、前記不凍蛋白質が魚類由来であることを特徴とする。

本発明の請求項6に記載の熱ヒステリシス活性増加用組成物は、請求項3において、前記不凍蛋白質が魚類由来であることを特徴とする。

[0014] すなわち、本発明は以下の態様を有する。

(1) 不凍蛋白質と水とを含む組成物の示す熱ヒステリシス活性を増加させる方法であって、前記水に、前記不凍蛋白質と下記添加剤群Aから選ばれる何れか一種以上の物質とを混合することを含む、前記熱ヒステリシス活性を増加させる方法。

添加剤群A；有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、スペルミジン、スペルミン、及びN，N-ジメチルホルムアミド

(2) 不凍蛋白質と水とを含む組成物の示す熱ヒステリシス活性の、加熱処理後の失活を低減させる方法であって、前記水に、前記不凍蛋白質と下記添加剤群Bから選ばれる何れか一種以上の物質とを混合することを含む、前記熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。

添加剤群B；有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、アセトン、ジオキサン、2-クロロエタノール、及びN，N-ジメチルホルムアミド

(3) 不凍蛋白質と水と添加剤とを含む熱ヒステリシス活性増加用組成物であって、前記添加剤は、有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、スペルミジン、スペルミン、アセトン、ジオキサン、2-クロロエタノール、及びN，N-ジメチルホルムアミドからなる群から選ばれる何れか一種以上の物質を含む、熱ヒステリシス活性増加用組成物。

(4) 前記不凍蛋白質が魚類由来である、(1)に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。

(5) 前記不凍蛋白質が魚類由来である、(2)に記載の熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。

(6) 前記不凍蛋白質が魚類由来である、(3)に記載の熱ヒステリシス活性増加用組成物。

[0015] (7) 前記不凍蛋白質がⅠ型の不凍蛋白質である、(4)に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。

(8) 前記不凍蛋白質がⅠⅠ型の不凍蛋白質である、(4)に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。

(9) 前記不凍蛋白質がⅠⅠⅠ型の不凍蛋白質である、(4)に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。

(10) 前記不凍蛋白質がA F G P型の不凍蛋白質である、(4)に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。

[0016] (11) 前記不凍蛋白質がⅠ型の不凍蛋白質である、(5)に記載の熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。

(12) 前記不凍蛋白質がⅠⅠ型の不凍蛋白質である、(5)に記載の熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。

(13) 前記不凍蛋白質がⅠⅠⅠ型の不凍蛋白質である、(5)に記載の熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。

(14) 前記不凍蛋白質がA F G P型の不凍蛋白質である、(5)に記載の熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。

[0017] (15) 前記水、前記不凍蛋白質及び前記添加剤の混合物における前記不凍蛋白質の含有濃度が、0.01～10質量%である、(1)に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。

(16) 前記水、前記不凍蛋白質及び前記添加剤の混合物における前記不凍蛋白質の含有濃度が、0.01～10質量%である、(2)に記載の熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。

(17) 前記熱ヒステリシス活性増加用組成物における、前記不凍蛋白質の含有濃度が、0.01～10質量%である、(3)に記載のヒステリシス活性増加用組成物。

発明の効果

[0018] 本発明の熱ヒステリシス活性増加方法によれば、不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性をさらに増加させることができる。

また、本発明の熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法によれば、不凍蛋白質を含む食品等を加熱して殺菌することを想定した場合に、前記加熱による、前記不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性の低下を抑制することができる。

さらに、本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物によれば、不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性をさらに増加させることができ、又は不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性の、加熱による低下を抑制することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]熱ヒステリシス活性測定時の試料の温度変化を示す図である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明について詳しく説明する。

<熱ヒステリシス活性増加方法>

本発明の第一の態様である熱ヒステリシス活性増加方法は、不凍蛋白質と水とを含む組成物の示す熱ヒステリシス活性を増加する方法であって、前記水に、前記不凍蛋白質と下記添加剤群Aから選ばれる何れか一種以上の物質とを混合する方法である。

添加剤群A；有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、スペルミジン、スペルミン、及びN，N-ジメチルホルムアミド

[0021] 前記水は、本発明の効果を損なわないものであれば他の物質を含んだ水溶液又は水含有物であってもよい。本発明の混合物は、水（前記水溶液及び前

記水含有物も含む)、前記不凍蛋白質、及び前記添加剤を混合した混合物である。

[0022] 前記混合物は水を主成分として含有するものであることが好ましい。このとき、前記混合物が前記添加剤を含むことにより、前記混合物の熱ヒステリシス活性を、単に不凍蛋白質を含むだけで前記添加剤を含有しない場合よりも、さらに増加させることができる。すなわち、前記添加剤は、不凍蛋白質が本来有する熱ヒステリシス活性を増強(促進)する効果を奏する。

[0023] 本発明の熱ヒステリシス活性増加方法における不凍蛋白質としては、熱ヒステリシス活性を有するものであれば特に制限されず、公知の不凍蛋白質を用いることができる。

[0024] 例えば、前記不凍蛋白質としては、ギスカジカ属(*Myoxocephalus*)、ツマグロカジカ属(*Gymnocanthus*)、ヨコスジカジカ属(*Hemilepidotus*)、サラサカジカ属(*Furcina*)、ワカサギ属(*Hypomesus*)、シシャモ属(*Spirinchus*)、カラフトシシャモ属(*Malilotus*)、ホッケ属(*Pleurogrammus*)、メバル属(*Sebastes*)、ニシン属(*Clupea*)、マコガレイ属(*Limanda*)、クロガレイ属(*Liopsetta*)、サメガレイ属(*Clidoderma*)、ソウハチ属(*Cleisthenes*)、ババガレイ属(*Microstomus*)、シュムシュガレイ属(*Lepidopsetta*)、ヌマガレイ属(*Platichthys*)、イシガレイ属(*Kareius*)、ムシガレイ属(*Eopsetta*)、マダラ属(*Gadus*)、スケトウダラ属(*Theragra*)、イカナゴ属(*Ammodytes*)、シワイカナゴ属(*Hypoptychus*)、マアジ属(*Trachurus*)、シチロウウオ属(*Brachyopsis*)、ニシキギンボ属(*Pholis*)、オキカズナギ属(*Opisthocentrus*)、ナガガジ属(*Zoarces*)、ドロギンボ属(*Ascolidia*)、又はムロランギンボ属(*Pholidapus*)に属する魚種由来のものが挙げられる。

[0025] 具体的には、前記不凍蛋白質としては、タンパク質の採取源が、ギスカジカ (*Myoxocephalus stelleri* Tilesius)、ツマグロカジカ (*Gymnocanthus herzensteini* Jordan et Starks)、トゲカジカ (*Myoxocephalus polyacanthocephalus* (Pallas))、ナメヨコスジカジカ (*Hemilepidotus jordani* Bean)、キヌカジカ (*Furcina osimae* Jordan et Starks)、チカ (*Hypomesus pretiosus japonicus* (Brevoort))、イシカリワカサギ (*Hypomesus olidus* (Dallas))、シシャモ (*Spirinchus lanceolatus* (Hikita))、カラフトシシャモ (*Mallotus villosus* (Muller))、キタノホッケ (*Pleurogrammus monopterygius* (Pallas))、ヤナギノマイ (*Sebastes steindachneri* Hilgendorf)、ニシン (*Clupea pallasii* Valenciennes)、マガレイ (*Limanda herzensteini* Jordan et Snyder)、スナガレイ (*Limanda punctatissima* (Steindachner))、クロガシラガレイ (*Limanda schrenki* Schmidt)、コガネガレイ (*Limanda aspera* (Pallas))、クロガレイ (*Liopsetta obscura* (Herzenstein))、サメガレイ (*Clidoderma asperrimum* (Temminck et Schlegel))、ソウハチ (*Cleisthenes pinetorumherzensteini* (Schmidt))、ババガレイ (*Microctomus achne* (Jordan et Starks))、アサバガレイ (*Lepidopsetta mochigarei* Snyder)、ヌマガレイ (*Platichthys stellatus* (Pallas))、イシガレイ (Kare

ius bicoloratus (Basilewsky))、ムシガレイ (*Eopsetta grigorjewi* (Herzenstein))、マダラ (*Gadus macrocephalus* Tilesius)、スケトウダラ (*Theragra chalcogramma* (Pallas))、イカナゴ (*Ammodytes personatus* Girard)、シワイカナゴ (*Hypoptychus dybowskii* Steindachner)、マアジ (*Trachurus japonicus* (Temminck et Schlegel))、シチロウウオ (*Brachyopsis rostratus* (Tilesius))、ニシキギンポ (*Pholis picta* (Kner))、ガジ (*Opisthocentrus ocellatus* (Tilesius))、ナガガジ (*Zoarces elongatus* Kner)、ドロギンポ (*Ascoldia variegata knipowitschii* Soldatov)、又はムロランギンポ (*Pholidapous dybowskii* (Steindachner)) に属する魚種由来のものが挙げられる。

[0026] 魚類が自ら生産する不凍蛋白質は4つのタイプがあり、Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型及びAFGP型に分類されている。魚類由来のⅠ型蛋白質は分子量約3.3~5.0kDaであり、 α -helicalの構造を有する。

魚類由来のⅡ型蛋白質は分子量約14kDa以下であり、S-S結合の多いC型レクチン様の構造を有する。

魚類由来のⅢ型蛋白質は分子量約7kDa以下であり、2層のコイル構造を特徴とするモチーフ (two-fold symmetry motif又はpretzel foldと呼ばれる) で特徴づけられる構造を有する。

魚類が自ら生産する不凍糖蛋白質 (AFGP) は、分子量約2.2~3.3kDaであり、Ala-Ala-Thrの繰り返し単位で構成され、Thrの位置に糖が結合した構造を有する。

[0027] 上記の中でも、トウガレイ (学名 *Pleuronectes pinnifasciatus*) 由来のⅠ

型の不凍蛋白質、チカ（学名Hypomesus pretiosus, Japonicus (Brovoort)) 由来のⅠⅠ型の不凍蛋白質、ナガガジ（学名Zoarccs elongatus Kner）由来のⅠⅠⅠ型の不凍蛋白質、又はコマイ（学名Eleginus gracilis）由来のA F G P型の不凍蛋白質等は、本発明の効果が十分に得られるため好適な不凍蛋白質として挙げられる。

本発明の効果を損なわないものであれば、本発明のⅠ型の不凍蛋白質はトウガレイ由来に限定されず、本発明のⅠⅠ型の不凍蛋白質はチカ由来に限定されず、本発明のⅠⅠⅠ型の不凍蛋白質はナガガジ由来に限定されない。

[0028] 本発明の熱ヒステリシス活性増加方法における不凍蛋白質は、魚、植物、微生物、又は担子菌類等から抽出及び精製して得られたものを用いても良いし、公知の遺伝子工学的手法を用いて大腸菌等の微生物や昆虫細胞等の培養細胞中で、不凍蛋白質を発現させたものを抽出及び精製して得られたものを用いることもできる。

[0029] 本発明の熱ヒステリシス活性増加方法における、魚類由来の不凍蛋白質の前記混合物中における含有濃度としては、0.01～10質量%が好ましく、0.05～10質量%がより好ましく、0.1～10質量%がさらに好ましく、0.1～5質量%が特に好ましい。

この含有濃度の範囲の下限値以上であると本発明の効果が十分に得られ、この含有濃度の範囲の上限値付近で前記混合物の熱ヒステリシス活性を増加させる効果は頭打ちとなる。

[0030] 本発明の熱ヒステリシス活性増加方法における前記添加剤は、有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、スペルミジン、スペルミン、及びN，N－ジメチルホルムアミドのうち何れか1種以上の物質であり、前記混合物が前記不凍蛋白質と水のみを含む場合（前記添加剤を含まない場合）の熱ヒステリシス活性よりも前記混合物の熱ヒステリシス活性を増加させることができるものである。前記添加剤は、1種を単独で用いても良いし、2種以上を組み合わせ用いても良い。

[0031] 前記有機酸の好適なものとしては、クエン酸、リンゴ酸、マレイン酸、酒石酸、酢酸、及びL-アスコルビン酸などが挙げられる。前記有機酸の前記混合物中における含有濃度としては、0.1～3 Mが好ましく、0.1～1 Mがより好ましく、0.5～1 Mがさらに好ましく、0.8～1 Mが特に好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0032] 前記有機酸塩の好適なものとしては、クエン酸ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、リンゴ酸二ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、酢酸カルシウム、が挙げられる。前記有機酸塩の前記混合物中における含有濃度としては、0.1～3 Mが好ましく、0.1～1 Mがより好ましく、0.5～1 Mがさらに好ましく、0.8～1 Mが特に好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0033] 前記無機塩の好適なものとしては、塩化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、硫酸カリウム、塩化カリウム、酢酸カリウム、炭酸カリウム、硝酸カリウム、塩化カルシウム、及び硝酸カルシウムなどが挙げられる。前記無機塩の前記混合物中における含有濃度としては、0.1～3 Mが好ましく、0.1～1 Mがより好ましく、0.5～1 Mがさらに好ましく、0.8～1 Mが特に好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0034] 前記アミノ酸又はアミノ酸塩の好適なものとしては、シスチン、アスパラギン、グルタミン、リジン、アルギニン、アルギニン塩酸塩、グリシン、及びヒスチジンが挙げられる。前記アミノ酸又はアミノ酸塩の前記混合物中における含有濃度としては、0.1～1 Mが好ましく、0.5～1 Mがより好ましく、0.8～1 Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0035] 前記アンモニウム塩の好適なものとしては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸二水素アンモニウム、クエン酸三アンモニウム、クエン酸

鉄アンモニウム、炭酸水素アンモニウム、アルギン酸アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム、クエン酸二アンモニウム、亜硫酸アンモニウム（一水和物）、チオ硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、及び酢酸アンモニウムなどが挙げられる。前記アンモニウム塩の前記混合物中における含有濃度としては、0.01～3 Mが好ましく、0.1～1 Mがより好ましく、0.5～1 Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0036] 前記糖類の好適なものとしては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトース、トレハロース、ラフィノース、及びキシロースが挙げられる。前記糖類の前記混合物中における含有濃度としては、0.1～1 Mが好ましく、0.2～0.8 Mがより好ましく、0.4～0.6 Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0037] 前記糖アルコールの好適なものとしては、ソルビトール、及びグリセリンが挙げられる。前記糖アルコールの前記混合物中の含有濃度としては、0.1～1 Mが好ましく、0.2～0.8 Mがより好ましく、0.4～0.6 Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0038] 前記添加剤として尿素を用いる場合、前記混合物中の尿素の含有濃度は、0.01～1 Mが好ましく、0.1～1 Mがより好ましく、0.5～1 Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

前記添加剤としてグアニジン塩酸塩を用いる場合、前記混合物中のグアニジン塩酸塩の含有濃度は0.001～1 Mが好ましく、0.01～1 Mがより好ましく、0.1～1 Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0039] 前記添加剤としてスペルミジンを用いる場合、前記混合物中のスペルミジンの含有濃度は0.001～1 Mが好ましく、0.01～1 Mがより好まし

く、0.1～1 Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

前記添加剤としてスペルミンを用いる場合、前記混合物中のスペルミンの含有濃度は0.001～1 Mが好ましく、0.01～1 Mがより好ましく、0.1～1 Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0040] 前記添加剤としてN, N-ジメチルホルムアミドを用いる場合、前記混合物中のN, N-ジメチルホルムアミドの含有濃度は0.1～6体積%が好ましく、2～6体積%がより好ましく、3～6体積%がさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0041] ここで例示した添加剤は、それ単独では、熱ヒステリシス活性を生じない。つまり、前記混合物に前記不凍蛋白質が含まれない場合には、前記混合物の熱ヒステリシス活性は実質的に生じない。

[0042] 前記不凍蛋白質と前記添加剤との好ましい組み合わせとしては、下記の(A1)～(A5)が挙げられる。これらの組み合わせであると、前記混合物の熱ヒステリシス活性を十分に増加させることができる。

(A1) トウガレイ由来のI型の不凍蛋白質に対しては、クエン酸三ナトリウム、酢酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、リンゴ酸二ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、重炭酸ナトリウム、酢酸カリウム、及び炭酸カリウムのうち、何れか1以上の物質を前記添加剤として用いることが好ましい。

(A2) カジカ由来のI型の不凍蛋白質に対しては、塩化ナトリウムを前記添加剤として用いることが好ましい。

[0043] (A3) チカ由来のII型の不凍蛋白質に対しては、硫酸アンモニウムを前記添加剤として用いることが好ましい。

(A4) ナガガジ由来のIII型の不凍蛋白質に対しては、クエン酸三ナトリウム、グアニジン塩酸塩、アルギニン、グリシン、スペルミジン、スペルミン、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、クエン酸三アンモニウム、

炭酸水素アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム、マルトース、及びラフィノースのうち、何れか1以上の物質を前記添加剤として用いることが好ましい。

[0044] (A5) コマイ由来のAFGP型の不凍蛋白質に対しては、クエン酸、リンゴ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸三ナトリウム、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、リンゴ酸二ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、重炭酸ナトリウム、酢酸カリウム、炭酸カリウム、グアニジン塩酸塩、グリシン、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム、クエン酸二アンモニウム、亜硫酸アンモニウム（一水和物）、チオ硫酸アンモニウム、及びガラクトースのうち、何れか1以上の物質を前記添加剤として用いることが好ましい。

[0045] 本発明の熱ヒステリシス活性増加方法は、前記混合物の調製方法又は製造方法としての側面を有する。

本発明の熱ヒステリシス活性増加方法における前記混合物の調製方法としては、前記不凍蛋白質と前記添加剤と前記水とが均一に混合できる方法であれば特に制限されない。例えば、前記不凍蛋白質と前記添加剤とを前記所定濃度になるように水に溶解させた水溶液として混合物を調製する方法が挙げられる。前記水溶液には、前記不凍蛋白質や前記添加物以外のものを含有させてもよい。

[0046] 前記混合物の例として、例えば食品が挙げられ、好ましくはアイスクリーム、又はアイスクャンデー等の氷菓子、若しくは冷凍麺類、又は冷凍ハンバーグ等の冷凍加工食品が挙げられる。

本発明の前記不凍蛋白質と添加剤と水とを含む混合物が食品である場合、前記食品の熱ヒステリシス活性が増加することにより、前記食品の保冷時における氷結晶の成長が妨げられ、また氷結晶の再結晶化が抑制されるため、前記食品の口当たりがまろやかな好ましいものとすることができる。

[0047] また、前記混合物の別の例として、自動車ラジエータに用いる不凍液、生

鮮食品を保冷するための保冷剤、並びに医薬品及びバイオ研究用途などに用いられる微生物や細胞等の冷凍保存用保護溶液等の食品以外の用途も挙げられる。

[0048] <熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法>

本発明の第二の態様である熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法は、不凍蛋白質と水とを含む組成物の示す熱ヒステリシス活性が、加熱処理の後で低下してしまう程度を減少させる方法であって、前記水に、前記不凍蛋白質と下記添加剤群Bから選ばれる何れか一種以上の物質とを混合する方法である。

添加剤群B；有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、アセトン、ジオキサン、2-クロロエタノール、及びN，N-ジメチルホルムアミド

[0049] すなわち本発明の第二の態様である不凍蛋白質と水とを含む組成物の示す熱ヒステリシス活性の、加熱処理後の失活を低減させる方法は、水に不凍蛋白質と前記添加剤群Bから選ばれる何れか一種以上の物質とを混合すること、及び前記混合物を加熱することを含む。

[0050] 前記水は、本発明の効果を損なわないものであれば他の物質を含んだ水溶液又は水含有物であってもよい。本発明の混合物は、水（前記水溶液及び前記水含有物も含む）、前記不凍蛋白質、及び前記添加剤を混合した物である。

[0051] 前記混合物は水を主成分として含有するものであることが好ましい。

[0052] 通常、前記添加剤を含まない、本発明とは異なる混合物を加熱処理する（例えば40℃～120℃で30分間）と、前記熱ヒステリシス活性は低下してしまう（これを熱失活と呼ぶ。）。これは、前記不凍蛋白質が前記加熱処理によって変性してしまうからだと考えられる。

しかし、本発明における前記混合物は前記添加剤を含むので、前記混合物を加熱処理した場合でも、前記加熱処理前に有していた熱ヒステリシス活性の低下を抑制することができる。すなわち、本発明の熱ヒステリシス活性の

熱失活の低減方法における前記添加剤は、前記不凍蛋白質に耐熱性を付与する効果を奏する。これは、前記不凍蛋白質が加熱処理によって熱変性してしまう程度を、前記添加剤が低減することができるからだと推測される。

[0053] 本発明の熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法における前記不凍蛋白質としては、熱ヒステリシス活性を有するものであれば特に制限されず、公知の不凍蛋白質を用いることができる。

[0054] 例えば、前記不凍蛋白質としては、ギスカジカ属 (*Myoxocephalus*)、ツマグロカジカ属 (*Gymnocanthus*)、ヨコスジカジカ属 (*Hemilepidotus*)、サラサカジカ属 (*Furcina*)、ワカサギ属 (*Hypomesus*)、シシャモ属 (*Spirinchus*)、カラフトシシャモ属 (*Malilotus*)、ホッケ属 (*Pleurogrammus*)、メバル属 (*Sebastes*)、ニシン属 (*Clupea*)、マコガレイ属 (*Limanda*)、クロガレイ属 (*Liopsetta*)、サメガレイ属 (*Clidoderma*)、ソウハチ属 (*Cleisthenes*)、ババガレイ属 (*Microstomus*)、シュムシュガレイ属 (*Lepidopsetta*)、ヌマガレイ属 (*Platichthys*)、イシガレイ属 (*Kareius*)、ムシガレイ属 (*Eopsetta*)、マダラ属 (*Gadus*)、スケトウダラ属 (*Theragra*)、イカナゴ属 (*Ammodytes*)、シワイカナゴ属 (*Hypoptychus*)、マアジ属 (*Trachurus*)、シチロウウオ属 (*Brachyopsis*)、ニシキギンポ属 (*Pholis*)、オキカズナギ属 (*Opisthocentrus*)、ナガガジ属 (*Zoarces*)、ドロギンポ属 (*Ascoldia*)、又はムロランギンポ属 (*Pholidapus*) に属する魚種由来のものが挙げられる。

[0055] 具体的には、前記不凍蛋白質としては、タンパク質の採取源が、ギスカジカ (*Myoxocephalus stelleri Tilesius*)、ツマグロカジカ (*Gymnocanthus herzensteini Jordan et Starks*)、トゲカジカ (*Myoxoceph*

alus polyacanthocephalus (Pallas))
、ナメヨコスジカジカ (Hemilepidotus jordani Bean)、キヌカジカ (Furcina osimae Jordan et Starks)、チカ (Hypomesus pretiosus japonicus (Brevoort))、イシカリワカサギ (Hypomesus olidus (Dallas))、シシャモ (Spirinchus lanceolatus (Hikita))、カラフトシシャモ (Mallotus villosus (Muller))、キタノホッケ (Pleurogrammus monopterygius (Pallas))、ヤナギノマイ (Sebastes steindachneri Hilgendorf)、ニシン (Clupea pallasii Valenciennes)、マガレイ (Limanda Herzensteini Jordan et Snyder)、スナガレイ (Limanda punctatissima (Steindachner))、クロガシラガレイ (Limanda schrenki Schmidt)、コガネガレイ (Limanda aspera (Pallas))、クロガレイ (Liopsetta obscura (Herzenstein))、サメガレイ (Clidoderma asperrium (Temminck et Schlegel))、ソウハチ (Cleisthenes pinetorumherzensteini (Schmidt))、ババガレイ (Microctomus achne (Jordan et Starks))、アサバガレイ (Lepidopsetta mochigarei Snyder)、ヌマガレイ (Platichthys stellatus (Pallas))、イシガレイ (Kareius bicoloratus (Basilewsky))、ムシガレイ (Eopsetta grigorjewi (Herzenstein))、マダラ (Gadus macrocephalus Tilesius)、スケトウダラ (Theragra chalcogramma (P

allas))、イカナゴ (*Ammodytes personatus* Girard)、シワイカナゴ (*Hypopttychus dybowskii* Steindachner)、マアジ (*Trachurus japonicus* (Temminck et Schlegel))、シチロウウオ (*Brachyopsis rostratus* (Tilesius))、ニシキギンボ (*Pholis picta* (Kner))、ガジ (*Opisthocentrus ocellatus* (Tilesius))、ナガガジ (*Zoarces elongatus* Kner)、ドロギンボ (*Ascoldia variegata knipowitschii* Soldatov)、又はムロランギンボ (*Pholidapous dybowskii* (Steindachner)) に属する魚種由来のものが挙げられる。

[0056] 上記の中でも、トウガレイ (学名 *Pleuronectes pinnifasciatus*) 由来のⅠ型の不凍蛋白質、チカ (学名 *Hypomesus pretiosus*, Japonicus (Brovoort)) 由来のⅡ型の不凍蛋白質、ナガガジ (学名 *Zoarces elongatus* Kner) 由来のⅢ型の不凍蛋白質、又はコマイ (学名 *Eleginus gracilis*) 由来のAFGP型の不凍蛋白質等は、本発明の効果が十分に得られるため好適な不凍蛋白質として挙げられる。

本発明の効果を損なわないものであれば、本発明のⅠ型の不凍蛋白質はトウガレイ由来に限定されず、本発明のⅡ型の不凍蛋白質はチカ由来に限定されず、本発明のⅢ型の不凍蛋白質はナガガジ由来に限定されない。

[0057] 本発明の第二態様における不凍蛋白質は、魚、植物、微生物、又は担子菌類等から抽出及び精製して得られたものを用いても良いし、公知の遺伝子工学的手法を用いて大腸菌等の微生物や昆虫細胞等の培養細胞中で、不凍蛋白質を発現させたものを抽出及び精製して得られたものを用いることもできる。

[0058] 本発明の熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法における魚類由来の不凍蛋白質の前記混合物中における含有濃度としては、0.01～10質量%が

好ましく、0.05～10質量%がより好ましく、0.1～10質量%がさらに好ましく、0.1～5質量%が特に好ましい。

この含有濃度の範囲の下限値以上であると本発明の効果が十分に得られ、この含有濃度の範囲の上限値付近で前記混合物の熱ヒステリシス活性を増加させる効果は頭打ちとなる。

[0059] 本発明の熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法における前記添加剤は、有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、アセトン、ジオキサン、2-クロロエタノール、及びN,N-ジメチルホルムアミドのうち何れか1種以上の物質であり、前記混合物を加熱することによる前記混合物の熱ヒステリシス活性の低下を抑制することができるものである。前記添加剤は、1種を単独で用いても良いし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0060] 前記有機酸の好適なものとしては、クエン酸、リンゴ酸、マレイン酸、酒石酸、酢酸、L-アスコルビン酸などが挙げられる。前記有機酸の前記混合物中における含有濃度としては、0.1～3Mが好ましく、0.1～1Mがより好ましく、0.5～1Mがさらに好ましく、0.8～1Mが特に好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0061] 前記有機酸塩の好適なものとしては、クエン酸ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、リンゴ酸二ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム及び酢酸カルシウムなどが挙げられる。前記有機酸塩の前記混合物中における含有濃度としては、0.1～3Mが好ましく、0.1～1Mがより好ましく、0.5～1Mがさらに好ましく、0.8～1Mが特に好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0062] 前記無機塩の好適なものとしては、塩化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、硫酸カリウム、塩化カリウム、酢酸カリウム、炭酸カリウム、硝酸カリウム、塩化カルシウム、及び硝酸

カルシウムなどが挙げられる。前記無機塩の前記混合物中における含有濃度としては、0.1～3 Mが好ましく、0.1～1 Mがより好ましく、0.5～1 Mがさらに好ましく、0.8～1 Mが特に好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0063] 前記アミノ酸又はアミノ酸塩の好適なものとしては、シスチン、アスパラギン、グルタミン、リジン、アルギニン、アルギニン塩酸塩、グリシン、及びヒスチジンが挙げられる。前記アミノ酸又はアミノ酸塩の前記混合物中における含有濃度としては、0.1～1 Mが好ましく、0.5～1 Mがより好ましく、0.8～1 Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0064] 前記アンモニウム塩の好適なものとしては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸二水素アンモニウム、クエン酸三アンモニウム、クエン酸鉄アンモニウム、炭酸水素アンモニウム、アルギニン酸アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム、クエン酸二アンモニウム、亜硫酸アンモニウム（一水和物）、チオ硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、及び酢酸アンモニウムなどが挙げられる。前記アンモニウム塩の前記混合物中における含有濃度としては、0.01～3 Mが好ましく、0.1～1 Mがより好ましく、0.5～1 Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0065] 前記糖類の好適なものとしては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトース、トレハロース、ラフィノース、及びキシロースが挙げられる。前記糖類の前記混合物中における含有濃度としては、0.1～1 Mが好ましく、0.2～0.8 Mがより好ましく、0.4～0.6 Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0066] 前記糖アルコールの好適なものとしては、ソルビトール、及びグリセリンが挙げられる。前記糖アルコールの前記混合物中の含有濃度としては、0.1～1 Mが好ましく、0.2～0.8 Mがより好ましく、0.4～0.6 M

がさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0067] 前記添加剤として尿素を用いる場合、前記混合物中の尿素の含有濃度は、0.01～1Mが好ましく、0.1～1Mがより好ましく、0.5～1Mがさらに好ましい。

前記添加剤としてグアニジン塩酸塩を用いる場合、前記混合物中のグアニジン塩酸塩の含有濃度は0.001～1Mが好ましく、0.01～1Mがより好ましく、0.1～1Mがさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0068] 前記添加剤としてアセトンを用いる場合、前記混合物中のアセトンの含有濃度は1～25体積%が好ましく、10～25体積%がより好ましく、15～25体積%がさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

前記添加剤としてジオキサン（1，4－ジエチレンジオキサン）を用いる場合、前記混合物中のジオキサンの含有濃度は0.1～6体積%が好ましく、2～6体積%がより好ましく、3～6体積%がさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

前記添加剤として2－クロロエタノール（エチレンクロルヒドリン）を用いる場合、前記混合物中の2－クロロエタノールの含有濃度は0.1～6体積%が好ましく、2～6体積%がより好ましく、3～6体積%がさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0069] 前記添加剤としてN，N－ジメチルホルムアミドを用いる場合、前記混合物中のN，N－ジメチルホルムアミドの含有濃度は0.1～6体積%が好ましく、2～6体積%がより好ましく、3～6体積%がさらに好ましい。この含有濃度の範囲であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0070] ここで例示した添加剤は、それ単独では、熱ヒステリシス活性を生じない。つまり、前記混合物に前記不凍蛋白質が含まれない場合には、前記混合物の熱ヒステリシス活性は生じない。

[0071] 前記不凍蛋白質と前記添加剤との好ましい組み合わせとしては、下記の（B 1）～（B 5）が挙げられる。これらの組み合わせであると、前記混合物を加熱した場合に生じる前記混合物の熱ヒステリシス活性の低下を十分に抑制することができる。

（B 1）トウガレイ由来のⅠ型の不凍蛋白質に対しては、乳酸ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、リンゴ酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、重炭酸ナトリウム、酢酸カリウム、尿素、グアニジン塩酸塩、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム、クエン酸二アンモニウム、亜硫酸アンモニウム（一水和物）、及びチオ硫酸アンモニウムのうち、何れか１種以上の物質を前記添加剤として用いることが好ましい。

（B 2）カジカ由来のⅠ型の不凍蛋白質に対しては、塩化ナトリウムを前記添加剤として用いることが好ましい。

[0072] （B 3）チカ由来のⅠⅠ型の不凍蛋白質に対しては、硫酸アンモニウムを前記添加剤として用いることが好ましい。

（B 4）ナガガジ由来のⅠⅠⅠ型の不凍蛋白質に対しては、酢酸ナトリウム、尿素、グアニジン塩酸塩、アセトン、ジオキサン、２－クロロエタノール、N，N－ジメチルホルムアミド、アスパラギン、リジン、アルギニン、アルギニン塩酸塩、グリシン、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、クエン酸三アンモニウム、炭酸水素アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム、グルコース、フルクトース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトース、トレハロース、ラフィノース、及びソルビトールのうち、何れか１種以上の物質を前記添加剤として用いることが好ましい。

[0073] （B 5）コマイ由来のA F G P型の不凍蛋白質に対しては、クエン酸、リンゴ酸、乳酸ナトリウム、コハク酸二ナトリウム、リンゴ酸二ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、重炭酸ナトリウム、酢酸カリウム、尿素、グアニジン塩酸塩、グリシン、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム、クエン酸

ニアンモニウム、亜硫酸アンモニウム（一水和物）、及びチオ硫酸アンモニウムのうち、何れか１種以上の物質を前記添加剤として用いることが好ましい。

[0074] 本発明の熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法は、前記混合物の調製方法又は製造方法としての側面を有する。

本発明の熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法における前記混合物の調製方法としては、前記不凍蛋白質と前記添加剤と前記水とが均一に混合できる方法であれば特に制限されない。例えば、前記不凍蛋白質と前記添加剤とを前記所定濃度になるように水に溶解させた水溶液として混合物を調製する方法が挙げられる。前記水溶液には、前記不凍蛋白質や前記添加物以外のものを含有させてもよい。

[0075] 前記混合物を加熱する際の温度は、例えば４０～１２０℃の温度範囲が挙げられる。この温度範囲に加熱することにより、前記混合物に含まれる雑菌等を殺菌することができる。

この場合、前記混合物を加熱する時間は、１～３０分間で行えばよい。

前記混合物を前記温度範囲に加熱する方法としては特に制限されず、前記混合物を容器に入れて前記容器を公知の方法で加熱する方法や、前記混合物にマイクロウェーブを照射する方法等が挙げられる。

このような加熱処理を行う場合としては、前記混合物の調理加工、乾燥、濃縮、又は殺菌等の他、前記混合物に所望の成分を溶解又は分散させる場合が挙げられる。

[0076] 本発明の熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法における前記混合物の例として、例えば食品が挙げられ、好ましくはアイスクリーム、又はアイスキャンデー等の氷菓子、若しくは冷凍麺類、又は冷凍ハンバーグ等の冷凍加工食品が挙げられる。本発明の前記不凍蛋白質と添加剤と水とを含む混合物が食品である場合、前記食品の熱ヒステリシス活性が増加することにより、前記食品の保冷時における氷結晶の成長が妨げられ、また氷結晶の再結晶化が抑制されるため、前記食品の口当たりがまろやかな好ましいものとするこ

ができる。

[0077] また、前記混合物の別の例として、自動車ラジエータに用いる不凍液、生鮮食品を保冷するための保冷剤、並びに医薬品及びバイオ研究用途などに用いられる微生物や細胞等の冷凍保存用保護溶液等の食品以外の用途も挙げられる。

[0078] <熱ヒステリシス活性増加用組成物>

本発明の第三の態様である熱ヒステリシス活性増加用組成物は、不凍蛋白質と水と添加剤とを含む熱ヒステリシス活性増加用組成物であって、前記添加剤には、有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、スペルミジン、スペルミン、アセトン、ジオキサン、2-クロロエタノール、及びN，N-ジメチルホルムアミドのうち何れか一種以上の物質が含まれる熱ヒステリシス活性増加用組成物である。

[0079] 前記水は、本発明の効果を損なわないものであれば他の物質を含んだ水溶液又は水含有物であってもよい。前記水溶液には、前記不凍蛋白質や前記添加物以外のものを含有させてもよい。

[0080] 本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物は、不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性をさらに増加させることができ、又は不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性の、加熱による低下を抑制することができる。

以下の説明において、不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性を増強させることができる本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物を、熱ヒステリシス活性増加用組成物Aという。

また、不凍蛋白質の有する熱ヒステリシス活性の、加熱による低下を抑制することができる本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物を、熱ヒステリシス活性増加用組成物Bという。

[0081] (A) 本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物Aによる前記熱ヒステリシス活性は、前記不凍蛋白質が有する熱ヒステリシス活性に主に依存するものであるが、前記添加剤を含有することにより、前記熱ヒステリシス活性を

増強（促進）して、一層前記熱ヒステリシス活性を増加させることができる。すなわち、前記添加剤は、本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物Aにおける不凍蛋白質が本来有する熱ヒステリシス活性を増強（促進）する効果を奏する。

[0082] (B) 本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物Bによる前記熱ヒステリシス活性は、前記不凍蛋白質が有する熱ヒステリシス活性に主に依存するものである。ここで、前記熱ヒステリシス活性増加用組成物Bを添加した水溶液又は水含有物を加熱処理（例えば40℃～120℃で30分間）した場合において、前記加熱処理前に有していた熱ヒステリシス活性の低下を抑制することができる。これは、前記熱ヒステリシス活性増加用組成物Bが前記添加剤を含有することにより、前記不凍蛋白質の熱ヒステリシス活性が熱変性によって低下してしまう程度を低減することができるからだと推測される。すなわち、前記添加剤は、本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物Bにおける不凍蛋白質に耐熱性を付与する効果を奏する。

[0083] 本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物A又はBにおける前記不凍蛋白質としては、熱ヒステリシス活性を有するものであれば特に制限されず、公知の不凍蛋白質を用いることができる。

[0084] 例えば、前記不凍蛋白質としては、ギスカジカ属（*Myoxocephalus*）、ツマグロカジカ属（*Gymnocanthus*）、ヨコスジカジカ属（*Hemilepidotus*）、サラサカジカ属（*Furcina*）、ワカサギ属（*Hypomesus*）、シシャモ属（*Spirinchus*）、カラフトシシャモ属（*Malilotus*）、ホッケ属（*Pleurogrammus*）、メバル属（*Sebastes*）、ニシン属（*Clupea*）、マコガレイ属（*Limanda*）、クロガレイ属（*Liopsetta*）、サメガレイ属（*Clidoderma*）、ソウハチ属（*Cleisthenes*）、ババガレイ属（*Microstomus*）、シュムシュガレイ属（*Lepidopsetta*）、ヌマガレイ属（*Platichthys*）、イシガレイ属（*Kareius*）、ムシガレイ属（*Eopsetta*）

、マダラ属 (*Gadus*)、スケトウダラ属 (*Theragra*)、イカナゴ属 (*Ammodytes*)、シワイカナゴ属 (*Hypoptychus*)、マアジ属 (*Trachurus*)、シチロウウオ属 (*Brachyopsis*)、ニシキギンポ属 (*Pholis*)、オキカズナギ属 (*Opisthocentrus*)、ナガガジ属 (*Zoarces*)、ドロギンポ属 (*Ascoldia*)、又はムロランギンポ属 (*Pholidapus*) に属する魚種由来のものが挙げられる。

[0085] 具体的には、前記不凍蛋白質としては、タンパク質の採取源が、ギスカジカ (*Myoxocephalus stelleri* Tilesius)、ツマグロカジカ (*Gymnocanthus herzensteini* Jordan et Starks)、トゲカジカ (*Myoxocephalus polyacanthocephalus* (Pallas))、ナメヨコスジカジカ (*Hemilepidotus jordani* Bean)、キヌカジカ (*Furcina osimae* Jordan et Starks)、チカ (*Hypomesus pretiosus japonicus* (Brevoort))、イシカリワカサギ (*Hypomesus olidus* (Dallas))、シシャモ (*Spirinchus lanceolatus* (Hikita))、カラフトシシャモ (*Mallotus villosus* (Muller))、キタノホッケ (*Pleurogrammus monopterygius* (Pallas))、ヤナギノマイ (*Sebastes steindachneri* Hilgendorf)、ニシン (*Clupea pallasii* Valenciennes)、マガレイ (*Limanda herzensteini* Jordan et Snyder)、スナガレイ (*Limanda punctatissima* (Steindachner))、クロガシラガレイ (*Limanda schrenki* Schmidt)、コガネガレイ (*Limanda aspera* (Pallas))、クロガレイ (*Liopsetta obscura* (Herzenste

in))、サメガレイ (*Clidoderma asperrium* (Temminck et Schlegel))、ソウハチ (*Cleisthenes pinetorumherzensteini* (Schmidt))、ババガレイ (*Microctomus achne* (Jordan et Starks))、アサバガレイ (*Lepidopsetta mochigarei* Snyder)、ヌマガレイ (*Platichthys stellatus* (Pallas))、イシガレイ (*Kareius bicoloratus* (Basilewsky))、ムシガレイ (*Eopsetta grigorjewi* (Herzenstein))、マダラ (*Gadus macrocephalus* Tilesius)、スケトウダラ (*Theragra chalcogramma* (Pallas))、イカナゴ (*Ammodytes personatus* Girard)、シワイカナゴ (*Hypoptychus dybowskii* Steindachner)、マアジ (*Trachurus japonicus* (Temminck et Schlegel))、シチロウウオ (*Brachyopsis rostratus* (Tilesius))、ニシキギンボ (*Pholis picta* (Kner))、ガジ (*Opisthocentrus ocellatus* (Tilesius))、ナガガジ (*Zoarces elongatus* Kner)、ドロギンボ (*Ascoldia variegata knipowitschii* Soldatov)、又はムロランギンボ (*Pholidapous dybowskii* (Steindachner)) に属する魚種由来のものが挙げられる。

- [0086] 上記の中でも、トウガレイ (学名 *Pleuronectes pinnifasciatus*) 由来のⅠ型の不凍蛋白質、チカ (学名 *Hypomesus pretiosus*, *Japonicus* (Brovoort)) 由来のⅡ型の不凍蛋白質、ナガガジ (学名 *Zoarces elongatus* Kner) 由来のⅢ型の不凍蛋白質、又はコマイ (学名 *Eleginus gracilis*) 由来のAFGP型の不凍蛋白質等は、本発明の効果が十分に得られるため好適な不凍蛋

白質として挙げられる。

本発明の効果を損なわないものであれば、本発明のⅠ型の不凍蛋白質はトウガレイ由来に限定されず、本発明のⅠⅠ型の不凍蛋白質はチカ由来に限定されず、本発明のⅠⅠⅠ型の不凍蛋白質はナガガジ由来に限定されない。

[0087] 本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物 A 又は B における不凍蛋白質は、魚、植物、微生物、又は担子菌類等から抽出及び精製して得られたものを用いても良いし、公知の遺伝子工学的手法を用いて大腸菌等の微生物や昆虫細胞等の培養細胞中で、不凍蛋白質を発現させたものを抽出及び精製して得られたものを用いることもできる。

[0088] 本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物 A 又は B における魚類由来の不凍蛋白質の含有濃度としては、0.01～10質量%が好ましく、0.05～8質量%がより好ましく、0.1～5質量%がさらに好ましい。

この含有濃度の範囲の下限値以上であると本発明の効果が十分に得られ、この含有濃度の範囲の上限値付近で前記組成物の熱ヒステリシス活性を増加させる効果は頭打ちとなる。

[0089] 前記熱ヒステリシス活性増加用組成物 A における添加剤は、有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、スペルミジン、スペルミン、及び N，N－ジメチルホルムアミドのうち何れか 1 以上の物質であり、前記不凍蛋白質のみを添加した水溶液又は水含有物の熱ヒステリシス活性よりも、前記熱ヒステリシス活性増加用組成物 A を添加した水溶液又は水含有物の熱ヒステリシス活性の方を大きくすることができるものである。前記添加剤は、1 種を単独で用いても良いし、2 種以上を組み合わせ用いても良い。

[0090] 前記熱ヒステリシス活性増加用組成物 A における添加剤の好適なものの説明は、前述の熱ヒステリシス活性増加方法において、好適な添加剤として例示したものの説明と同様である。

[0091] また、前記熱ヒステリシス活性増加用組成物 A における前記不凍蛋白質と前記添加剤との好ましい組み合わせの説明は、前述の熱ヒステリシス活性増

加方法において、好ましい組み合わせとして例示したものの説明と同様である。

[0092] 前記熱ヒステリシス活性増加用組成物Bにおける添加剤は、有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、アセトン、ジオキサン、2-クロロエタノール、及びN，N-ジメチルホルムアミドのうち何れか1以上の物質であり、前記熱ヒステリシス活性増加用組成物Bを添加した水溶液又は水含有物を加熱処理（例えば40℃～120℃で30分間）した場合において、前記加熱処理前に有していた熱ヒステリシス活性の低下を抑制することができるものである。前記添加剤は、1種を単独で用いても良いし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0093] 前記熱ヒステリシス活性増加用組成物Bにおける添加剤の好適なものの説明は、前述の熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法において、好適な添加剤として例示したものの説明と同様である。

[0094] また、前記熱ヒステリシス活性増加用組成物Bにおける前記不凍蛋白質と前記添加剤との好ましい組み合わせの説明は、前述の熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法において、好ましい組み合わせとして例示したものの説明と同様である。

[0095] 前記有機酸の前記組成物における含有濃度としては、0.1～3Mが好ましく、0.1～1Mがより好ましく、0.5～1Mがさらに好ましく、0.8～1Mが特に好ましい。

前記有機酸塩の前記組成物における含有濃度としては、0.1～3Mが好ましく、0.1～1Mがより好ましく、0.5～1Mがさらに好ましく、0.8～1Mが特に好ましい。

前記無機塩の前記組成物における含有濃度としては、0.1～3Mが好ましく、0.1～1Mがより好ましく、0.5～1Mがさらに好ましく、0.8～1Mが特に好ましい。

前記アミノ酸又はアミノ酸塩の前記組成物における含有濃度としては、0

、 1 ～ 1 M が好ましく、 0. 5 ～ 1 M がより好ましく、 0. 8 ～ 1 M がさらに好ましい。

前記アンモニウム塩の前記組成物における含有濃度としては、 0. 01 ～ 3 M が好ましく、 0. 1 ～ 1 M がより好ましく、 0. 5 ～ 1 M がさらに好ましい。

前記糖類の前記組成物における含有濃度としては、 0. 1 ～ 1 M が好ましく、 0. 2 ～ 0. 8 M がより好ましく、 0. 4 ～ 0. 6 M がさらに好ましい。

前記糖アルコールの前記組成物における含有濃度としては、 0. 1 ～ 1 M が好ましく、 0. 2 ～ 0. 8 M がより好ましく、 0. 4 ～ 0. 6 M がさらに好ましい。

前記添加剤の含有濃度が前記範囲内であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0096] 前記組成物中の尿素の含有濃度は、 0. 01 ～ 1 M が好ましく、 0. 1 ～ 1 M がより好ましく、 0. 5 ～ 1 M がさらに好ましい。

前記組成物中のグアニジン塩酸塩の含有濃度は、 0. 001 ～ 1 M が好ましく、 0. 01 ～ 1 M がより好ましく、 0. 1 ～ 1 M がさらに好ましい。

[0097] 前記組成物中のアセトンの含有濃度は、 1 ～ 25 体積% が好ましく、 10 ～ 25 体積% がより好ましく、 15 ～ 25 体積% がさらに好ましい。

前記組成物中のジオキサン（1, 4-ジエチレンジオキサン）の含有濃度は 0. 1 ～ 6 体積% が好ましく、 2 ～ 6 体積% がより好ましく、 3 ～ 6 体積% がさらに好ましい。

前記組成物中の2-クロロエタノール（エチレンクロルヒドリン）の含有濃度は 0. 1 ～ 6 体積% が好ましく、 2 ～ 6 体積% がより好ましく、 3 ～ 6 体積% がさらに好ましい。

前記添加剤の含有濃度が前記範囲内であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0098] 前記組成物中のスペルミジンの含有濃度は、 0. 001 ～ 1 M が好ましく

、0.01～1Mがより好ましく、0.1～1Mがさらに好ましい。

前記組成物中のスペルミンの含有濃度は、0.001～1Mが好ましく、0.01～1Mがより好ましく、0.1～1Mがさらに好ましい。

前記組成物中のN，N－ジメチルホルムアミドの含有濃度は、0.1～6体積%が好ましく、2～6体積%がより好ましく、3～6体積%がさらに好ましい。

前記添加剤の含有濃度が前記範囲内であると、本発明の効果が十分に得られる。

[0099] 前記熱ヒステリシス活性増加用組成物A、及び前記熱ヒステリシス活性増加用組成物Bは、例えば、公知の方法で抽出及び精製された前記不凍蛋白質を凍結乾燥して得られた粉末を、前記添加剤及び前記水と所定の割合で混合することによって製造することができる。

本発明の効果を損なわないものであれば、前記不凍蛋白質、前記添加剤、及び前記水の混合の方法や混合の順序などは特に限定されない。

[0100] 粉末状となった本発明の熱ヒステリシス活性増加用組成物は、所定量を水又は水含有物に均一に混合することによって、前記水又は水含有物の熱ヒステリシス活性を増加させることができる。

[0101] より具体的には、前記熱ヒステリシス活性増加用組成物を、アイスクリーム、又はアイスキャンデー等の氷菓子、若しくは冷凍麺類、又は冷凍ハンバーグ等の冷凍加工食品に混合した場合には、これら食品の熱ヒステリシス活性が増加することにより、前記食品の冷凍時における氷結晶の成長が妨げられ、また氷結晶の再結晶化が抑制されるため、前記食品の口当たりがまろやかな好ましいものとすることができる。また、前記熱ヒステリシス活性増加用組成物を、自動車ラジエータに用いる不凍液、生鮮食品を保冷するための保冷剤、並びに医薬品及びバイオ研究用途などに用いられる微生物や培養細胞等の冷凍保存用保護溶液等の食品以外の製品に混合して使用することもできる。

実施例

[0102] 次に、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって限定されるものではない。

[0103] (魚類由来の不凍蛋白質の調製)

以下の実施例に用いた魚類由来の不凍蛋白質は、北海道野付郡別海町の野付漁協で漁獲された、表1に記載の4魚種から抽出及び精製して得られた。

[0104] 当該不凍蛋白質の抽出及び精製方法は、つぎの通りである。

まず、魚原料の質量と等量の脱イオン水とをミキサー中にて粉碎混合後、得られた懸濁液を遠心分離して上清と沈殿とに分離した。得られた上清をフィルター孔径100 μ mの精密ろ過膜に通して、上清に含まれる夾雑物を除去した。

[0105] つぎに、I型AFP、II型AFP、及びAFGPについては分画分子量30,000(Da)の限外ろ過膜を用いて、III型AFPについては分画分子量10,000(Da)の限外ろ過膜を用いて、1回目の限外ろ過を行うことにより、上清に含まれる当該不凍蛋白質よりも大きい分子量の夾雑蛋白質を除去して、当該不凍蛋白質をろ液(膜透過液)として得た。つづいて、いずれのAFPについても分画分子量3,000(Da)の限外ろ過膜を用いて、2回目の限外ろ過を行うことにより、前記ろ液に含まれる当該不凍蛋白質よりも小さい分子量の夾雑蛋白質を除去して、当該不凍蛋白質を濃縮液(限外ろ過膜を通過しない側の液)として得た。

[0106] [表1]

	AFPタイプ (種類)
トウガレイ由来不凍蛋白質	I型
チカ由来不凍蛋白質	II型
ナガガジ由来不凍蛋白質	III型
コマイ由来不凍蛋白質	AFGP

[0107] (熱ヒステリシス活性測定用試料の調製)

実施例1～92及び比較例1～4では、精製した不凍蛋白質の終濃度が5質量%(50mg/ml)で、添加剤の終濃度が表2～9に示す濃度となる

ように、不凍蛋白質と添加剤と脱イオン水を混合して、熱ヒステリシス活性測定用試料とした。

[0108] 実施例 93～314 では、精製した不凍蛋白質の終濃度及び添加剤の終濃度が表 10～19 に示す濃度となるように、不凍蛋白質と添加剤と脱イオン水を混合して、熱ヒステリシス活性測定用試料とした。

[0109] 前記試料の調製方法は、各試料における添加剤の終濃度が前記添加剤の飽和濃度の $1/2$ 以下である場合は、終濃度の 2 倍濃度の添加剤を溶解した水溶液と、10 質量%の不凍蛋白質とを等量ずつ混合する方法で行った。また、各試料における添加剤の終濃度が前記添加剤の飽和濃度の $1/2$ 以上である場合は、飽和濃度の添加剤を溶解した水溶液と 10 質量%の不凍蛋白質とを混合した後で脱イオン水を加えて、所定の添加剤濃度になるように希釈した。各試料を均一に混合後、10,000 rpm (12,000 G)、10 分間の遠心を 4℃にて行い、不溶画分を除去した試料を熱ヒステリシス活性測定用試料 (I) とした。

[0110] (熱ヒステリシス活性 (℃) の測定方法)

試料中の氷結晶の形態観察を可能とするための温度制御機構を有する装置 (LK-600PM; Linkam Scientific Instruments Ltd.) を備えた顕微鏡 (BX51; オリンパス株式会社) を使用して、以下のステップ 1～3 によって、試料の熱ヒステリシス活性を測定した。

[0111] ステップ 1 ; 顕微鏡ステージに設置した円型カバーガラスの上に試料 1 μ l を滴下した後、毎分 50℃の速度で試料全体が凍結する温度まで冷却した (図 1 参照)。

ステップ 2 ; 試料の凍結を確認後、試料の融点付近まで毎分 10℃で昇温させ、試料中の氷結晶が完全に融解しないよう留意しながら、ステージ温度を制御する。視野内の氷結晶が融解して少なくなってきたら、毎分 1～5℃程度の昇温速度に変更して、視野内の氷結晶数を 5 個以下にした。その後、ステージの温度を毎分 0.5～5℃くらいで厳密に制御しながら、残存する

氷結晶の溶け始めの温度を融点として求めた（小数点以下2桁まで）。

ステップ3； ステップ2で融点が求まったら、毎分0.2～1℃程度の速度で冷却しながら、残存する氷結晶が大きく成長し始める温度（凝固点）を求めた。

[0112] 上記ステップ3において、試料中の不凍蛋白質が氷結晶成長を抑制しうる温度帯よりもステージ温度が低くなると、氷結晶が急激に成長し始める。このときの温度と前記融点との温度差を熱ヒステリシス活性（℃）として測定した。その結果を表3～19に併記する。

[0113] （熱ヒステリシス活性h（℃）の測定方法）

前記調製した熱ヒステリシス活性測定用試料（I）を、ウォーターバスを用いて90℃、30分間で加熱した後、10,000rpm（12,000G）、10分間、4℃で遠心して、不溶画分を除去した試料を熱ヒステリシス活性測定用試料（II）とした。

得られた試料（II）の熱ヒステリシス活性h（℃）を、前述の熱ヒステリシス活性（℃）の測定と同様の方法で測定した。その結果を表3～9に併記する。

[0114] また、比較例として、前記不凍蛋白質の終濃度が5質量%（50mg/ml）となるように、不凍蛋白質と脱イオン水のみを混合して、熱ヒステリシス活性測定用試料（III）とした。

得られた試料（III）の熱ヒステリシス活性（℃）及び熱ヒステリシス活性h（℃）を、前述と同様の方法で測定した。その結果を表2に示す。

[0115] [表2]

	添加剤	AFPタイプ (種類)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性 (℃)	熱ヒステリシス 活性h (℃)
比較例1	なし	I型AFP	0	1.5～ 1.7	0.63～ 0.71
比較例2	なし	II型AFP	0	0.32	0.17
比較例3	なし	III型AFP	0	1.3	0.45～ 0.62
比較例4	なし	AFGP	0	0.7～ 0.9	0.7～ 0.77

[0116] [表3]

	添加剤	AFPタイプ (種類)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例1	クエン酸ナトリウム	AFGP	1.0	1.51	1.08	A	B
実施例2	リンゴ酸	AFGP	1.0	1.03	1.04	B	B
実施例3	マレイン酸	AFGP	1.0	1.04	—	B	—
実施例4	酒石酸	AFGP	1.0	1.41	—	A	—
実施例5	クエン酸三ナトリウム	I型AFP	1.0	2.64	—	A	—
実施例6	クエン酸三ナトリウム	III型AFP	0.5	2.14	—	A	—
実施例7	クエン酸三ナトリウム	AFGP	1.0	5.55	—	A	—
実施例8	酢酸ナトリウム	I型AFP	1.0	2.45	—	A	—
実施例9	酢酸ナトリウム	III型AFP	0.5	1.76	0.86	B	A
実施例10	酢酸ナトリウム	AFGP	1.0	1.88	—	A	—
実施例11	乳酸ナトリウム	I型AFP	1.0	1.68	1.09	B	A
実施例12	乳酸ナトリウム	AFGP	1.0	2.06	1.84	A	A
実施例13	酒石酸ナトリウム	I型AFP	1.0	4.50	—	A	—
実施例14	酒石酸ナトリウム	AFGP	1.0	3.56	—	A	—
実施例15	コハク酸二ナトリウム	I型AFP	1.0	3.84	1.5	A	A
実施例16	コハク酸二ナトリウム	AFGP	1.0	5.82	2.05	A	A
実施例17	リンゴ酸二ナトリウム	I型AFP	1.0	3.92	1.33	A	A
実施例18	リンゴ酸二ナトリウム	AFGP	1.0	4.90	2.42	A	A
実施例19	ピルビン酸ナトリウム	AFGP	1.0	1.25	0.8	A	B

[0117] [表4]

	添加剤	AFPタイプ (種類)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例20	塩化ナトリウム	I型AFP	1.0	1.79	0.96	B	B
実施例21	塩化ナトリウム	AFGP	1.0	1.27	1.29	A	A
実施例22	塩化カリウム	I型AFP	1.0	2.33	0.95	B	B
実施例23	塩化カリウム	AFGP	1.0	1.17	1.09	B	B
実施例24	塩化カルシウム	I型AFP	1.0	2.67	1.36	A	A
実施例25	塩化カルシウム	AFGP	1.0	1.21	1.17	A	A
実施例26	重炭酸ナトリウム	I型AFP	1.0	3.56	1.36	A	A
実施例27	重炭酸ナトリウム	AFGP	1.0	2.23	1.68	A	A
実施例28	酢酸カリウム	I型AFP	1.0	2.98	0.89	A	B
実施例29	酢酸カリウム	AFGP	1.0	1.70	1.39	A	A
実施例30	炭酸カリウム	I型AFP	1.0	2.67	0.75	A	B
実施例31	炭酸カリウム	AFGP	1.0	2.91	—	A	—

[0118] [表5]

	添加剤	AFPタイプ (種類)	添加剤濃度	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例32	尿素	I型AFP	1.0(M)	1.20	0.93	C	B
実施例33	尿素	III型AFP	0.1(M)	1.15	0.61	C	B
実施例34	尿素	III型AFP	1.0(M)	1.40	1.00	B	A
実施例35	尿素	AFGP	1.0(M)	1.00	1.02	B	B
実施例36	グアニジン塩酸塩	I型AFP	1.0(M)	1.48	1.37	C	A
実施例37	グアニジン塩酸塩	III型AFP	0.1(M)	1.65	0.85	B	A
実施例38	グアニジン塩酸塩	III型AFP	1.0(M)	1.90	0.85	B	A
実施例39	グアニジン塩酸塩	AFGP	1.0(M)	1.22	1.08	A	B
実施例40	アセトン	III型AFP	20 (体積%)	0.70	0.75	C	B
実施例41	ジオキサン	III型AFP	5 (体積%)	0.80	0.65	C	B
実施例42	2-クロロエタノール	III型AFP	5 (体積%)	1.10	0.65	C	B
実施例43	N, N-ジメチル ホルムアミド	III型AFP	5 (体積%)	1.30	0.90	C	A

[0119] [表6]

	添加剤	AFPタイプ (種類)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例44	アスパラギン	III型AFP	0.1	1.40	0.75	B	B
実施例45	アスパラギン	III型AFP	0.5	1.40	0.75	B	B
実施例46	リジン	III型AFP	0.01	1.20	0.80	C	B
実施例47	リジン	III型AFP	0.1	1.55	0.80	B	B
実施例48	リジン	III型AFP	0.5	1.55	0.90	B	A
実施例49	アルギニン	III型AFP	0.001	1.37	0.68	B	B
実施例50	アルギニン	III型AFP	0.01	1.26	0.80	C	A
実施例51	アルギニン	III型AFP	0.1	1.42	0.66	B	B
実施例52	アルギニン	III型AFP	0.5	1.73	0.74	B	B
実施例53	アルギニン塩酸塩	III型AFP	0.5	2.35	1.18	A	A
実施例54	グリシン	III型AFP	0.001	1.45	0.76	B	B
実施例55	グリシン	III型AFP	0.01	1.40	0.63	B	B
実施例56	グリシン	III型AFP	0.1	1.30	0.75	C	B
実施例57	グリシン	III型AFP	0.5	1.49	1.23	B	A
実施例58	グリシン	AFGP	1.0	1.53	1.38	A	A
実施例59	スペルミジン	III型AFP	1.0	2.30	—	A	—
実施例60	スペルミン	III型AFP	1.0	1.96	—	A	—

[0120]

[表7]

	添加剤	AFPタイプ (種類)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例61	塩化アンモニウム	I型AFP	1.0	2.09	1.09	B	A
実施例62	塩化アンモニウム	III型AFP	0.1	1.15	0.71	C	B
実施例63	塩化アンモニウム	III型AFP	1.0	1.90	1.57	B	A
実施例64	塩化アンモニウム	AFGP	1.0	1.17	1.20	B	A
実施例65	硫酸アンモニウム	I型AFP	1.0	1.39	1.28	C	A
実施例66	硫酸アンモニウム	II型AFP	1.0	0.53	0.25	A	B
実施例67	硫酸アンモニウム	III型AFP	0.01	1.14	0.57	C	B
実施例68	硫酸アンモニウム	III型AFP	0.1	1.16	0.66	C	B
実施例69	硫酸アンモニウム	III型AFP	1.0	2.68	0.96	A	A
実施例70	硫酸アンモニウム	AFGP	1.0	3.17	2.63	A	A
実施例71	クエン酸三アンモニウム	III型AFP	0.5	2.18	0.80	A	B
実施例72	炭酸水素アンモニウム	III型AFP	0.5	1.52	0.78	B	B

[0121] [表8]

	添加剤	AFPタイプ (種類)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例73	リン酸水素ニアンモニウム	I型AFP	1.0	2.07	1.68	B	A
実施例74	リン酸水素ニアンモニウム	III型AFP	0.1	1.71	0.60	B	B
実施例75	リン酸水素ニアンモニウム	III型AFP	1.0	—	0.88	—	A
実施例76	リン酸水素ニアンモニウム	AFGP	1.0	2.93	2.30	A	A
実施例77	クエン酸ニアンモニウム	I型AFP	1.0	1.86	1.43	B	A
実施例78	クエン酸ニアンモニウム	AFGP	1.0	3.43	2.86	A	A
実施例79	亜硫酸アンモニウム(一水和物)	I型AFP	1.0	1.42	1.73	C	A
実施例80	亜硫酸アンモニウム(一水和物)	AFGP	1.0	2.69	2.35	A	A
実施例81	チオ硫酸アンモニウム	I型AFP	1.0	1.44	1.59	C	A
実施例82	チオ硫酸アンモニウム	AFGP	1.0	3.39	3.22	A	A

[0122]

[表9]

	添加剤	AFPタイプ (種類)	添加剤濃度 (質量%)	熱ヒステリシ ス活性(°C)	熱ヒステリシ ス活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例83	グルコース	III型AFP	0.5	1.34	0.82	B	A
実施例84	フルクトース	III型AFP	0.5	1.38	0.77	B	B
実施例85	ガラクトース	III型AFP	0.5	1.37	0.84	B	A
実施例86	ソルビトール	III型AFP	0.5	1.34	0.82	B	A
実施例87	ガラクトース	AFGP	30	2.70	—	A	—
実施例88	スクロース	III型AFP	0.5	1.73	0.87	B	A
実施例89	マルトース	III型AFP	0.5	2.25	0.92	A	A
実施例90	ラクトース	III型AFP	0.5	1.70	0.88	B	A
実施例91	トレハロース	III型AFP	0.5	1.73	0.98	B	A
実施例92	ラフィノース	III型AFP	0.5	1.60	0.86	B	A

[0123] [表10]

実施例	添加剤	AFPタイプ (種類)	AFP濃度 (質量%)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシ ス活性(°C)	熱ヒステリシ ス活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例93	酢酸	I型AFP	0.1	0.5	0.15	—	A	—
実施例94	酢酸	I型AFP	0.5	0.5	0.26	—	B	—
実施例95	L-アスコルビン酸	I型AFP	0.1	0.5	0.13	—	A	—
実施例96	L-アスコルビン酸	I型AFP	0.5	0.5	0.23	0.22	C	B
実施例97	クエン酸	I型AFP	0.1	0.5	0.15	—	A	—
実施例98	クエン酸	I型AFP	0.5	0.5	0.25	—	C	—
実施例99	マレイン酸	I型AFP	0.1	0.5	0.17	—	A	—
実施例100	マレイン酸	I型AFP	0.5	0.5	0.17	—	C	—
実施例101	酒石酸	I型AFP	0.1	0.5	0.10	—	A	—
実施例102	酒石酸	I型AFP	0.5	0.5	0.21	—	C	—
実施例103	クエン酸三ナトリウム	I型AFP	0.01	0.5	0.21	0.22	A	A
実施例104	クエン酸三ナトリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.52	—	A	—
実施例105	クエン酸三ナトリウム	I型AFP	0.5	0.5	1.16	—	A	—
実施例106	酢酸ナトリウム	I型AFP	0.01	0.5	0.10	—	A	—
実施例107	酢酸ナトリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.23	—	A	—
実施例108	酢酸ナトリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.40	—	A	—
実施例109	ピルビン酸ナトリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.23	—	A	—
実施例110	ピルビン酸ナトリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.38	—	A	—
実施例111	酢酸カルシウム	I型AFP	0.1	0.5	0.30	—	A	—
実施例112	酢酸カルシウム	I型AFP	0.5	0.5	0.46	0.44	A	A
実施例113	塩化ナトリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.20	—	A	—
実施例114	塩化ナトリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.37	—	B	—
実施例115	炭酸水素ナトリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.21	—	A	—
実施例116	炭酸水素ナトリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.38	—	A	—
実施例117	炭酸ナトリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.35	—	A	—
実施例118	炭酸ナトリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.63	—	A	—

[0124] [表11]

実施例	添加剤	AFPタイプ (種類)	AFP濃度 (質量%)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例119	亜硫酸ナトリウム	I型AFP	0.01	0.5	0.17	—	A	—
実施例120	亜硫酸ナトリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.34	—	A	—
実施例121	亜硫酸ナトリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.62	0.68	A	A
実施例122	チオ硫酸ナトリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.35	—	A	—
実施例123	チオ硫酸ナトリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.70	—	A	—
実施例124	硝酸ナトリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.20	—	A	—
実施例125	硝酸ナトリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.38	—	A	—
実施例126	リン酸二水素ナトリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.25	—	A	—
実施例127	リン酸二水素ナトリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.51	—	A	—
実施例128	塩化カリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.22	—	A	—
実施例129	塩化カリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.38	—	A	—
実施例130	酢酸カリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.18	—	A	—
実施例131	酢酸カリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.35	—	B	—
実施例132	炭酸カリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.28	—	A	—
実施例133	炭酸カリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.89	—	A	—
実施例134	硝酸カリウム	I型AFP	0.1	0.5	0.19	—	A	—
実施例135	硝酸カリウム	I型AFP	0.5	0.5	0.35	—	B	—
実施例136	塩化カルシウム	I型AFP	0.1	0.5	0.29	—	A	—
実施例137	塩化カルシウム	I型AFP	0.5	0.5	0.40	—	A	—
実施例138	硝酸カルシウム	I型AFP	0.1	0.5	0.18	—	A	—
実施例139	硝酸カルシウム	I型AFP	0.5	0.5	0.46	—	A	—
実施例140	塩化アンモニウム	I型AFP	0.1	0.5	0.31	—	A	—
実施例141	塩化アンモニウム	I型AFP	0.5	0.5	0.53	—	A	—
実施例142	硫酸アンモニウム	I型AFP	0.1	0.5	0.54	—	A	—
実施例143	硫酸アンモニウム	I型AFP	0.5	0.5	0.93	—	A	—

[0125]

[表12]

実施例	添加剤	AFPタイプ (種類)	AFP濃度 (質量%)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例144	硝酸アンモニウム	I型AFP	0.1	0.5	0.38	—	A	—
実施例145	硝酸アンモニウム	I型AFP	0.5	0.5	0.56	—	A	—
実施例146	酢酸アンモニウム	I型AFP	0.1	0.5	0.39	—	A	—
実施例147	酢酸アンモニウム	I型AFP	0.5	0.5	0.70	0.60	A	A
実施例148	リン酸二水素アンモニウム	I型AFP	0.1	0.5	0.47	—	A	—
実施例149	リン酸二水素アンモニウム	I型AFP	0.5	0.5	0.63	—	A	—
実施例150	クエン酸三アンモニウム	I型AFP	0.1	0.5	0.70	—	A	—
実施例151	クエン酸三アンモニウム	I型AFP	0.5	0.5	1.16	—	A	—
実施例152	クエン酸二アンモニウム	I型AFP	0.5	0.5	0.85	—	A	—
実施例153	リン酸水素二アンモニウム	I型AFP	0.1	0.5	0.43	—	A	—
実施例154	リン酸水素二アンモニウム	I型AFP	0.5	0.5	0.79	—	A	—
実施例155	亜硫酸アンモニウム (1水和物)	I型AFP	0.1	0.5	0.45	—	A	—
実施例156	亜硫酸アンモニウム (1水和物)	I型AFP	0.5	0.5	0.82	—	A	—
実施例157	チオ硫酸アンモニウム	I型AFP	0.1	0.5	0.47	—	A	—
実施例158	チオ硫酸アンモニウム	I型AFP	0.5	0.5	0.80	—	A	—

[0126]

[表13]

実施例	添加剤	AFPタイプ (種類)	AFP濃度 (質量%)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例159	酢酸	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.19	—	B	—
実施例160	L-アスコルビン酸	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.21	0.21	A	A
実施例161	クエン酸	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.22	—	A	—
実施例162	マレイン酸	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.19	—	B	—
実施例163	酒石酸	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.22	—	A	—
実施例164	クエン酸三ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.30	—	A	—
実施例165	クエン酸三ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.51	—	A	—
実施例166	酢酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.31	—	A	—
実施例167	酢酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.30	—	A	—
実施例168	ピルビン酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.18	—	A	—
実施例169	ピルビン酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.35	—	A	—
実施例170	酢酸カルシウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.23	—	A	—
実施例171	酢酸カルシウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.40	0.35	A	A
実施例172	塩化ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.23	—	A	—
実施例173	塩化ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.29	—	A	—
実施例174	炭酸水素ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.16	—	A	—
実施例175	炭酸水素ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.34	—	A	—
実施例176	炭酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.23	—	A	—
実施例177	炭酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.31	—	A	—
実施例178	亜硫酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.24	—	A	—
実施例179	亜硫酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.46	0.27	A	A
実施例180	チオ硫酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.20	—	A	—
実施例181	チオ硫酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.35	—	A	—
実施例182	硝酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.16	—	A	—
実施例183	硝酸ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.26	—	A	—

[0127]

[表14]

実施例	添加剤	AFPタイプ (種類)	AFP濃度 (質量%)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例184	リン酸二水素ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.17	—	A	—
実施例185	リン酸二水素ナトリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.34	—	A	—
実施例186	塩化カリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.17	—	A	—
実施例187	塩化カリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.25	—	A	—
実施例188	酢酸カリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.18	—	A	—
実施例189	酢酸カリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.30	—	A	—
実施例190	炭酸カリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.18	—	A	—
実施例191	炭酸カリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.26	—	A	—
実施例192	硝酸カリウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.15	—	A	—
実施例193	硝酸カリウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.23	—	A	—
実施例194	塩化カルシウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.23	—	A	—
実施例195	塩化カルシウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.36	—	A	—
実施例196	硝酸カルシウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.19	—	A	—
実施例197	硝酸カルシウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.31	—	A	—
実施例198	塩化アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.18	—	A	—
実施例199	塩化アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.45	—	A	—
実施例200	硫酸アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.35	—	A	—
実施例201	硫酸アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.52	—	A	—
実施例202	硝酸アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.28	—	A	—
実施例203	硝酸アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.43	—	A	—
実施例204	酢酸アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.32	—	A	—
実施例205	酢酸アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.45	0.39	A	A

[0128] [表15]

実施例	添加剤	AFPタイプ (種類)	AFP濃度 (質量%)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例206	リン酸二水素アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.31	—	A	—
実施例207	リン酸二水素アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.55	—	A	—
実施例208	クエン酸三アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.34	—	A	—
実施例209	クエン酸三アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.64	—	A	—
実施例210	クエン酸二アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.42	—	A	—
実施例211	クエン酸二アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.59	—	A	—
実施例212	リン酸水素二アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.28	—	A	—
実施例213	リン酸水素二アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.47	—	A	—
実施例214	亜硫酸アンモニウム (1水和物)	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.36	—	A	—
実施例215	亜硫酸アンモニウム (1水和物)	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.58	—	A	—
実施例216	チオ硫酸アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.1	0.5	0.33	—	A	—
実施例217	チオ硫酸アンモニウム	Ⅲ型AFP	0.5	0.5	0.50	—	A	—

[0129]

[表16]

実施例	添加剤	AFPタイプ (種類)	AFP濃度 (質量%)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例218	酢酸	AFGP	0.1	0.5	0.11	—	B	—
実施例219	酢酸	AFGP	0.5	0.5	0.20	—	A	—
実施例220	L-アスコルビン酸	AFGP	0.1	0.5	0.16	—	A	—
実施例221	L-アスコルビン酸	AFGP	0.5	0.5	0.15	0.18	B	B
実施例222	クエン酸	AFGP	0.1	0.5	0.12	—	B	—
実施例223	クエン酸	AFGP	0.5	0.5	0.18	—	A	—
実施例224	マレイン酸	AFGP	0.1	0.5	0.14	—	A	—
実施例225	マレイン酸	AFGP	0.5	0.5	0.26	—	A	—
実施例226	酒石酸	AFGP	0.1	0.5	0.10	—	B	—
実施例227	酒石酸	AFGP	0.5	0.5	0.22	—	A	—
実施例228	クエン酸三ナトリウム	AFGP	0.01	0.5	0.17	0.00	A	C
実施例229	クエン酸三ナトリウム	AFGP	0.1	0.5	0.29	—	A	—
実施例230	クエン酸三ナトリウム	AFGP	0.5	0.5	0.64	—	A	—
実施例231	酢酸ナトリウム	AFGP	0.01	0.5	0.13	—	B	—
実施例232	酢酸ナトリウム	AFGP	0.1	0.5	0.19	—	A	—
実施例233	酢酸ナトリウム	AFGP	0.5	0.5	0.25	—	A	—
実施例234	ピルビン酸ナトリウム	AFGP	0.1	0.5	0.16	—	A	—
実施例235	ピルビン酸ナトリウム	AFGP	0.5	0.5	0.26	—	A	—
実施例236	酢酸カルシウム	AFGP	0.01	0.5	0.13	—	B	—
実施例237	酢酸カルシウム	AFGP	0.1	0.5	0.20	—	A	—
実施例238	酢酸カルシウム	AFGP	0.5	0.5	0.32	0.32	A	A
実施例239	塩化ナトリウム	AFGP	0.01	0.5	0.14	—	A	—
実施例240	塩化ナトリウム	AFGP	0.1	0.5	0.21	—	A	—
実施例241	塩化ナトリウム	AFGP	0.5	0.5	0.24	—	A	—
実施例242	炭酸水素ナトリウム	AFGP	0.1	0.5	0.13	—	B	—
実施例243	炭酸水素ナトリウム	AFGP	0.5	0.5	0.22	—	A	—

[0130]

[表17]

実施例	添加剤	AFPタイプ (種類)	AFP濃度 (質量%)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h (°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例244	炭酸ナトリウム	AFGP	0.1	0.5	0.18	—	A	—
実施例245	炭酸ナトリウム	AFGP	0.5	0.5	0.36	—	A	—
実施例246	亜硫酸ナトリウム	AFGP	0.01	0.5	0.15	—	A	—
実施例247	亜硫酸ナトリウム	AFGP	0.1	0.5	0.20	—	A	—
実施例248	亜硫酸ナトリウム	AFGP	0.5	0.5	0.50	0.32	A	A
実施例249	チオ硫酸ナトリウム	AFGP	0.01	0.5	0.14	—	A	—
実施例250	チオ硫酸ナトリウム	AFGP	0.1	0.5	0.22	—	A	—
実施例251	チオ硫酸ナトリウム	AFGP	0.5	0.5	0.38	—	A	—
実施例252	硝酸ナトリウム	AFGP	0.1	0.5	0.18	—	A	—
実施例253	硝酸ナトリウム	AFGP	0.5	0.5	0.25	—	A	—
実施例254	リン酸二水素ナトリウム	AFGP	0.1	0.5	0.13	—	B	—
実施例255	リン酸二水素ナトリウム	AFGP	0.5	0.5	0.28	—	A	—
実施例256	塩化カリウム	AFGP	0.1	0.5	0.24	—	A	—
実施例257	塩化カリウム	AFGP	0.5	0.5	0.21	—	A	—
実施例258	酢酸カリウム	AFGP	0.1	0.5	0.15	—	A	—
実施例259	酢酸カリウム	AFGP	0.5	0.5	0.43	—	A	—
実施例260	炭酸カリウム	AFGP	0.1	0.5	0.19	—	A	—
実施例261	炭酸カリウム	AFGP	0.5	0.5	0.38	—	A	—
実施例262	硝酸カリウム	AFGP	0.1	0.5	0.17	—	A	—
実施例263	硝酸カリウム	AFGP	0.5	0.5	0.20	—	A	—
実施例264	塩化カルシウム	AFGP	0.1	0.5	0.14	—	A	—
実施例265	塩化カルシウム	AFGP	0.5	0.5	0.21	—	A	—
実施例266	硝酸カルシウム	AFGP	0.1	0.5	0.17	—	A	—
実施例267	硝酸カルシウム	AFGP	0.5	0.5	0.25	—	A	—
実施例268	塩化アンモニウム	AFGP	0.1	0.5	0.18	—	A	—
実施例269	塩化アンモニウム	AFGP	0.5	0.5	0.36	—	A	—
実施例270	塩化アンモニウム	AFGP	0.5	1	0.40	—	A	—
実施例271	塩化アンモニウム	AFGP	0.5	2	0.42	—	A	—

[0131]

[表18]

実施例	添加剤	AFPタイプ (種類)	AFP濃度 (質量%)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例272	硫酸アンモニウム	AFGP	0.5	0.5	0.06	—	C	—
実施例273	硫酸アンモニウム	AFGP	1	0.5	0.59	—	A	—
実施例274	硫酸アンモニウム	AFGP	5	0.5	1.24	—	A	—
実施例275	硫酸アンモニウム	AFGP	0.5	1	1.14	—	A	—
実施例276	硫酸アンモニウム	AFGP	1	1	1.15	—	A	—
実施例277	硫酸アンモニウム	AFGP	5	1	2.02	—	A	—
実施例278	硫酸アンモニウム	AFGP	0.5	2	2.75	—	A	—
実施例279	硫酸アンモニウム	AFGP	1	2	2.77	—	A	—
実施例280	硫酸アンモニウム	AFGP	5	2	5.14	—	A	—
実施例281	硫酸アンモニウム	AFGP	0.5	3	5.91	—	A	—
実施例282	硫酸アンモニウム	AFGP	1	3	6.11	—	A	—
実施例283	硫酸アンモニウム	AFGP	5	3	7.51	—	A	—
実施例284	硝酸アンモニウム	AFGP	0.1	0.5	0.18	—	A	—
実施例285	硝酸アンモニウム	AFGP	0.5	0.5	0.39	—	A	—
実施例286	炭酸水素アンモニウム	AFGP	0.5	0.5	0.27	—	A	—
実施例287	炭酸水素アンモニウム	AFGP	0.5	1	0.36	—	A	—
実施例288	酢酸アンモニウム	AFGP	0.1	0.5	0.34	—	A	—
実施例289	酢酸アンモニウム	AFGP	0.5	0.5	0.74	0.55	A	A
実施例290	酢酸アンモニウム	AFGP	0.5	1	0.54	—	A	—
実施例291	酢酸アンモニウム	AFGP	0.5	2	0.77	—	A	—
実施例292	リン酸二水素アンモニウム	AFGP	0.5	0.5	0.44	—	A	—
実施例293	リン酸二水素アンモニウム	AFGP	0.5	1	0.6	—	A	—
実施例294	リン酸二水素アンモニウム	AFGP	0.5	2	1.00	—	A	—

[0132]

[表19]

実施例	添加剤	AFPタイプ (種類)	AFP濃度 (質量%)	添加剤濃度 (M)	熱ヒステリシス 活性(°C)	熱ヒステリシス 活性h(°C)	促進 効果	耐熱 効果
実施例295	クエン酸三アンモニウム	AFGP	0.1	0.5	0.45	—	A	—
実施例296	クエン酸三アンモニウム	AFGP	0.5	0.5	0.77	—	A	—
実施例297	クエン酸三アンモニウム	AFGP	0.5	1	1.33	—	A	—
実施例298	クエン酸三アンモニウム	AFGP	0.5	2	2.07	—	A	—
実施例299	クエン酸二アンモニウム	AFGP	0.1	0.5	0.49	—	A	—
実施例300	クエン酸二アンモニウム	AFGP	0.5	0.5	0.76	—	A	—
実施例301	クエン酸二アンモニウム	AFGP	0.5	1	1.06	—	A	—
実施例302	クエン酸二アンモニウム	AFGP	0.5	2	2.23	—	A	—
実施例303	リン酸水素二アンモニウム	AFGP	0.1	0.5	0.33	—	A	—
実施例304	リン酸水素二アンモニウム	AFGP	0.5	0.5	0.51	—	A	—
実施例305	リン酸水素二アンモニウム	AFGP	0.5	1	0.83	—	A	—
実施例306	リン酸水素二アンモニウム	AFGP	0.5	2	2.17	—	A	—
実施例307	亜硫酸アンモニウム (1水和物)	AFGP	0.1	0.5	0.40	—	A	—
実施例308	亜硫酸アンモニウム (1水和物)	AFGP	0.5	0.5	0.48	—	A	—
実施例309	亜硫酸アンモニウム (1水和物)	AFGP	0.5	1	0.88	—	A	—
実施例310	亜硫酸アンモニウム (1水和物)	AFGP	0.5	2	1.56	—	A	—
実施例311	チオ硫酸アンモニウム	AFGP	0.1	0.5	0.37	—	A	—
実施例312	チオ硫酸アンモニウム	AFGP	0.5	0.5	0.46	—	A	—
実施例313	チオ硫酸アンモニウム	AFGP	0.5	1	0.78	—	A	—
実施例314	チオ硫酸アンモニウム	AFGP	0.5	2	2.00	—	A	—

[0133] 上記表3～19に示した実施例1～314において、熱ヒステリシス活性が比較例よりも1.5倍以上促進された場合の促進効果を「A」とし、1.0倍超1.5倍未満促進された場合の促進効果を「B」とし、1.0倍以下で促進されなかった場合の促進効果を「C」として評価した。

また、上記表3～9に示した実施例1～92において、熱ヒステリシス活性hが比較例よりも1.5倍以上である場合の耐熱効果を「A」とし、1.0倍超1.5倍未満である場合の耐熱効果を「B」とし、1.0倍以下で促進されなかった場合の促進効果を「C」として評価した。促進効果又は耐熱効果を評価していない場合は「—」と表記した。

[0134] 以上の結果から、本発明に係る熱ヒステリシス活性増加方法、熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法及び熱ヒステリシス活性増加用組成物は、前記

増加効果及び／又は前記低減効果に優れることが明らかである。

産業上の利用可能性

- [0135] 本発明の熱ヒステリシス活性増強方法、熱ヒステリシス活性の熱失活の低減方法及び熱ヒステリシス活性増加用組成物は、水を含む食品や工業用薬液等に適用することによって、前記食品や前記工業用薬液を保冷する際の氷結晶の成長や氷の再結晶化を抑制して、前記食品の口溶けを滑らかにしたり、前記食品や前記工業用薬液中で氷が成長することによる弊害を防止したりするために広く利用することが可能である。

請求の範囲

[請求項1] 不凍蛋白質と水とを含む組成物の示す熱ヒステリシス活性を増加させる方法であって、

前記水に、前記不凍蛋白質と下記添加剤群Aから選ばれる何れか一種以上の物質とを混合することを含む、前記熱ヒステリシス活性を増加させる方法。

添加剤群A；有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、スぺルミジン、スぺルミン、及びN，N－ジメチルホルムアミド

[請求項2] 不凍蛋白質と水とを含む組成物の示す熱ヒステリシス活性の、加熱処理後の失活を低減させる方法であって、

前記水に、前記不凍蛋白質と下記添加剤群Bから選ばれる何れか一種以上の物質とを混合することを含む、前記熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。

添加剤群B；有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、アセトン、ジオキサン、2－クロロエタノール、及びN，N－ジメチルホルムアミド

[請求項3] 不凍蛋白質と水と添加剤とを含む熱ヒステリシス活性増加用組成物であって、

前記添加剤は、有機酸、有機酸塩、無機塩、アミノ酸、アミノ酸塩、アンモニウム塩、糖類、糖アルコール類、尿素、グアニジン塩酸塩、スぺルミジン、スぺルミン、アセトン、ジオキサン、2－クロロエタノール、及びN，N－ジメチルホルムアミドからなる群から選ばれる何れか一種以上の物質を含む、熱ヒステリシス活性増加用組成物。

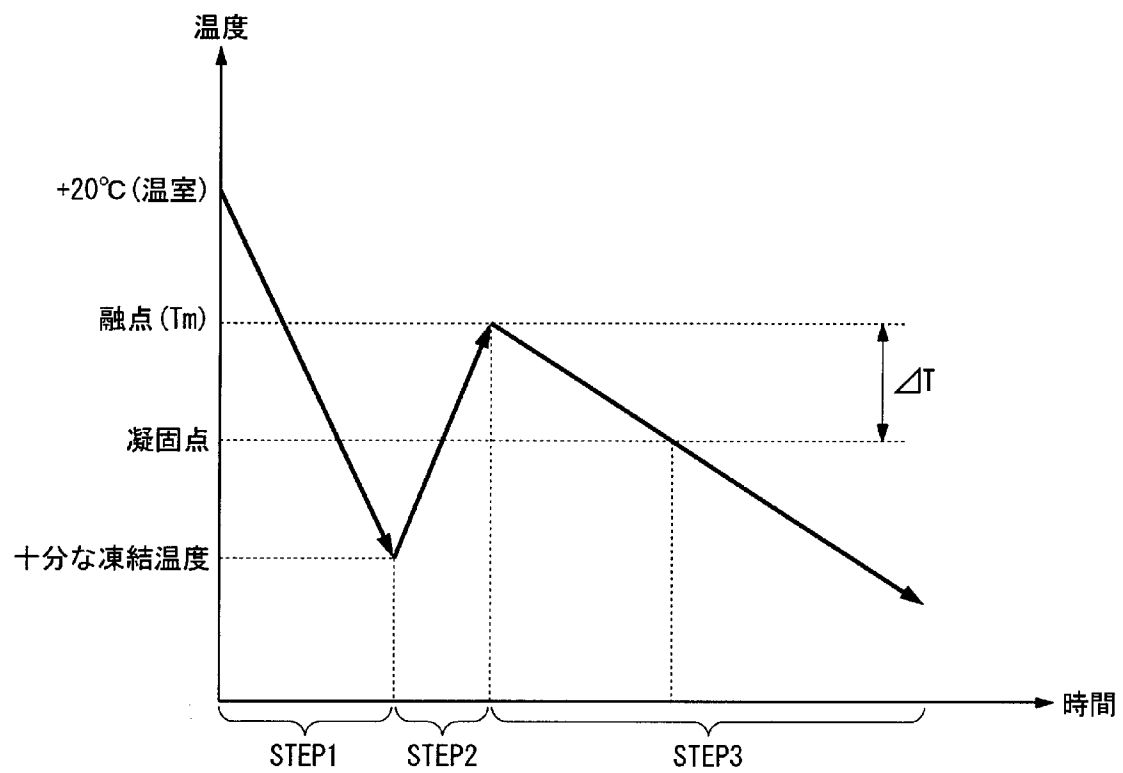
[請求項4] 前記不凍蛋白質が魚類由来である、請求項1に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。

[請求項5] 前記不凍蛋白質が魚類由来である、請求項2に記載の熱ヒステリシ

ス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。

- [請求項6] 前記不凍蛋白質が魚類由来である、請求項3に記載の熱ヒステリシス活性増加用組成物。
- [請求項7] 前記不凍蛋白質がⅠ型の不凍蛋白質である、請求項4に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。
- [請求項8] 前記不凍蛋白質がⅠⅠ型の不凍蛋白質である、請求項4に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。
- [請求項9] 前記不凍蛋白質がⅠⅠⅠ型の不凍蛋白質である、請求項4に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。
- [請求項10] 前記不凍蛋白質がA F G P型の不凍蛋白質である、請求項4に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。
- [請求項11] 前記不凍蛋白質がⅠ型の不凍蛋白質である、請求項5に記載の熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。
- [請求項12] 前記不凍蛋白質がⅠⅠ型の不凍蛋白質である、請求項5に記載の熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。
- [請求項13] 前記不凍蛋白質がⅠⅠⅠ型の不凍蛋白質である、請求項5に記載の熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。
- [請求項14] 前記不凍蛋白質がA F G P型の不凍蛋白質である、請求項5に記載の熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。
- [請求項15] 前記水、前記不凍蛋白質及び前記添加剤の混合物における前記不凍蛋白質の含有濃度が、0.01～10質量%である、請求項1に記載の熱ヒステリシス活性を増加させる方法。
- [請求項16] 前記水、前記不凍蛋白質及び前記添加剤の混合物における前記不凍蛋白質の含有濃度が、0.01～10質量%である、請求項2に記載の熱ヒステリシス活性の加熱処理後の失活を低減させる方法。
- [請求項17] 前記熱ヒステリシス活性増加用組成物における、前記不凍蛋白質の含有濃度が、0.01～10質量%である、請求項3に記載のヒステリシス活性増加用組成物。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069338

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L3/37(2006.01) i, C07K14/46(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L3/37, C07K14/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-094752 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 24 April 2008 (24.04.2008), entire text (Family: none)	1-17
A	JP 2007-182421 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 19 July 2007 (19.07.2007), entire text & US 2007/0134647 A1 & EP 1829890 A1	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 September, 2011 (30.09.11)

Date of mailing of the international search report
11 October, 2011 (11.10.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069338

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-284983 A (Nichirei Corp., National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 14 October 2004 (14.10.2004), entire text & US 2006/0177810 A1 & EP 1606997 A1 & WO 2004/082378 A1	1-17
A	JP 2004-083546 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 18 March 2004 (18.03.2004), entire text & US 2005/0019856 A1 & EP 1452539 A1 & WO 2003/044052 A1	1-17

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. A23L3/37(2006.01)i, C07K14/46(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. A23L3/37, C07K14/46			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 1 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 1 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 1 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JDreamII), PubMed			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
A	JP 2008-094752 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2008.04.24, (ファミリーなし) 全文	1 - 1 7	
A	JP 2007-182421 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2007.07.19, & US 2007/0134647 A1 & EP 1829890 A1 全文	1 - 1 7	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 3 0 . 0 9 . 2 0 1 1		国際調査報告の発送日 1 1 . 1 0 . 2 0 1 1	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 福澤 洋光 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	4 B 3 9 6 3

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2004-284983 A (株式会社ニチレイ、独立行政法人産業技術総合研究所) 2004.10.14, & US 2006/0177810 A1 & EP 1606997 A1 & WO 2004/082378 A1 全文	1 - 17
A	JP 2004-083546 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2004.03.18, & US 2005/0019856 A1 & EP 1452539 A1 & WO 2003/044052 A1 全文	1 - 17