

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4338054号
(P4338054)

(45) 発行日 平成21年9月30日 (2009. 9. 30)

(24) 登録日 平成21年7月10日 (2009. 7. 10)

(51) Int. Cl. F 1
A 2 3 G 9/04 (2006. 01) A 2 3 G 9/04
A 2 3 G 9/32 (2006. 01) A 2 3 G 9/02
A 2 3 G 9/44 (2006. 01)
A 2 3 G 9/52 (2006. 01)

請求項の数 9 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平10-508418	(73) 特許権者	ユニリーバー・ナームローゼ・ベンノート シャープ
(86) (22) 出願日	平成9年7月4日 (1997. 7. 4)		オランダ国、3013・エイエル・ロッテ ルダム、ヴェーナ 455
(65) 公表番号	特表2000-515752 (P2000-515752A)	(74) 代理人	弁理士 志賀 正武
(43) 公表日	平成12年11月28日 (2000. 11. 28)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP1997/003635	(74) 代理人	弁理士 岡田 希子
(87) 国際公開番号	W01998/004146	(72) 発明者	フェン、リチャード・アンソニー
(87) 国際公開日	平成10年2月5日 (1998. 2. 5)		英国、シャーンブルック・エムケイ44・ 1エルキュー、ユニリーバー・ハウス、ユ ニリーバー・リサーチ・コルワース・ラボ ラトリー (番地なし)
審査請求日	平成16年6月29日 (2004. 6. 29)		
(31) 優先権主張番号	96305497.8		
(32) 優先日	平成8年7月26日 (1996. 7. 26)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	96305498.6		
(32) 優先日	平成8年7月26日 (1996. 7. 26)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 不凍剤ペプチドを有する冷凍食品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

その食品における氷結晶が 1. 9 より大きな、幅で割った長さとして定義されるアスペクト比を有するように条件を選択する、魚蛋白質であり且つ優先的に氷結晶の第一又は第二プリズム面に結合する不凍ポリペプチドを含有する凍結された食品の製造方法。

【請求項 2】

アスペクト比が 2. 0 乃至 2. 9 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

アスペクト比に影響を与えるための条件が、凍結速度、凍結中の製品の可動性、保存温度及び保存時間、食品の配合物並びに不凍ポリペプチドの性質及び量並びにそれらの組み合わせからなる群から選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

凍結された食品が凍結された菓子製品である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

魚蛋白質であり且つ優先的に氷結晶の第一又は第二プリズム面に結合する、0. 0001 乃至 0. 5 重量%の不凍ポリペプチドを含み、1. 9 より大きい氷結晶アスペクト比を有する、凍結された菓子製品。

【請求項 6】

アスペクト比が 2. 0 乃至 2. 9 である、請求項 5 に記載の凍結された菓子製品。

【請求項 7】

個別の要素の請求項 5 に記載の菓子製品を含む、食感の対比を有する凍結された菓子製品。

【請求項 8】

ウォーターアイス薄層と交互にアイスクリーム薄層を含み、ウォーターアイス薄層が、0.0001 乃至 0.5 重量%の不凍ポリペプチドを含み、2.0 乃至 2.9 の氷結晶アスペクト比を有する、請求項 7 に記載された菓子製品。

【請求項 9】

請求項 5 に記載の凍結された菓子製品が、不凍タンパク質を含まないアイスクリームコアを覆う、請求項 7 に記載の凍結された菓子製品。

【発明の詳細な説明】

発明の技術的分野

本発明は、A F P 類を含有する食品の製造方法及び A F P 類を含有する食品に関する。

発明の背景

食料品の凍結耐性を改良するための不凍剤ペプチド類 (anti-freeze peptides) (A F P s) が提示されている。

不凍剤蛋白質は、文献に記載されており、例えば、Marilyn Griffith 及び K. Vanya Ewart による Biotechnology Advances、13 巻、3 号、375-402 頁 (1995 年) を参照されたい。不凍剤特性は、一般的に 1 つ以上の下記の性質を有する：熱によるヒステリシス、氷の再結晶の障害、氷晶形状の制御及び氷成核剤との相互作用。

熱によるヒステリシスは、A F P 類の最もよく知られた性質であり、その性質は、通常、A F P 類の存在を試験するために用いられる。熱によるヒステリシスは、融点に影響を与えずに、熱によるヒステリシス活性 A F P を含有する溶液のみかけの凍結温度の低下からもたらされる。熱によるヒステリシス試験による A F P の供給源の同定は文献中に広範に記載されており、例えば、John G Duman による Cryobiology 30、322-328 頁 (1993 年) を参照されたい。

氷再結晶の障害は、A F P 類のもう一つの性質である。この活性度は、氷晶成長抑制ともいわれるこの性質は、時間における特定の時点において、A F P の存在下での及び A F P の不存在下での結晶の氷晶サイズを比較することにより試験され得る。魚の A F P 類の試験におけるこの方法の用途が、米国特許第 5,118,792 号 (DNA Plant Technology Corporation) に記載されている。

A F P 類の第三の性質は、氷晶の形状に影響を与える能力である。この性質は、氷晶の特定の面への A F P 類の選択的結合、それに伴って、特定の方向における結晶成長を制限することから生じる。従って、六辺形の双ピラミッド形状を有する氷晶の存在は A F P の存在を示すものと考えられる。この方法は、例えば、国際出願公開 (WO) 92/22581 号 (University of Waterloo) に、細胞外のウィンター・ライ (winter rye) の A F P 類の活性度を試験するために記載されている。

A F P 類の第四の性質は、氷成核物質の活性を阻害する能力である。A F P と氷成核剤との相互作用は、例えば、増大された熱によるヒステリシスをもたらす。この性質は、例えば、国際出願公開 (WO) 96/40973 号 (University of Notre dame du Lac) において試験されている。

A F P 類は、製品の凍結耐性を改良するために提示されてきた。これに関連する多くの用途が提示されてきた。

例えば、A F P 類は、生物物質の低温保存を増大するために提示されている [国際出願公開 (WO) 91/12718 (Agouron Pharmaceuticals)、国際出願公開 (WO) 91/10361 (The Regents of the University of California)]。又、A F P 類は、例えば化粧品又は医薬品において、リポソームからの漏水を防ぐために提示されている [国際出願公開 (WO) 96/20695 を参照]。さらに可能な用途は、その中に A F P を含有させる [又は、その中に遺伝子工学的 (transgenetically) に生成させる] ことにより植物の不凍耐性を増大させることである [Lee らによる J. Cell. Biochem. Suppl., 14 e 巻 (1990 年)、303 頁、XP002030248、abstract 228 を参照]。又、魚の A F P 類は、食品、例えば、フローズ

10

20

30

40

50

ンヨーグルト又はアイスクリームにおける食品における使用を提示している [米国特許第5,620,732号 (Pillsbury) 及び国際出願公開 (WO) 96/11586 (HSC Research and development limited partnership)]。

しかし、現在までに、A F P類の使用は、商業規模では行われていない。本願出願人らは、商業的实施がなされていない原因の1つは、多くのA F P類が記載されているが、現実問題として、実際の商業的製品における実施には重大な問題が立ちはだかっていることであると考えている。

それらの問題の主要な理由の1つは、文献中に記載された多数のA F P類のうち、限られた一連のA F P類のみしか、各用途に適合して用いることができないことであることを本願出願人らは見出した。又、本願出願人らは、適するA F P類のこの選択は、望ましい用途及び/又は達成されるべき製品の特性によることも見出した。

国際出願公開 (WO) 90/13571には、化学的に又は組換えDNA技術により生成された不凍剤ペプチドが開示されている。それらのA F P類は、アイスクリームのような食品に適合して用いられている。実施例3Bには、ウォーターアイス混合物が0.01重量%のA F Pと組み合わされてフィルムに凍結された場合の改変された氷晶形状が示されている。

国際出願公開 (WO) 92/22581には、植物からのA F P類が開示されている。この文献には又、葉に抽出媒体を浸透させることによる、植物細胞を破断せずに細胞外区域からポリペプチド組成物を抽出する方法が記載されている。

国際出願公開 (WO) 94/03617には、酵母からのA F P類の生成及びアイスクリームにおけるそれらの可能な使用が開示されている。国際出願公開 (WO) 96/11586には、微生物から生成された魚A F P類が記載されている。

本発明は、低温において長期保存されたときに維持される比較的硬質で脆性の組織 (texture) を有する凍結された食品を提供することを目的とする。

いくつかの文献の箇所には、A F P類が、アイスクリームのような凍結菓子製品の組織性に好影響を与えるために潜在的に用いられ得ることが提示されている。しかし、それらの文献のほとんどが、実際に実施においてそれらの良好な特性をいかに達成することができるかということを教示していない。

国際出願公開 (WO) 96/11586 (まだ公開されていない) には、凍結された発酵食品における魚不凍剤ポリペプチドの用途が教示されている。硬くて脆い製品は記載されていない。

国際出願公開 (WO) 96/39878 (まだ公開されていない) には、特定の凍結法を用いることによるアイスクリームにおけるA F Pの用途が記載されている。この用途のための適するA F P類は、南極魚、北極魚、虫及び昆虫の血液及び筋肉組織から誘導され得る。ここにも、硬くて脆い製品は記載されていない。

予期せぬことに、氷晶形状が特定の要件を満たすように製品及び加工条件が変わる限り、望ましい製品特性をもたらすためにA F P類が凍結された食品に都合よく組み込まれることができることが見出された。

従って、第一の面において、本発明は、その製品における氷晶が1.9より大きい、好ましくは1.9乃至3.0のアスペクト比を有するように、条件が選ばれる、A F Pを含む凍結食品の製造法に関する。

食品が凍結されると、その製品全体に氷晶が形成される。凍結される食品にA F P類が含まれていると、氷-再結晶特性 (ice-recrystallisation properties) における良好な効果がもたらされ得る。A F P含有製品の氷晶の凝結により、その製品の脆性がもたらされ得る。

多くの消費者は、アイスクリーム及びウォーターアイス (water-ice) のような、比較的硬くて脆い凍結された食品又はそれらの成分を好む。例えば、凍結された菓子製品における魅力的な成分としてパリパリした噛み心地のウォーターアイスが用いられ得て、又、比較的硬いアイスクリームは、多数の消費者により好まれている。

予期せぬことに、A F P類は、一方では比較的硬くて脆く、そして他方では、改良された氷-再結晶化阻止特性を有する凍結された食品を配合することを可能にすることが見出だ

10

20

30

40

50

された。本願出願人は、その製品における氷晶のアスペクト比が1.9より大きく、好ましくは1.9乃至3であるときに、特性の有利なこの組み合わせが達成され得ることを見出した。

氷晶のアスペクト比は、氷晶の長さとの幅の比であると定義される。上記のアスペクト比、好ましくは1.9乃至3のアスペクト比は、丸い形状ではない細長い氷晶に相当する。結晶のアスペクト比は、いずれかの適する方法により決定され得る。好ましい方法を実施例において示す。好ましくは、アスペクト比は、2.0乃至2.9、最も好ましくは2.1乃至2.8である。

好ましくは、本発明の凍結された製品は脆い。好ましくは、破壊挙動が観察され得る層の最小の厚さは、10mm未満であり、より好ましくは1乃至5mmである。破壊挙動は、異なる厚さの層を用意し、それらにおいて、最小厚さ破壊挙動が起こるかを決定することにより測定されるか又は、実施例に記載されているようにヤング率から計算され得る。

食品の配合及び続いての食品の凍結の間に、いくつかのパラメーターが形成される氷晶のアスペクト比に影響を与え得る。アスペクト比に影響を与える因子の例を下記に示す。本願発明者らは、氷晶のアスペクト比を望ましい範囲内にするようにそれらの条件を選択することは、全く当業者の能力の範囲内であると考える。

氷晶のアスペクト比に影響を与える1つの因子は、その製品を凍結させる速度である。一般的に述べると、凍結の速度の増大は氷晶のアスペクト比の低減をもたらす。これに関して、凍結の温度は、凍結の速度に影響を与え得て、それに伴って、氷晶のアスペクト比に影響を与える。これに関連して、例えば、 -30°F より低い温度における、硬化工程を含む凍結工程がときには好ましい。保存温度及び保存時間は、アスペクト比に等しく影響を与え、従って、より高い保存温度及び／又はより長い保存時間は、高いアスペクト比の形成に好影響を与える傾向を有する。

氷晶のアスペクト比に影響を与える他の因子は、凍結する間の製品の可動性である。例えば、液体のウォーターアイス又はアイスクリームミックスが凍結されると、静的に凍結することは氷晶についてかなり高いアスペクト比をもたらす、一方、攪拌は、低いアスペクト比をもたらす。高剪断混合は、なお低いアスペクト比をもたらす。

氷晶のアスペクト比に影響を与える他の因子は、成分の存在及び量である。例えば、その製品に網状構造を形成する傾向がある成分（例えば、ガム又は脂肪）の存在は、それらの成分がない製品のアスペクト比よりも低いアスペクト比をもたらす得る。又、他の成分は、より低いアスペクト比をもたらす得る。例えば、固体の高含量、例えば砂糖の高含量は低いアスペクト比をもたらす。

最後には、存在するAFP類の性質及び量がアスペクト比の変化をもたらす。あるAFP類は低いアスペクト比の形成に影響を与えるようであり、他のAFP類は、より高いアスペクト比を誘導するようである。それらのAFP類を選択するための適する試験は、実施例に記載されている。AFP類の量の変化もアスペクト比の変化をもたらす得る。

第二の態様では、本発明は、その製品における氷晶が1.9乃至3のアスペクト比を有するように配合、凍結及び保存条件を選択する、AFPを含む凍結された食品の製造方法に関する。

本発明の方法は、AFP類を含有するすべての凍結された食品に適用することができる。適する製品の例は、ソース類、ミール類 (meals) 等である。好ましい食品は、アイスクリーム及びウォーターアイスのような凍結された菓子製品である。

本願発明者らは、本発明の方法において用いられるAFP類が、植物、魚類、昆虫類及び微生物類のような多くの供給源から得られることを見出した。天然起源の種類又は、遺伝子変換により得られた種類の両方とも用いられる。例えば、微生物又は植物が遺伝子変換されてAFP類を発現し、次にAFP類は、本発明により用いられる。

下記のように、AFP類を製造するのに遺伝子変換技術が用いられる：適する宿主細胞又は生物体は、望ましいポリペプチドを含有する遺伝子構築物により形質転換される。転写及び翻訳のための必要な要素をコードする適する発現ベクターにポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を挿入し得て、そのような方法で、適する条件下（適切な配向及び正

10

20

30

40

50

確な読取り枠及び適する標的化及び適する発現配列)でA F P類が発現する。それらの発現ベクターを構築するために必要な方法は当業者によく知られている。

ポリペプチドをコードする配列を発現するための多くの発現系が用いられ得る。それらには、細菌、酵母、昆虫細胞系、植物細胞培養系及び植物が含まれるがそれらには限定されず、それらすべては、適する発現ベクターで形質転換される。

広範な種類の植物及び植物細胞系が、望ましいポリペプチドの核酸構築物で形質転換されることができる。好ましい態様には、トウモロコシ、トマト、タバコ、ニンジン、苺、菜種及びテンサイが含まれるが、それらに限定されない。

本発明の目的のためには、好ましいA F P類は魚から誘導される[すなわち、A F P類は、魚から直接得られるか又は他の生物体により遺伝子工学的に産生された魚蛋白質である]。特に好ましいのは、タイプIIIの魚蛋白質の使用であり、最も好ましいのは、本願出願人の出願であり公開されていないP C T / E P 96 / 02936 (W O 97 / 2343)に記載されているようなH P L C 12である。

10

ある天然の供給源では、A F P類は、2つ以上の異なるA F P類の混合物から成る。

好ましくは、重要な氷-再結晶阻止特性を有するA F P類が選ばれる。好ましくは、本発明によるA F P類は、再結晶時に、好ましくは実施例において測定された、20 μ mより小さい、より好ましくは5乃至15 μ mの氷粒度を備える。特定のアスペクト比と組み合わせられた小さな氷粒度は望ましい構造的特徴を得るために特に有利であると考えられる。

本発明の非常に有利な態様は、生成物の製造において、先に定義されたアスペクト比をなお得ながら、静的な凍結条件が用いられ得るように選ばれる生成物配合物に関する。

20

そのような食品の例は、周囲温度又は冷蔵庫温度で保存されることを意図したアイスクリームミックス及びウォーターアイスミックスのような凍結された菓子ミックスである。適する製品形態は、例えば、袋又は小さな袋(sachets)中に充填される、例えば粉末ミックスである。前記のミックスは、例えば、水の添加及び他の成分の添加及び任意の曝気の後凍結された食品の基礎を形成することができる。

適するミックスの他の例は、もし必要なら、他の成分の添加及び任意の曝気の後、凍結されることができる液体ミックス(任意に曝気された)であることができる。

上記のミックスの明らかな利点は、A F P成分の存在により、そのミックスが静的な条件下で例えば、店のフリーザー又は家庭のフリーザーで凍結されることを可能にすることである。

30

非常に都合よく、それらのミックスは、密閉された容器(例えば、カートン、袋、箱、プラスチック容器等)中に充填される。単位分量の場合、その一包みのサイズは一般的に10乃至1,000 gである。複数単位を収納する場合では、500kgまでの一包みのサイズが適している。一般的に一包みのサイズは、10 g乃至5,000 gである。

先に記載したように、A F P類が用いられる好ましい製品は、アイスクリーム又はウォーターアイスのような凍結された菓子製品である。好ましくは、A F P類の量は、最終製品に基づいて0.0001乃至0.5重量%である。乾燥ミックス又は濃縮体が用いられる場合は、その濃度は、凍結された最終製品における量が上記の範囲内であることを確保するためにより高いレベルであり得る。

予期せぬことに、本発明の組成物は、非常に少ない量のA F Pしか含有しなくてよく、それでも良好な品質を有することが見出された。

40

今まで、再結晶特性の適度の改良を得るためには、かなり多い量のA F Pが必要であると一般的に考えられてきた。その理由は、A F P類は、氷晶の表面のかかなりの部分において作用し、従って、適度の効果を得るためには、かなり多い量、例えば、0.01重量%以上の量で存在する必要があると通常考えられているからである。

予期せぬことに、凍結された製品にとって、改良された再結晶特性及び増大された温度耐性は、少量のA F P類が用いられる場合にすでに得られるということが見出された。

予期せぬことに、A F P類の量が、0.1乃至50 p p mもの低さであり得て、なお、凍結された菓子製品において適切な再結晶特性及び温度耐性を与えることが見出された。本願出願人は、決して、どの理論にも縛られることを望むものではないが、この理由は、凍結

50

された菓子の固体とA F P類との間の相互作用が、結晶成長を阻止するための優れた機構を与えることであろう。最も都合よくは、A F Pの量は、1乃至40 p p m、特に好ましくは2乃至10 p p mである。

本発明の目的のためには、凍結された菓子製品という用語には、アイスクリーム、フローズンヨーグルト、シャーベット (sherbet、sorbet)、アイスマルク及びフローズンカスタード、ウォーターアイス、グラニータ及びフローズンフルーツピューレのような牛乳含有の凍結された菓子が含まれる。ある用途のためには、凍結された発酵食品におけるA F Pの使用は、それほど好ましくない。

好ましくは、凍結された菓子における固体 (砂糖、脂肪、風味剤等) の量は、4重量%より多く、好ましくは30重量%より多く、より好ましくは40乃至70重量%である。

本発明の非常に好ましい態様では、氷菓子において組織対比を生じさせるために、硬い、パリパリした噛み心地の凍結菓子配合物が用いられる。好ましくは、そのような氷菓子は、それらの構造において別の要素として本発明によるA F P含有組成物を含有する。例えば、比較的柔らかいアイスクリームコアを本発明の組成物の薄層で覆い、それによって、アイスクリームコアを囲んだ比較的硬いそしてパリパリした噛み心地の層を与える。他の態様は、本発明の配合物の氷菓子における含有物としての組入れである。第三の態様は、アイスクリーム層と交互の薄いパリパリした噛み心地の層を形成するための、本発明の配合物との交互の層のアイスクリームである。

実施例 I

アイスクリームを製造するためのプレミックスを下記の成分を混合することにより調製した。

成分	重量%
脱脂粉乳	10.00
蔗糖	13.00
マルトデキストリン (M D 40)	4.00
ローカストビーンガム	0.14
バターオイル	8.00
モノグリセリド (パルミテート)	0.30
バニリン	0.01

A F P (タイプIII H P L C -12

国際出願公開97/2343を参照) 0.01又は、なし (対照)

水 残量

このミックスは、周囲温度で、例えばプラスチック容器中で都合よく保存され得る。

このミックスは、2,000 p s i 及び65°Cでの均質化、次に5°Cにおいて一晩熟成させることによるアイスクリームの製造において用いられることができる。フリーザー [240 r p m回転する固体ダッシャーを備えたM F 50 SSHE Technohoy] を用いてそのミックスを凍結した。その押し出し温度は、-4.5°Cであり、オーバーランは110%であった。次にその生成物を-35°Cにおいて凍結させ、-80°Cで保存した。

2ヶ月の保存の後には、本発明の組成物は、対照の試料よりも、顕著に良好な組織を有した。

実施例 II

下記の配合を有するアイスクリームを製造した。

成分	重量%
脱脂粉乳	10.00
蔗糖	13.00
マルトデキストリン (M D 40)	4.00
ローカストビーンガム	0.14
バターオイル	8.00
モノグリセリド (パルミテート)	0.30
バニリン	0.01

A F P (タイプIII H P L C -12) 0.01又は、なし (対照)
水 残量

製造の方法は、実施例 I における通りであった。

両方の試料をプロラン環境キャビネット (Prolan environmental cabinet) 中で -18°C で約12時間平衡にした。薄いガラスプレートの中央からアイスクリームの薄層を塗ることに
より顕微鏡用スライドを調製した。

各スライドを温度制御された顕微鏡台 (-18°C における) に移し、氷晶 (約400の個々の氷晶) の像を集め、像の保存及び分析系統へ移動させ、これをビデオカメラにより撮影した。

氷晶の周囲に線を描き、その全体の結晶を強調することにより、保存された氷晶像を手動
で強調した。次に、最も長い直線 (長さ)、最も短い直線 (幅) を完成させるために必要
なピクセルの数、アスペクト比 (長さ/幅) を計測する像分析ソフトウェアを用いて強調
された結晶の像を測定した。

結晶についての平均アスペクト比を計算した。

対照の試料では、アスペクト比は1.45であった。

A F Pを含有する試料では、アスペクト比は2.24であった。

実施例III

実施例IIのアイスクリームの脆性をアイスクリームの破壊挙動についての計算により決定
した。3点曲げ試験を用いてヤング率を測定した。

ヤング率は、アイスクリーム片を用意し、それをフリーザーキャビネット中で18時間平衡
にし、それを温度キャビネットに移すことにより測定した。その断片を、R.P.Brown編のH
andbook of Plastics Test Methods (2版)、George Godwin Ltd.、1981年に記載された
ように3点曲げ試験リグに置いた。50mm/分の変形速度 (deformation speed) で直ちに
試料の試験を行った。力-変形曲線から、初期の勾配を測定し、下記の式によるヤング率
を計算するために用いた。

$$\text{ヤング率 (Pa)} = \frac{\text{勾配} \cdot L}{4 \cdot B \cdot W}$$

(式中、Lは、ビームスパン (110mm)、Bは試料の幅、Wは試料の高さである)

通常、8つの試料を試験して、平均ヤング率値を出した。Williams及びCawoodによるPoly
mer Testing、9巻、15乃至26頁 (1990年) に記載された計算を用いて、破壊靱性が計算
できる。

その結果は、下記の通りである：対照試料では脆性層を得るために966mの厚さが必要で
あると計算された。A F P含有試料では脆性 (破壊挙動) は、3mmの厚さですで見出だ
されていた。このことは、本発明の製品の改良された脆性を示している。両方の試料は比
較的柔らかい製品を与えた。

実施例IV

本実施例は、本発明において好ましい氷晶形状の形成に好影響を与えるA F P類を選択す
る方法論を記載する。

通常的环境下での氷晶成長は、結晶のa軸に沿っている。A F P類が存在する場合、その
成長は変わる。結晶形状のこの選択的影響は、A F P類が氷晶の特定の部分に結合する傾
向があるという事実により、そしてこれにより特定の方向における氷晶の成長を阻止する
ことにより説明できる。結合は、プリズム面 (prism plane) において (a軸に対して垂
直に) 又はピラミッド面 (pyramidal plane) において行われる (それらの平面からの方
向に) 。

本願出願人は、本発明による、アスペクト比の形成に好影響を与えるA F P類は、例えば、
プリズム面に結合する傾向があるA F P類を選択することにより見られ得ることを見出
だした。それらの特異的に結合するA F P類を選択する方法論はすべての適する方法論で
あり得る。適する試験では、いわゆる、Knight C.A.、C.C. Cheng及びA.L. DeVriesによ
るBiophys. J.、59巻 (1991年) 419-418頁、Adsorption of α -helical antifreeze pept

10

20

30

40

50

ides on specific ice crystal surface planeに記載された技術に基づいた「氷の単結晶“半球”成長実験 (Single ice crystal “hemisphere” growth experiment)」が用いられる。

非常に断熱された (insulated) 5lプラスチックビーカーを脱イオン水で満たし、1℃に温度制御されたキャビネット内に置いた。次に、上からゆっくりと凍結させた。2日後に、約4cm厚さの氷の単結晶がビーカーを覆った。この結晶の配向を単結晶X線回析法を用いて決定した。約2cm寸法の氷の立方体が、1つの表面がプリズム面に対して平行であり、もう一方が基礎面に対して平行であるように大きな単結晶から切断された。このように配向された氷の単結晶を生成した。

黄銅低温触針 (brass cold finger) (約1cmの直径) から成る装置を用いて、その上で配向された種結晶を凍結させた。その種結晶がそのまわりに合うようにその種を最初にくりぬいた。その後に冷却剤をその触針の全体に循環させ、その種は触針にしっかりとくっついた。

次に種結晶を有する触針を、検査する物質の溶液を含有する断熱された100ml容のビーカー内に少し浸した。その溶液の初期温度は室温 (約18℃) であり、唯一の冷却が低温触針により与えられた。最初に種結晶は部分的に融解したが次に単結晶の半球に成長した。数時間 (6乃至8時間) 後、5乃至7cmの直径を有する半球が形成された。

種々のAFP溶液を用いて、この実験を行った。用いたAFP溶液は、 10^{-3} mg/mlのAFPの濃度を有していた。

次にその半球を低温触針から取り、-15℃に温度制御されたキャビネットに移した。その表面をこすり、そのキャビネットに少なくとも一晚 (16時間以上) 放置した。一体式ファンにより空気をキャビネット中に循環させた。この時間の間に、氷の表面層の蒸発が起こった。従って、氷半球の表面は滑らかな鏡面を有するようになった。しかし、AFPを含有する半球では粗いつぎはぎ様部分が表面に見られた。それらは、AFPが半球の表面に結合しているつぎはぎ様部分に相当する。大きなAFP分子は、氷分子が蒸発するのを防ぎ、従って、氷への優先的結合が起こる表面でAFP分子の粗いマット (mat) が積み上げられた。この半球の配向は知られており、それらの粗いつぎはぎ様部分と基礎のプリズム方向の間の角距離を光学測角器により測定することができるので、結合面の性質を容易に決定できる。

第一の又は第二のプリズム面に結合する傾向があるAFP類を選択するためにこの試験を用いることができる。例えば、冬ガレイ (Winter founder) からの又はアラスカガレイ (Alaskan plaice) からのAFPタイプIは(20-21)¹結合部位に結合する傾向があり、南極タラ (Antartic cod) からのAFGP類は(10-10)³又は⁵結合部位に結合する傾向があり、南極ゲンゲ科魚 (Antarticeel pout) は(10-10)²又は³結合部位に結合する傾向がある。

氷晶の高アスペクト比の形成に好影響を与える傾向を有するAFP類を決定するために上記試験を用いることは、十分に当業者の能力の範囲内である。本発明の凍結された製品におけるそれらの適合性を試験するために、実際の製品を製造し、その製品中の結晶のアスペクト比を決定することができる。

実施例 V

再結晶時の氷晶サイズを決定するための試験

AFP含有水溶液の試料を蔗糖量を30重量%に調整する (試料の出発量が30%より多い場合は、希釈により行い、出発量が30%よりも少ない場合は、30%量まで蔗糖を添加した。)

一般的に、この試験は、AFP及び水を含有するすべての適する組成物に適用できる。一般的に、そのような試験組成物におけるAFPの量はあまり臨界的ではないが、例えば、0.0001乃至0.5重量%、より好ましくは0.0005乃至0.1重量%、最も好ましくは0.001乃至0.05重量%、例えば、0.01重量%であることができる。

3 μ l 滴の試料を22mmのカバーガラス上に置く。次に16mmの直径のカバーガラスを上置き、200gの重りをその試料上に置き、均等なスライド厚さにした。カバーガラスの端を

10

20

30

40

50

透明のマニキュア液で密閉する。

そのスライドをリンクム（Linkham）T H M600温度制御顕微鏡台におく。その台を迅速に -40°C まで冷却（分当り 50°C ）し、小結晶の多くの固体群を生成する。次にその台の温度を -6°C まで迅速に上げて（分当り 50°C ）、この温度において保持する。

その氷相を -6°C において、ライカ・アリストプラン（Leica Aristoplan）顕微鏡を用いて観察する。ラムダプレートと共に偏光条件を用いて氷晶の対比を増大した。35mmの顕微鏡写真技術により氷相の状態（氷晶の大きさ）を $T = 0$ 及び $T = 1$ 時間において記録した。それにより、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 未満、より好ましくは5乃至 $15\text{ }\mu\text{m}$ の平均粒度（目視測定、数平均）は、本発明による製品における使用では好ましいA F P類を示している。

フロントページの続き

- (72)発明者 ニーダム、デビッド
英国、シャーンブルック・エムケイ４４・１エルキュー、ユニリーバー・ハウス、ユニリーバー・
リサーチ・コルワース・ラボラトリー（番地なし）
- (72)発明者 スモールウッド、キース
英国、シャーンブルック・エムケイ４４・１エルキュー、ユニリーバー・ハウス、ユニリーバー・
リサーチ・コルワース・ラボラトリー（番地なし）

審査官 松田 芳子

- (56)参考文献 特開平０７－０５０９９４（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－２４５１４１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９２／０２２５８１（ＷＯ，Ａ１）
特表平０４－５０５３２９（ＪＰ，Ａ）
特開昭６２－２８５７７３（ＪＰ，Ａ）
特表平１０－５０８７５９（ＪＰ，Ａ）

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A23G 9/00 - 9/52