[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780008726.8

[51] Int. Cl.
C07K 14/435 (2006.01)
A23J 1/04 (2006.01)
A23J 3/04 (2006.01)
A23L 3/36 (2006.01)
A23B 4/08 (2006.01)
A23L 1/10 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 4 月 1 日

[11] 公开号 CN 101400695A

[51] Int. Cl. (续)
A23L 1/16 (2006.01)
A23L 1/32 (2006.01)
A23L 1/325 (2006.01)
[22] 申请日 2007.3.13
[21] 申请号 200780008726.8
[30] 优先权
[32] 2006. 3.13 [33] JP [31] 067758/2006
[86] 国际申请 PCT/JP2007/054989 2007.3.13
[87] 国际公布 WO2007/105734 日 2007.9.20
[85] 进入国家阶段日期 2008.9.11
[71] 申请人 日本水产株式会社
地址 日本东京都
[72] 发明人 千叶智 久保田光俊 西泽聪子 冈本直子 铃木贤一
[74] 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司
代理人 钟 晶
权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 11 页

[54] 发明名称

具有抗冻活性的来自甲壳类的蛋白质

[57] 摘要

本发明提供一种来自甲壳类的具有抗冻活性的蛋白质，该蛋白质利用十二烷基硫酸钠(SDS)－聚丙烯酰胺电泳法测定分子量，在还原条件下，其分子量为约 37000、约 16000 和/或约 15400，N 末端氨基酸用序列号 1 或 2 来表示。该蛋白质在安全性、活性、生产率、价格等方面比以往的抗冻蛋白质优异，可以用于以食品为主的广泛领域。

1. 一种来自甲壳类的具有抗冻活性的蛋白质。

2. 根据权利要求 1 所述的具有抗冻活性的蛋白质，其中，来自甲壳类的蛋白质是下述这样的蛋白质：利用十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺电泳法测定分子量，在还原条件下，其分子量为约 37000、约 16000 和/或约 15400，N 末端氨基酸用序列号 1 或 2 来表示。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的具有抗冻活性的蛋白质，其中，甲壳类是属于虾类、螯虾类、蟹类、磷虾类、虾蛄类中的任一类的物质。

4. 一种具有抗冻活性的甲壳类提取物，其含有来自甲壳类的具有抗冻活性的蛋白质。

5. 根据权利要求 4 所述的具有抗冻活性的甲壳类提取物，其中，来自甲壳类的具有抗冻活性的蛋白质是下述这样的蛋白质：利用十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺电泳法测定分子量，在还原条件下，其分子量为约 37000、约 16000 和/或约 15400，N 末端氨基酸用序列号 1 或 2 来表示。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的具有抗冻活性的甲壳类提取物，其中，甲壳类是属于虾类、螯虾类、蟹类、磷虾类、虾蛄类中的任一类的物质。

7. 一种具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其特征在于，从甲壳类的壳、肉和/或内脏进行热水提取。

8. 根据权利要求 7 所述的具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其中，使用 60℃以上的热水来进行热水提取。

9. 一种具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其特征在于，对压榨甲壳类的肉和/或内脏而得到的体液，或者壳、肉和/或内脏的提取液进行加热处理和/或还原处理。

10. 根据权利要求 9 所述的具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其中，压榨甲壳类的肉和/或内脏而得到的体液，或者壳、肉和/或内脏的提取液是对其中所含有的蛋白质进行了精制和/或浓缩的物质，所述蛋白质是下述这样的蛋白质：利用十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺电泳法测定分子量，在非还原条件下分子量为约 200000，在还原的情形中，显示出约 86000 的带

和约90000的带，N末端氨基酸用序列号3或4表示。

11. 根据权利要求9或10所述的具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其中，用添加有表面活性剂的提取液，从甲壳类的壳、肉和/或内脏进行提取。

12. 根据权利要求9、10或11所述的具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其中，加热处理为在60℃以上进行，还原处理为添加还原剂。

13. 根据权利要求7至12中任一项所述的具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其中，甲壳类是属于虾类、螯虾类、蟹类、磷虾类、虾蛄类中的任一类的物质。

14. 一种食品的质量改良剂，其含有：权利要求1至3中任一项所述的具有抗冻活性的蛋白质、权利要求4至6中任一项所述的具有抗冻活性的甲壳类提取物、或者用权利要求7至13中任一项所述的方法制造的具有抗冻活性的甲壳类提取物。

15. 一种质量改良的食品，其特征在于，添加权利要求14所述的质量改良剂。

16. 根据权利要求15所述的食品，其中，食品是冻结食品。

17. 根据权利要求15或16所述的食品，其中，食品是使用鸡蛋、小麦粉或鱼肉作为材料的食品。

具有抗冻活性的来自甲壳类的蛋白质

技术领域

本发明涉及具有抗冻活性的蛋白质及其制造方法、应用。

背景技术

通常说水在0℃下成为冰，但严格来讲，已知有即使冷却纯水，在0℃下也不开始冻结，即使在凝固点以下的温度也不冻结的过冷现象。水的冻结是以如下过程进行的，即，当温度为0℃以下时，存在于水中的某种物质成为冰的核，来生长结晶。如果可控制该冻结现象，就能应用于以食品的冻结保存技术、微生物或生物组织的保存技术等为代表的，人工降雨技术、冷热输送技术等各领域

作为与水的冻结有关系的物质而被关注的是冰核蛋白质（Ice Nuclear Protein; INP）和抗冻蛋白质（Anti-Freeze Protein; AFP）。

冰核活性细菌是具有使即使在-20℃也不冻结的纯水在-2~-4℃冻结的能力的细菌，作为水开始冻结时的核来发挥作用，这样的细菌是引起植物产生冻伤害的原因。作为该冰核活性细菌，已知有假单胞菌属（Pseudomonas）、欧文氏菌属（Erwinia）的细菌（非专利文献1、2）。冰核蛋白质是从这些冰核活性细菌得到的具有冰核活性的蛋白质。冰核蛋白质大半来自微生物，也有人提出在食品领域中的应用，但是现状是并不太实用。

抗冻蛋白质是显示出阻止冰晶生长的活性的蛋白质，是由多种在低温环境下生活的生物种类所产生的蛋白质。这些生物种类是在南极海或低温环境下生活的鱼、在寒冷地带生长的植物、在寒冷地带越冬的甲虫的幼虫、适应于低温的微生物等。此前，有人报导了来自植物的抗冻蛋白质（专利文献1，2）、来自地衣类的抗冻蛋白质（专利文献2）、来自鱼的抗冻蛋白质（专利文献3，4）、来自昆虫的抗冻蛋白质（专利文献5）等。虽然从这么广的范围的生物种类得到抗冻蛋白质，但是，还没有对于来自甲壳类的抗冻蛋白质的报导。

专利文献1：国际公开WO98/04148公报

专利文献 2：国际公开 WO99/37673 公报

专利文献 3：国际公开 WO96/11586 公报

专利文献 4：国际公开 WO97/02343 公报

专利文献 5：国际公开 WO99/00493 公报

专利文献 6：国际公开 WO90/13571 公报

非专利文献 1：Appl. Microbiol. 28, p456,（1974）

非专利文献 2：Proc. 4th Int. Cont. Plant. Path. Bact. P725,（1978）

发明内容

发明要解决的问题

本发明的课题在于提供一种在安全性、活性、生产性、价格等方面良好，可在以食品领域为代表的广阔领域使用的、具有抗冻活性的物质。

解决问题的手段

发明人考虑到，由于从很多种类的生物物种中发现了抗冻蛋白质，因此，南极海中生存的磷虾也许也含有这样的蛋白质，基于这样的想法，而开始了试验，但是用公知的文献中记载的方法，并没能得到具有抗冻活性的物质。通过钻研提取方法，发现了具有抗冻活性的蛋白质，进一步发现了具有冰核活性的蛋白质。此外，也研究了磷虾以外的甲壳类，结果，通过采用同样的提取方法，成功地得到了类似的蛋白质。

本发明提供（1）～（3）的具有抗冻活性的蛋白质。

（1）一种来自甲壳类的具有抗冻活性的蛋白质。

（2）根据（1）的具有抗冻活性的蛋白质，其中，来自甲壳类的蛋白质是这样的蛋白质，即，利用十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺电泳法测定分子量，在还原条件下，其分子量约为 37000、约 16000 和/或约 15400，N 末端氨基酸用序列号 1 或 2 来表示。

（3）根据（1）或（2）的具有抗冻活性的蛋白质，其中，甲壳类属于虾类、螯虾类、蟹类、磷虾类、虾蛄类中的任一类。

本发明提供（4）～（6）的具有抗冻活性的甲壳类提取物。

（4）一种具有抗冻活性的甲壳类提取物，其含有来自甲壳类的具有抗冻活性的蛋白质。

（5）根据（4）的具有抗冻活性的甲壳类提取物，其中，来自甲壳类的具有抗冻活性的蛋白质是这样的蛋白质，即，利用十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺电泳法测定分子量，在还原条件下，其分子量约为37000、约16000和/或约15400，N末端氨基酸用序列号1或2来表示。

（6）根据（4）或（5）的具有抗冻活性的甲壳类提取物，其中，甲壳类属于虾类、螯虾类、蟹类、磷虾类、虾蛄类中的任一类。

本发明提供（7）~（13）的具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法。

（7）一种具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其特征在于，从甲壳类的壳、肉和/或内脏进行热水提取。

（8）根据（7）的具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其中，热水提取是60℃以上的热水。

（9）一种具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其特征在于，对压榨甲壳类的肉和/或内脏而得到的体液，或者壳、肉和/或内脏的提取液进行加热处理和/或还原处理。

（10）根据（9）的具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其中，对压榨甲壳类的肉和/或内脏而得到的体液，或者壳、肉和/或内脏的提取液是对其中所含有的蛋白质进行了精制和/或浓缩的物质，所述蛋白质为，利用十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺电泳法测定分子量，在非还原条件下分子量约为200000，在还原的情形中，显示出约86000的带和约90000的带，对N末端氨基酸用序列号3或4表示。

（11）根据（9）或（10）的具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其中，用添加有表面活性剂的提取液，从甲壳类的壳、肉和/或内脏进行提取。

（12）根据（9）、（10）或（11）的具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其中，加热处理为60℃以上，还原处理为添加还原剂。

（13）根据（7）至（12）中任一种具有抗冻活性的甲壳类提取物的制造方法，其中，甲壳类属于虾类、螯虾类、蟹类、磷虾类、虾蛄类中的任一类。

本发明提供（14）~（17）的含有具有抗冻活性的蛋白质或具有抗冻活性的甲壳类提取物的食品的质量改良剂及添加该质量改良剂的食品。

（14）一种食品的质量改良剂，其含有：（1）至（3）中任一项所述的具

有抗冻活性的蛋白质、（4）至（6）中任一项所述的具有抗冻活性的甲壳类提取物或者用（7）至（14）中任一项所述的方法制造的具有抗冻活性的甲壳类提取物。

（15）一种质量改良的食品，其特征在于，添加（14）的质量改良剂。

（16）根据（15）的食品，其中，食品是冻结食品。

（17）根据（15）或（16）的食品，其中，食品是使用鸡蛋、小麦粉或鱼肉作为材料的食品。

发明效果

本发明的具有抗冻活性的蛋白质，是适于添加到食品中的来自甲壳类的蛋白质，因此能够添加于各种食品。特别是通过添加于冻结食品，可以抑制冷冻食品的冷冻所引起的质量劣化。另外，由于在甲壳类中被废弃的壳也含有很多抗冻蛋白质，因此可以废物利用，并且廉价地制造。

附图说明

图 1 是表示实施例 1 的从磷虾中提取的蛋白质的色谱图像的图。

图 2 是表示实施例 1 的 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤柱色谱图像的图。

图 3 是表示实施例 1 的 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤柱色谱图像的图。

图 4 是确认本蛋白质试样 1 的分子量的、使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的电泳的照片。

图 5 是确认本蛋白质试样 2 的分子量的、使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的电泳的照片。

图 6 是表示实施例 4 的抗冻活性的测定结果的图。

图 7 是实施例 4 的测定抗冻活性的试验中的双锥型的冰晶的照片。

图 8 是表示本蛋白质试样 2 的抗冻活性的温度稳定性的图。

图 9 是表示本蛋白质试样 2 的抑制再结晶活性的测定结果的图。

图 10 是表示提取粉末 A 和 B 的 SDS-聚丙烯酰胺电泳分析结果的照片。

图 11 是表示提取粉末 A 和 B 的抗冻活性的测定结果的图。

图 12 是测定提取粉末 A 的抗冻活性的试验的六角平面状的冰晶的照片。

图 13 是测定提取粉末 B 的抗冻活性的试验的六角平面状的冰晶的照片。

图 14 是表示提取粉末 A 和 B 的抑制冰晶再结晶的活性的测定结果的图。

图 15 是表示实施例 8 的从磷虾干燥粉末中提取的蛋白质的 Superdex G30 凝胶过滤色谱图像的图。

图 16 是表示实施例 8 的反相 HPLC 的图像的图。

图 17 是表示实施例 8 的反相 HPLC 的图像的图。

图 18 是表示淀粉凝胶中的来自磷虾的提取粉末的防止脱水收缩效果的图（图中，壳是指使用来自磷虾的提取粉末 B 的数据，整体是指使用来自整个磷虾的提取粉末 A 的数据）。

图 19 是用电子显微镜观察未添加提取粉末的淀粉凝胶（冷冻保存 7 天）的照片。

图 20 是用电子显微镜观察添加有提取粉末 A 的淀粉凝胶(冷冻保存 7 天）的照片。

图 21 是表示添加有提取粉末 B 的鱼肉末的盐溶解性的图。

图 22 是表示添加有提取粉末 B 的鱼肉末的 DMA 生成量的图。

具体实施方式

在本发明中，所说的甲壳类是指，节肢动物大颚亚门甲壳纲，进一步指分类成头虾亚纲（Cepharocarida）、桨足亚纲（Remipedia）、鳃足亚纲（Branchiopoda）、颚足亚纲（Maxillopoda）、软甲纲（Malacostraca）的动物。可以举出尤其是经常用作水产产业上食用的虾目（十足目）中所含有的虾、螯虾、蟹、磷虾目的磷虾、南极磷虾、虾蛄目的虾蛄等。

在本发明中，抗冻活性用热滞效应来评价。所说的热滞效应是指，通常水的冻结温度和凝固点相同，但是，如果存在抗冻蛋白质这样的物质则会向冰晶的表面结合，抑制结晶的生长，使凝固点降低，而此时产生的熔融温度和冻结温度的差。在本说明书的实施例中，作为抗冻活性，利用渗压计（例如，Vogel 公司制造的 OSMOMETER OM 801），求出溶液的凝固点，评价热滞效应。

在冻结的水因温度上升而少量溶解时，溶化的水再次在残存的冰晶的周围冻凝，因此，存在冰晶的大小不断生长变大，或者小的冰晶彼此相结合而形成大的结晶的现象。这种现象被称作冰晶的再结晶化。在本发明中，所说的抑制冰晶再结晶的活性，是抑制这种再结晶化的活性。即，将小的冰晶维持在小的状态下的活性。本发明的抗冻蛋白质具有这种抑制冰晶再结晶的活性，不仅可

以抑制在冷冻食品等的冷冻之时的食品的质量劣化，也可抑制冷冻保存中的温度变化所引起的食品的质量劣化。

在本发明中，抑制冰晶再结晶的活性的有无，通过用显微镜观察冰晶、观察微小冰晶数的方法来测定。即，将溶解于30%蔗糖溶液的具有抑制冰晶再结晶的活性的蛋白质试样2μl滴加在盖玻片上，进一步在其上放上盖玻片夹住，放在可控制温度的光学显微镜（奥林巴斯公司制造的BH2型显微镜，林克曼公司制造的LK600温度控制装置）的载物台上，以0.1℃/秒的速度反复进行冷却、加热，使冷却载物台内的温度依次为20℃、-30℃、20℃、-30℃、20℃、-30℃、-10℃，然后，在-10℃保持30分钟，将具有10.01~35μm^{2}的面积的冰晶作为微小冰晶，数出其个数。如果不添加具有抑制冰晶再结晶的活性的物质，则冰晶生长得较大，微小冰晶减少，而如果有抑制冰晶再结晶的活性，则微小冰晶数增多。

为了制造本发明的具有抗冻活性的蛋白质，首先要从甲壳类提取蛋白质。可以使用用于将蛋白质提取、分离、浓缩的常用的方法。即，将存在于甲壳类的所有组织进行破碎得到悬浊液，离心分离得到的悬浊液，去除不溶性物质。此时，通过使用表面活性剂（阴离子系、非离子系、两性离子系、阳离子系、高分子表面活性剂等），可促进可溶化，增加提取性。非离子系的表面活性剂特别适宜。得到的上清液可用如下所示的常用方法来分离·浓缩蛋白质。作为利用盐析的方法，有利用硫酸铵分级分离的分离·浓缩方法。作为利用有机溶剂的分离·浓缩方法，有使用丙酮、乙醇、丙醇、甲醇的方法。使用盐酸、硫酸、三氯醋酸的酸沉淀法。使用水溶性聚合物（聚乙二醇、右旋糖酐的分离·浓缩方法。利用超滤（膜浓缩）的分离·浓缩方法。可以用离子交换色谱载体、疏水色谱载体、羟磷灰石色谱载体、反相色谱载体和凝胶过滤色谱载体来分别吸附·分离。此外，也可以加热处理上清液使其他的蛋白质热变性来沉淀。另外，得到的分离物也可以用冷冻干燥或喷雾干燥等进行粉末化。此外，也可以利用具有抗冻活性的蛋白质吸附于冰晶表面的性质，通过冰晶从含有蛋白质的水溶液中分离。

通过对用上述方法得到的蛋白质，实施加热处理、还原处理或者加热还原处理，来生成显示出抗冻活性的蛋白质。通过添加2-巯基乙醇、二硫苏糖醇、

抗坏血酸等还原剂，并进一步加热，来显示出抗冻活性。为了得到具有抗冻活性的蛋白质，优选在提取处理、分离·浓缩处理时，适时添加还原剂并进行加热处理等，但是，即使不添加而只实施加热处理也能得到。

作为具体的制造例，将甲壳类的肉、内脏和/或壳的冷冻品、生品或干燥品进行破碎来制造出悬浊液。如果对其进行热水提取，则可直接得到本发明的抗冻蛋白质。另外，通过对在低温提取的蛋白质进行加热处理或还原处理使其分解，也可得到本发明的抗冻蛋白质。此时，热水提取优选为 60℃以上，特别优选为 80℃以上。另外，在 0~60℃的低温进行提取时，通过对提取液实施加热处理（使温度为 60℃以上）或者利用 2-巯基乙醇、二硫苏糖醇、抗坏血酸等还原剂进行处理，可分解提取的蛋白质，得到抗冻蛋白质。

本发明的具有抗冻活性的蛋白质，含有这样的蛋白质，即，利用十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺电泳法测定分子量，在还原条件下，其分子量约为 37000、约 16000 和/或约 15400，N 末端氨基酸用序列号 1 或 2 来表示。上述提取液本身就具有抗冻活性，但是在进一步精制、浓缩时，可以将这些蛋白质的特征精制、浓缩至指标。

本发明的蛋白质具有抗冻活性、抑制冰晶再结晶的活性，因此，通过添加于食品中，可以抑制由于冻结所引起的食品劣化。对食品的添加量根据食品的种类、使用目的来定，但是相对于食品的总重量，在实施例 1 的本发明本蛋白质试样 2、实施例 8 的各提取粉末这样的纯度的提取物的情形中，优选添加 0.00001%~10%，更优选添加 0.0001%~0.1%左右。

以下，记载了本发明的实施例，但是本发明并不限于这些实施例。

实施例 1

<从南极磷虾（整体）提取·精制具有抗冻活性的蛋白质>

对冷冻南极磷虾 80g，使用 420ml 的含有 50mM 碳酸氢铵（pH7.9）、1mM PMSF 的提取液，用均化器进行悬浊。向该悬浊液中加入 Triton-X100（sigma 公司制造）使其为 0.1%，在冰浴下搅拌 1 小时。然后，对该悬浊液在 10000×g 的条件下进行 30 分钟的离心分离，对得到的上清液进行硫酸铵分级分离。即，对添加 35~65%饱和硫酸铵而得到的沉淀，在 10000×g 的条件下进行 30 分钟的离心分离，并回收。对该沉淀添加含有 1M 硫酸铵、50mM 碳酸氢铵（pH7.9）

（A液）的溶液使其悬浊。对该悬浊液在10000×g的条件下进行20分钟的离心分离，将得到的上清液供于用上述A液的缓冲液平衡的2.6cm×20cm(106ml)的疏水柱色谱（TOYOPEARL Phenyl 650M 东曹公司制造），使用50mM碳酸氢铵（pH7.9）（B溶液）用线性梯度洗脱蛋白质。结果，得到图1所示的色谱的A峰的级分。

进一步将该级分放入透析膜，在其周围涂满聚乙二醇 6000（和光纯药工业株式会社制造），在4℃静置大约3小时，浓缩大约10倍。接着，将其在10mM碳酸氢铵（pH7.9）溶液中于 4℃透析一晚。透析后，供于用同溶液预先平衡的1.6cm×60cm的Sephacryl S-200 HR凝胶过滤柱色谱。得到图2所示的色谱的箭头所示峰的级分。将该级分放入透析膜，用蒸馏水进行透析，然后，将其冷冻干燥。通过该精制方法从80g的冷冻南极磷虾中得到80mg的蛋白质（本蛋白质试样1）。

向该本蛋白质试样1中加入2-巯基乙醇，使其终浓度为1mM，在85℃加热5分钟，再次供于Sephacryl S-200 HR凝胶过滤色谱。结果，如图3所示，在低分子侧出现峰B。收集该峰B级分，通过冷冻干燥进行浓缩。利用该方法从102mg的本蛋白质试样1中得到70mg的蛋白质（本蛋白质试样2）。

实施例2

<蛋白质的分子量的确认>

通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳来测定本蛋白质试样1的分子量。使用10%丙烯酰胺凝胶，采用含有0.1%SDS、25mM三羟甲基氨基甲烷、192mM甘氨酸（pH8.6）的缓冲液，以12mA进行约2小时的电泳，然后，用CBB R-250来对蛋白质进行染色。结果显示出，该蛋白质具有由大约86kDa或90kDa的单体构成的约200kDa的亚单位结构（图4；最左列表示分子量标记，从左边数第2列表示200kDa的亚单位，第3列表示86kDa或90kDa的单体）。糖链的确认，是在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后，将凝胶在室温下于7.5%的醋酸溶液中浸渍约1小时。接着，移入0.2%过碘酸中，在4℃温育45分钟。进一步，移入希夫试剂（和光纯药工业（株））中，冷冻45分钟。然后，除去希夫试剂，用10%醋酸洗涤。结果，86kDa、90kDa、200kDa的带显色，表示这些蛋白质带有糖（图4；从右边数第2列）。脂质的确认是通过Nile Blue A（耐尔蓝A）

来检测。Nile Blue A 溶液是通过将 0.25g 溶解于 100ml 的蒸馏水中，然后加入 1ml 浓硫酸，之后煮沸 2 小时，用过滤器过滤来制成的。向该溶液中移入电泳后的凝胶，在 50℃温育 30 分钟。然后，移入 5%醋酸溶液中，在 50℃温育 2 天，进一步，在这之后在 0.5%盐酸溶液中温育 5 分钟，用蒸馏水洗涤。结果，86kDa、90kDa、200kDa 的带显色，表示这些蛋白质结合了脂肪酸（图 4；最右列）。

对本蛋白质试样 2，通过用 15-25%丙烯酰胺凝胶进行电泳，在 37kDa、16kDa 和 15.4kDa 确认出带（图 5）。

实施例 3

对本蛋白质试样 1 的 N 末端氨基酸序列进行分析。即，与实施例 2 同样地进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后，采用半干转印装置转印至聚偏氟乙烯膜上。并且，切下本蛋白质试样 1 的带，用氨基酸测序仪（ABI 公司制造的 473A 型氨基酸测序仪）来分析其 N 末端氨基酸序列。从其结果可知，本蛋白质试样的 N 末端的氨基酸序列如序列表的序列号 3 和 4 所示。另外，这也显示出，在本蛋白质试样 1 中，存在具有类似的氨基酸序列的同等型。

同样地，对于本蛋白质试样 2 的 37 kDa 的蛋白质，分析 N 末端氨基酸序列。从其结果可知，本蛋白质试样 2 的 N 末端的氨基酸序列如序列表的序列号 1 和 2 所示。另外，这也显示出，在本蛋白质试样 2 中，存在具有类似的氨基酸序列的同等型。

实施例 4

<抗冻活性的测定>

对上述本蛋白质试样 1 和本蛋白质试样 2，测定热滞效应来作为抗冻活性。通过 Vogel 公司制造的 OSMOMETER OM 801 来求出溶液的凝固点，求得热滞效应。结果，用本蛋白质试样 2 时，在蛋白质浓度为 0~10mg/ml 的范围内，热滞效应浓度依赖性地上升，在浓度为 10mg/ml 时，显示出 0.42℃的热滞效应（图 6）。另一方面，用本蛋白质试样 1 时，未发现热滞效应的上升。该结果显示出，在还原条件下生成的低分子量的蛋白质具有抗冻活性。

另外，直接用显微镜观察冰晶，以在该形态中是否有双锥型或六角形等特征的变化，来调查抗冻活性的有无。将精制的蛋白质溶液 1μl 滴在盖玻片上，

进一步在其上放盖玻片夹住，并放在奥林巴斯公司制造的 BH2 型显微镜的载物台上，通过林克曼公司制造的 LK600 温度控制装置，对冷却载物台内的温度以每秒 0.1℃的速度进行冷却，观察冰晶。结果，在添加本蛋白质试样 2 的情形中，观察到图 7 所示的双锥型的冰晶。

<温度稳定性>

对本蛋白质试样 2 的温度稳定性进行试验。将各试样溶解于 50mM 碳酸氢铵水溶液（pH7.9）（蛋白质浓度 7.5mg/ml），在 0~90℃中分别保持 1 小时，然后，测定抗冻活性。结果显示出，对于在 0℃保持的试样的活性，抗冻活性保持 100~110%，是热稳定的（图 8）。

实施例 5

<抑制再结晶活性的测定>

作为本蛋白质试样 2 的抑制冰晶再结晶的活性，用显微镜观察冰晶，观察微小冰晶数。即，将溶解于 30%蔗糖溶液的本蛋白质试样 2μl 滴加在盖玻片上，进一步，在其上放上盖玻片夹住，放在光学显微镜（奥林巴斯公司制造的 BH2 型）的载物台上，利用温度控制装置（林克曼公司制造的 LK600），以 0.1℃/秒的速度反复进行冷却、加热，使冷却载物台内的温度依次为 20℃、-30℃、20℃、-30℃、20℃、-30℃、-10℃，然后，在-10℃保持 30 分钟，数出具有 10.01~35μm^2 的面积的冰晶作为微小冰晶。结果，如图 9 所示在浓度 1.0×10^{-2}mg/ml 上显示出峰，确认具有抑制冰晶再结晶的活性。

实施例 6

<从南极磷虾的各部位得到的本蛋白质试样 1 的精制>

为了确认在磷虾的什么部位上较多地含有上述本蛋白质试样 1，而将其分为眼球、身体的肉、肝胰脏、壳，用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行确认，结果，确认在哪个部位都存在。由于确认特别是在壳中较多地含有，因此，从南极磷虾的壳中，用与实施例 1 相同的方法进行精制，结果，从 10g 的壳中得到 20mg 的蛋白质。

实施例 7

<来自甲壳类的蛋白质的抗冻活性的测定>

对来自磷虾以外的甲壳类的蛋白质的抗冻活性进行观察。通过与实施例 1

同样的方法，从阿拉斯加蟹（Paralithodes camtschaticus）、雪蟹（Chionoecetes opilio）、克氏原螯虾（Procambarus clarkii）的壳精制加热生成物，进行观察，结果确认具有抗冻活性（表 1）。

表 1

	原材料重量（g）	提取量（mg）	收率（%）	抗冻活性（℃）*1	冰核活性（℃）*2
南极磷虾（壳）	10	20	0.2	0.4	-6.83
雪蟹（壳）	20	2	0.01	0.48	-9.2
阿拉斯加蟹（壳）	30	3	0.01	0.24	-6.83
克氏原螯虾（壳）	12	6	0.05	0.3	-5.6

*1：蛋白质浓度是 1mg/ml　*2：蛋白质浓度是 0.1mg/ml

实施例 8

<从南极磷虾提取抗冻蛋白质的提取方法的研究>

1. 从整个磷虾中提取

用食品加工器粉碎 2kg 冷冻磷虾后，制成加入 2L 自来水的悬浊液。接着，将制成的悬浊液在 80℃加热 30 分钟，之后，以 5000G 离心分离 30 分钟，回收上清液 2.6L。在 45℃减压浓缩该上清液，得到 0.52L 浓缩液。用喷雾干燥机干燥该浓缩液，得到粉末（提取粉末 A）。得到的粉末的重量是 121g，该粉末中含有的蛋白质的比例是 24.2%。

2. 从磷虾壳干燥物中提取

从磷虾中将壳分离并干燥后，进行粉碎，得到磷虾壳干燥物。对得到的磷虾可干燥物 1kg 加入 7L 自来水，制成悬浊液。接着，对制成的悬浊液在 80℃加热 30 分钟后，以 5000G 离心分离 30 分钟，回收上清液 4.7L。在 45℃减压浓缩该上清液，得到 0.86L 浓缩液。用喷雾干燥机干燥该浓缩液，得到粉末（提取粉末 B）。得到的粉末的重量是 124g，该粉末中含有的蛋白质的比例是 10.6%。

对所述提取粉末 A 和 B 进行 SDS-聚丙烯酰胺电泳分析。确认出在提取粉末 A 中含有分子量 37kDa 的蛋白质，在提取粉末 B 中含有 16kDa 和 15.4kDa 的蛋白质。（图 10）

<提取粉末 A 和 B 的抗冻活性的测定 1>

观察提取粉末 A 和 B 的抗冻活性。将提取粉末在蒸馏水中悬浊后，通过乙醇沉淀处理进行脱盐，然后用渗压计测定热滞效应。对于两种提取粉末均确认出热滞效应蛋白质浓度依赖性地上升（图 11）。从以上结果显示出，用上述提取方法制造的来自磷虾的提取粉末，含有具有抗冻活性的蛋白质。另外，如表 2 所示，当比较每 1mg/ml 的热滞效应时，观察到从磷虾壳干燥物提取的提取粉末 B 的抗冻活性与提取粉末 A 相比，其抗冻活性为 3 倍左右的强度。

表 2

	热滞效应（℃/mg）
来自整个磷虾的提取粉末 A	0.0163
来自磷虾壳的提取粉末 B	0.0472

<提取粉末 A 和 B 的抗冻活性的测定 2>

通过显微镜观察由来自磷虾的提取粉末所产生的冰晶的生长抑制效果。将提取粉末在蒸馏水中悬浊后，以 2 片盖玻片夹住，放在显微镜中设置的冷却载物台中。使冷却载物台内的温度降低至-30℃，使悬浊液暂时冻结后，升温至 0℃附近，制成冰晶的颗粒。接着，以 1℃/min 的速度降低冷却载物台内的温度，观察随着温度降低而生长的冰晶的样子。使用来自磷虾的提取粉末 A、来自磷虾壳的提取粉末 B 的悬浊液时，如图 12、13 所示，冰晶的生长受到抑制，观察到了六角平面状的冰晶。因而，显示出这两种提取粉末具有冰晶生长抑制效果。

<提取粉末 A 和 B 的抑制冰晶再结晶的活性的测定>

对来自磷虾的提取粉末所产生的冰晶的再结晶控制效果进行观察。即，将溶解于 30%蔗糖溶液的本蛋白质试样 2μl，滴加在盖玻片上，进一步，在其上放上盖玻片夹住，放在光学显微镜（奥林巴斯公司制造的 BH2 型）的载物台上，利用温度控制装置（林克曼公司制造的 LK600），以 0.1℃/秒的速度反复进行冷却、加热，使冷却载物台内的温度依次为 20℃、-30℃、20℃、-30℃、20℃、-30℃、-10℃，然后，在-10℃保持 30 分钟，数出具有 10.01~35μm^2 的面积的冰晶作为微小冰晶。结果确认出，如图 14 所示，来自整个磷虾的提取粉末 A 在浓度 0.001%上具有峰，来自磷虾壳的提取粉末 B 具有浓度依赖性的再结晶抑制活性。

<从南极磷虾干燥粉末得到的具有抗冻活性的蛋白质的提取·精制>

对南极磷虾干燥粉末 5g，加入 50ml 含有 20mM Tris-HCl（pH7.5）pPMSF 1mM 的提取液，悬浊后，在 90℃提取 30 分钟。然后，对该悬浊液在 10000×g 的条件下进行 30 分钟的离心分离，得到上清液。将其供于用 20 mM Tris-HCl（pH7.5）平衡的 Superdex G30（美国通用电气医疗集团（GE Healthcare）），进行凝胶过滤色谱层析。此时，使用温度控制装置和显微镜，以冰晶的形状变化确认出图 15 所示的色谱的洗脱量 8~10ml（图 15A）和 18~20ml（图 15B）的级分中存在具有抗冻活性的蛋白质。接着，将这些级分供于反相 HPLC 中。即，对于各级分 20μl，用终浓度为 0.1%的三氟醋酸进行调节，供于装填有用 0.1%三氟醋酸平衡的 ODS 色谱柱（Mightysil RP-18 GP，150-4.6mm）的高效液相色谱（JASCO PU-1580，UV-1570，DG-1580-53，HG-1580-32，CO-1565）中供给，通过 0~40%乙腈的浓度梯度，来分离·洗脱蛋白质。其结果示于图 16（洗脱量 8~10ml 级分）、图 17（18~20ml 级分）。如图所示，本蛋白质在 2.41、2.78、4.11、6.36、8.89、10.00、17.73、19.92、23.70、26.84、31.48、41.65 和 2.28、2.93、10.44、28.58、33.1 的保留时间上具有洗脱峰。

上述反相 HPLC 的测定条件如下所述。

色谱柱：Mightysil RP-18 GP，150-4.6mm

洗脱液：

0-10min：0.1%三氟醋酸水溶液

10-60min：0.08%三氟醋酸，80%乙腈

流速：0.8ml/min

柱温度：25℃

实施例 9

<通过添加来自磷虾的提取粉末所产生的防止淀粉凝胶脱水收缩效果>

对通过添加来自磷虾的提取粉末所产生的防止淀粉凝胶脱水收缩效果进行观察。将马铃薯淀粉作为原料，使用 RVA（快速粘度分析仪）制作淀粉凝胶。在-20℃冻结后，在-10℃保存，观察熔融后的脱水收缩的样子，结果确认出，通过添加来自磷虾的提取粉末可以抑制脱水收缩量的上升（图 18）。另外，将冷冻保存 7 天后的淀粉凝胶冻干后，然后用电子显微镜观察结构，结果确认

出，添加了提取粉末的淀粉凝胶与未添加的凝胶相比，取得极细的结构（图19，20）。这被认为是因为，来自磷虾的提取粉末抑制淀粉凝胶的冷冻保存中的冰晶的生长，抑制淀粉凝胶的冷冻保存中的劣化。

实施例 10

<对水产的应用-添加于明太鱼肉末>

从在三陆冲捕获的鲜鱼即明太鱼上取下肉，用 3mm 目的绞碎机制成碎肉。取 500g 碎肉，加入水 50g、砂糖 50g，进一步加入提取粉末 B 使其分别为 0~0.1%，用台式搅拌器搅拌 25 秒钟。将其用作鱼肉末样本。接着，将各样本在-25℃下冻结一晚，然后在-10℃下保存 2 周，将其用于作为保存性评价指标的盐溶解性、TMAO 分解度的测定。

盐溶解性的测定

向鱼肉末 3g 中加入 0.1M KCl 20mM Tris-HCl（pH7.5）溶液 27ml，进行均化（10000rpm × 30 秒钟 3 次），然后，进行 5000rpm × 10 分钟的离心分离，得到沉淀物，进一步向该沉淀物中加入 0.5M KCl 20mM Tris-HCl（pH7.5）溶液 27ml 进行搅拌。再次进行 5000rpm × 10 分钟的离心分离，向得到的沉淀物中加入 0.5M KCl 20mM Tris-HCl(pH7.5)溶液 27ml 进行搅拌，加入 1M ATP30μl 在冰冷藏下保存一晚。然后搅拌，用双缩脲法测定其悬浊溶液的蛋白质浓度和容量。进一步对悬浊溶液进行 7000rpm × 15 分钟的离心分离，用双缩脲法测定得到的上清液的蛋白质浓度，并且也测定容量。通过以上测定，从所述的上清液中的蛋白质量与悬浊液中的蛋白质量之比来算出盐溶解性。结果，如图 21 所示，盐溶解性随着提取粉末 B 的添加量的增加而增加，通过添加提取粉末 B，显示出抑制冷冻保存时的明太鱼肉末的质量劣化的倾向。

TMAO 的分解反应的测定

对鱼肉末样本 10g 加入蒸馏水 10ml、10%三氯醋酸（TCA）10ml，进行均化（12000rpm × 2 分钟）。然后，进行离心分离（7500 × 20 分钟），得到上清液。向沉淀物中加入 5ml 的 5%TCA 溶液充分搅拌，进行离心分离，得到上清液。该操作进行 2 次，将至此得到的上清液加入 50ml 的容量瓶中，进一步用 5%TCA 溶液定容，将其作为 TCA 提取液。

将 TCA 提取液 1ml 和蒸馏水 3ml 进行混合，添加铜-铵试剂 0.4ml、5%二

硫化碳-苯溶液，在40℃下温育5分钟。然后，反复振动，进行离心分离（3500×5分钟），将得到的上清液移入加入了约0.2g无水硫酸钠的试管中，测定该溶液在440nm下的吸光值。生成的DMA量用下式表示。

DMA量（mM）=（440nm测定值）÷1.3×2×50÷1000÷（样本重量）×1000

由TMAO的分解所产生的DMA的生成量，如图22所示，随着提取粉末B的添加而降低。通过添加提取粉末B，生成与TMAO的分解所产生的DMA等量的甲醛。抑制DMA的生成量，意味着抑制甲醛的生成，表示抑制甲醛在冷冻保存时引起的明太鱼肉末的冷冻变性。

实施例11

<对食品的应用>

1. 面条

用表3所示的配方（根据该配方，添加品是在面条中含有0.00036%的本蛋白质试样2）将面条进行混合、混捏、压长后，用塑料制品包裹面条，在室温下熟化1小时。然后，进一步压长、切割，在沸水中煮10分钟。然后，在流水中冷却5分钟，移入笊篱中，沥水5分钟后，在-20℃冻结1晚。然后，移入-10℃冻结保存2周时间。在室温下进行约2小时的自然解冻，对其口感进行评价。另外，作为对照，制作出不含本发明的蛋白质的面条来进行比较。结果，如表3所示，含有本蛋白质试样2的面条与对照相比，面条的表面光滑，并且口感筋道、富有弹力。

表3

冷冻面条的配方	比较品	添加品
面条用小麦粉	500g	500g
食盐	12.5g	12.5g
水	210g	137.7g
实施例2的冷冻干燥品的10%溶液	-	72.3g
面条表面的光滑度	×	○
筋道感	×	○
弹力	△	○

2. 烧饭米

用表4所示的配方（根据该配方，添加品是在烧饭米中含有0.00036%的

本蛋白质试样 2）制成烧饭米，并进行评价。对精白米（Killala 397 H17 年产米）加入 1.35 倍量的水，使用家用烧饭器烧饭。烧好后，继续焖 30 分钟，然后，用 20g×10 个的寿司的压模进行成型。然后，在-20℃下冷冻 3 天后，移入-10℃冷冻保存 5 天。评价是在室温下进行约 2 小时的自然解冻，评价其口感。结果，如表 4 所示，与对照相比，添加品有黏性，味道良好。

表 4

饭的配方	比较品	添加品
米（Killala H17 年米）	300g	300g
水	405g	334.5g
实施例 2 的冷冻干燥品的 10%溶液	-	70.5g
黏性	△	○
表面的光泽	○	○

3. 蒸鸡蛋羹

用表 5 所示的配方（根据该配方，添加品是在蒸鸡蛋羹中含有 0.00033%的本蛋白质试样 2）制成蒸鸡蛋羹，进行评价。混合材料后，向耐热容器中分别加 60g，放进蒸器中来蒸。在室温下成微热状后，在-20℃冷冻 3 天，在-10℃冷冻保管 5 天。评价是在蒸器中蒸 10 分钟，评价口感。

结果，与对照相比，添加品中没有“孔”，口感也爽滑，另外，也没有沫子，味道良好。

表 5

蒸鸡蛋羹的配方	比较品	添加品
鸡蛋	180g	180g
汤汁（颗粒）	3g	3g
食盐	3g	3g
酱油	3g	3g
水	467g	407g
实施例 2 的冷冻干燥品的 10%溶液	-	60g
爽滑度	△	○
孔的状况	×	○

工业上的应用性

本发明的蛋白质在甲壳类的壳中较多地含有，所述甲壳类的壳除了用作膳食、甲壳质、壳聚糖的原料以外，其大半多被废弃，因此可以大量制备，并且能够廉价地生产。另外，因为是来自食品的蛋白质，所以容易应用于对食品的添加。本发明的蛋白质具有抗冻活性、抑制冰晶再结晶的活性，因此，能够广泛应用于冷冻食品等的质量保持等。

序列表自由文字

序列号：1

N末端氨基酸序列

序列号：2

N末端氨基酸序列

序列号：3

N末端氨基酸序列

序列号：4

N末端氨基酸序列

[序列表]

<110> 日本水产公司

<120> 具有抗冻活性的来自甲壳类的蛋白质

<130> YCT-1258

<141> 2007-03-13

<150> JP 2006-67758

<151> 2006-03-13

<160> 4

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 南极磷虾（Euphausiacea sp.）

<400> KYGGEFPARPDNIXFENVDG（单字母符号）

Lys Tyr Gly Gly Glu Phe Pro Ala Arg Pro Asp Asn Ile Xaa Phe Glu Asn Val Asp Gly（三字母符号）

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> 南极磷虾（Euphausiacea sp.）

<400> TTYKYGGEFPARPDNXXFE（单字母符号）

Thr Thr Tyr Lys Tyr Gly Gly Glu Phe Pro Ala Arg Pro Asp Asn Xaa Xaa Phe Glu（三字母符号）

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> 南极磷虾（Euphausiacea sp.）

<400> DYDVAHEQQDVNAFLTKITG（单字母符号）

Asp Tyr Asp Val Ala His Glu Gln Gln Asp Val Asn Ala Phe Leu Thr Lys Ile Thr Gly（三字母符号）

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> 南极磷虾（Euphausiacea sp.）

<400> SDPKFQQDINTRLXNVYE（单字母符号）

Ser Asp Pro Lys Phe Gln Gln Asp Ile Asn Thr Arg Leu Xaa Asn Val Tyr Glu（三字母符号）

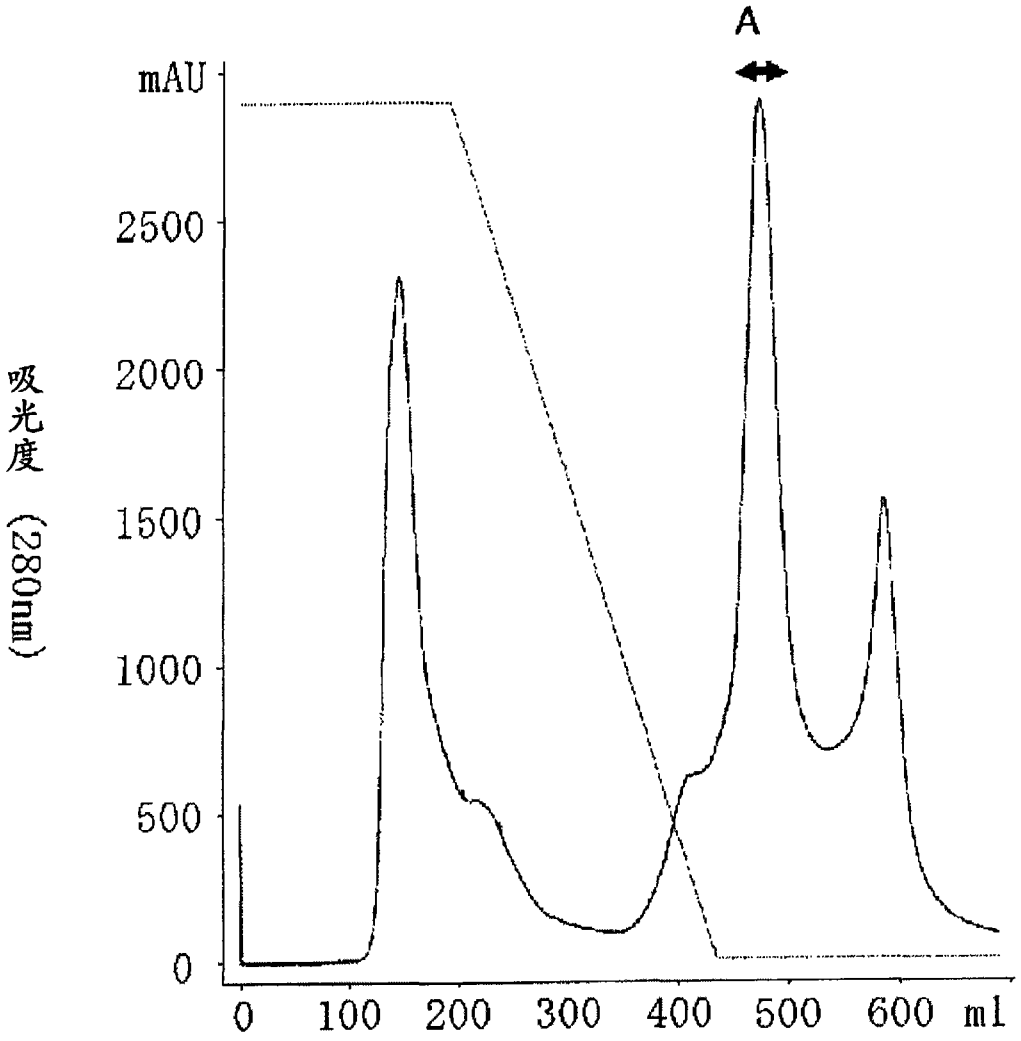

A
mAU
2500
2000
1500
1000
500
0
吸光度 (280nm)
0
100
200
300
400
500
600
ml

图 1

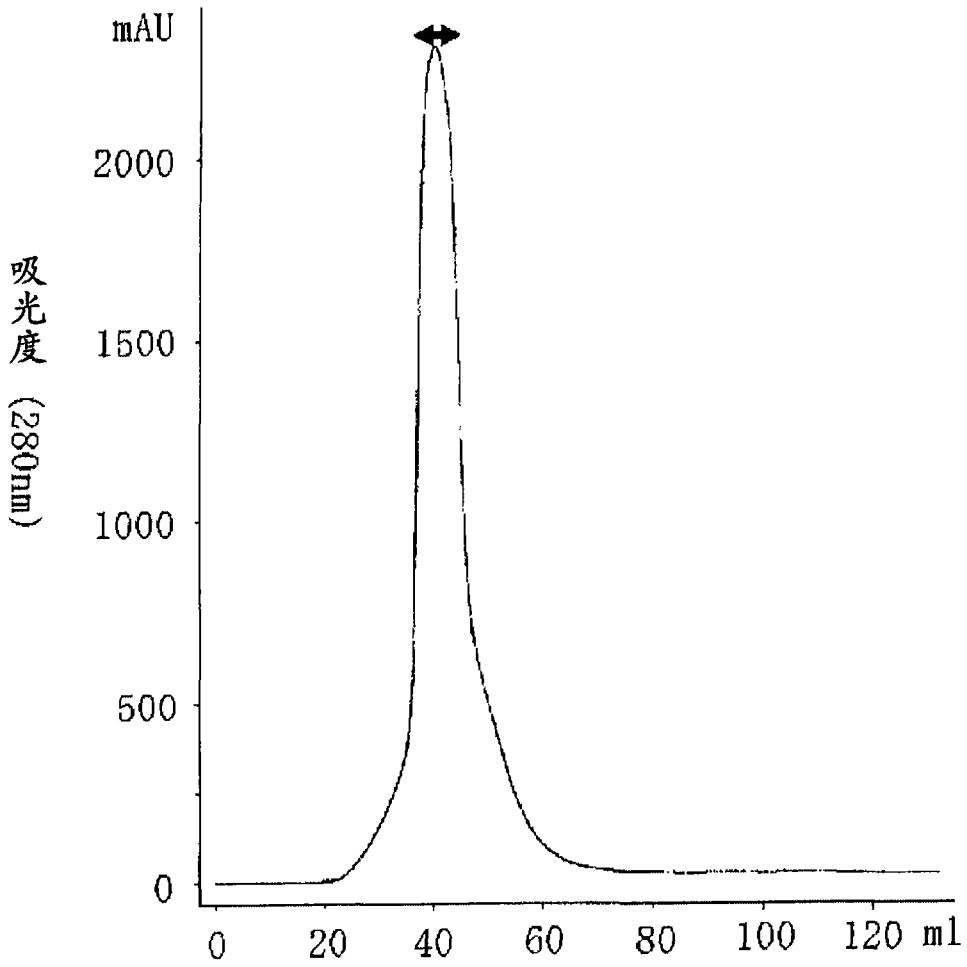


图 2

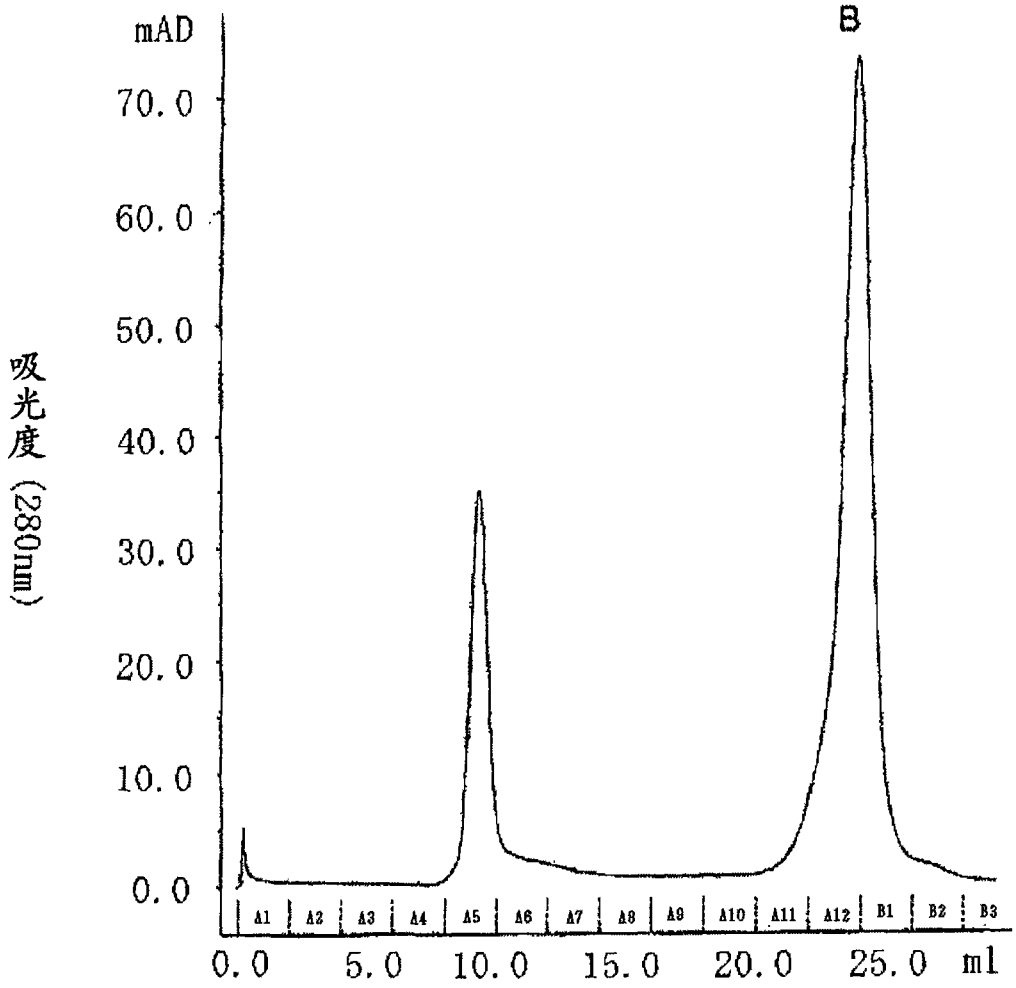

mAD
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
吸光度(280nm)
B
A1
A2
A3
A4
A5
A6
A7
A8
A9
A10
A11
A12
B1
B2
B3
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
ml

图 3

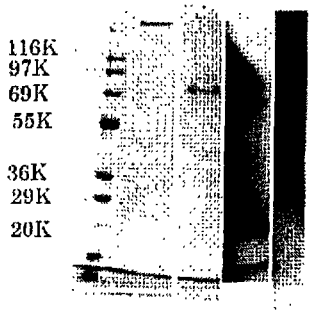

116K
97K
69K
55K
36K
29K
20K

图 4

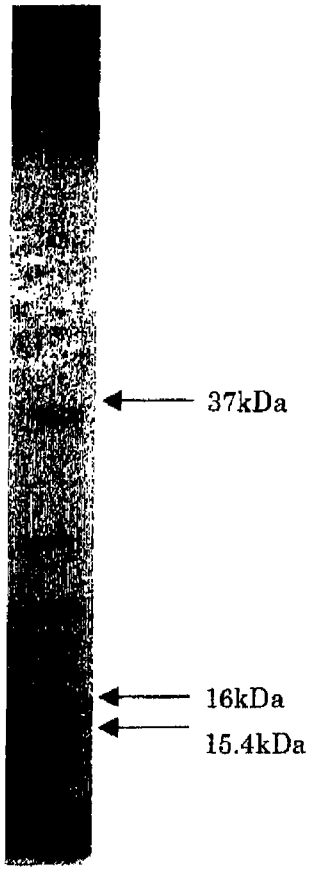

37kDa
16kDa
15.4kDa

图 5

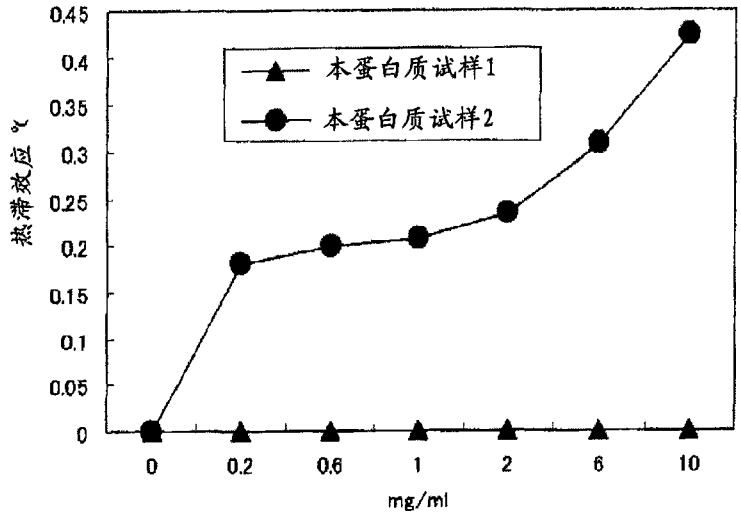

0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
本蛋白质试样1
本蛋白质试样2
0
0.2
0.6
1
2
6
10
mg/ml

图 6



图 7

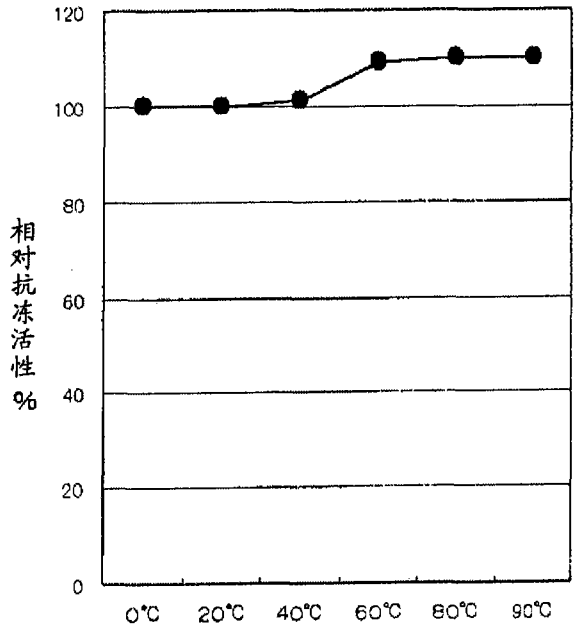

120
100
80
60
40
20
0
相对抗冻活性%
0℃
20℃
40℃
60℃
80℃
90℃

图 8

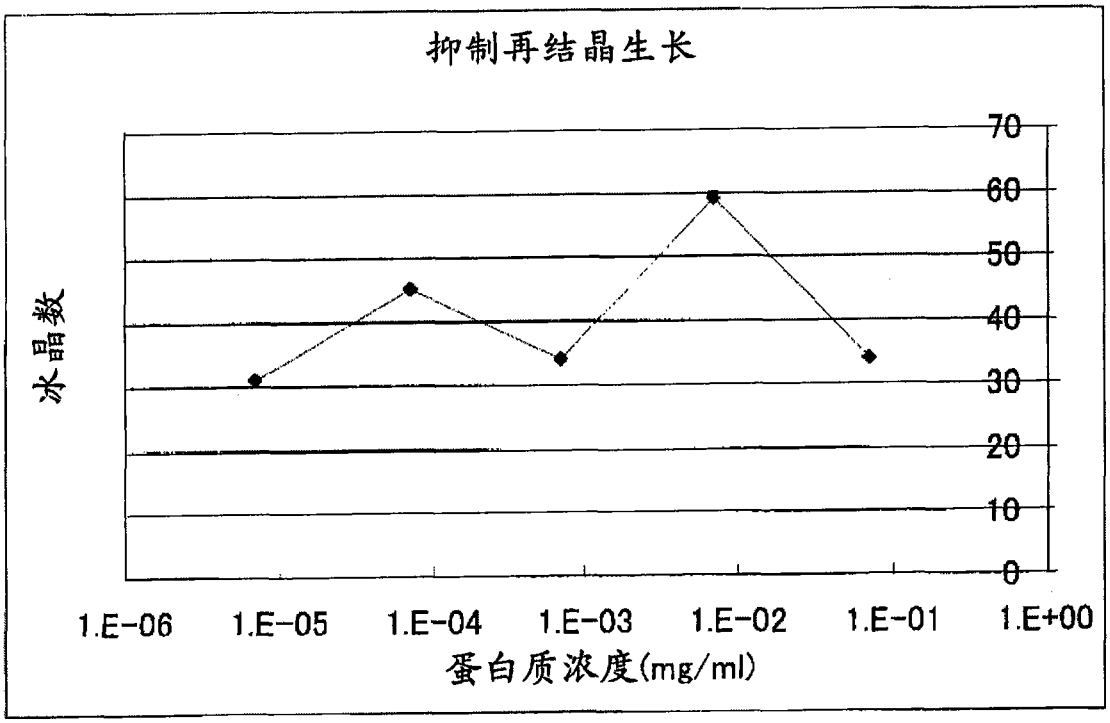

抑制再结晶生长
70
60
50
40
30
20
10
0
冰晶数
1.E-06
1.E-05
1.E-04
1.E-03
1.E-02
1.E-01
1.E+00
蛋白质浓度(mg/ml)

图 9

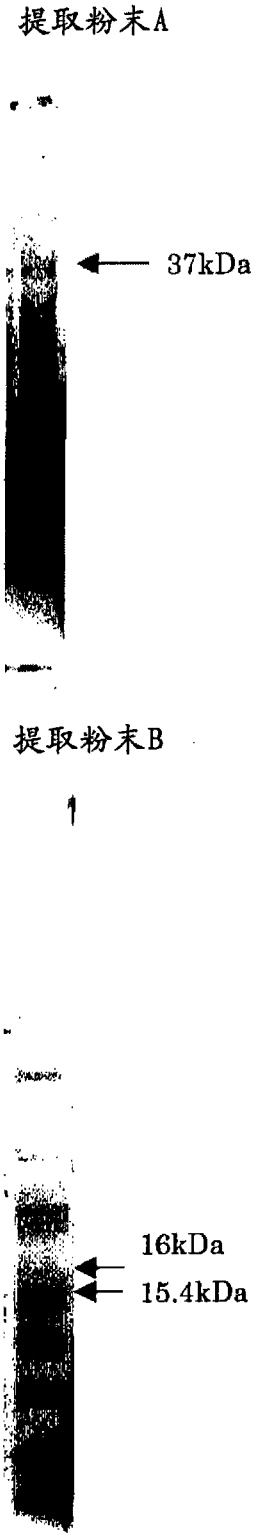


图 10

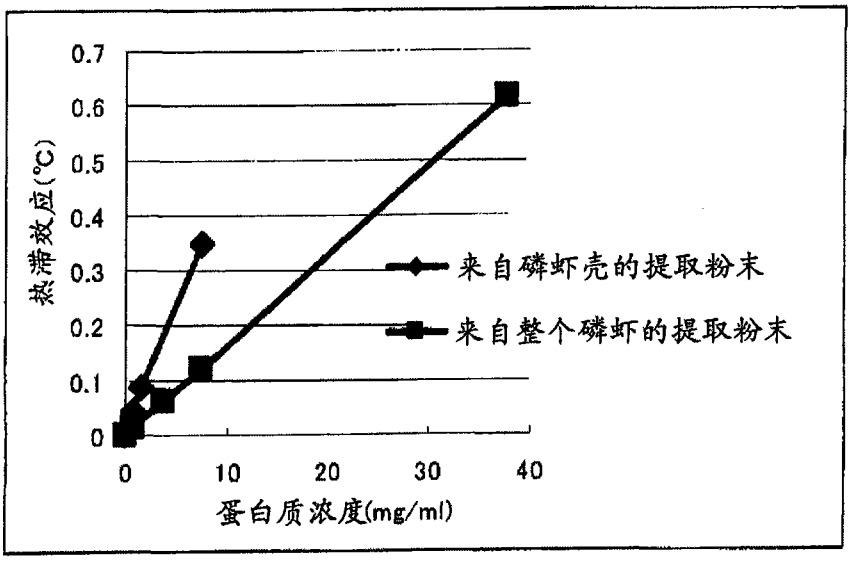


图 11

来自整个磷虾的提取粉末

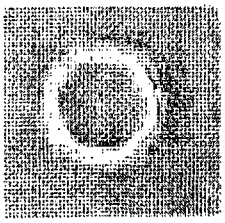


图 12

来自磷虾壳的提取粉末

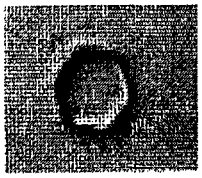


图 13

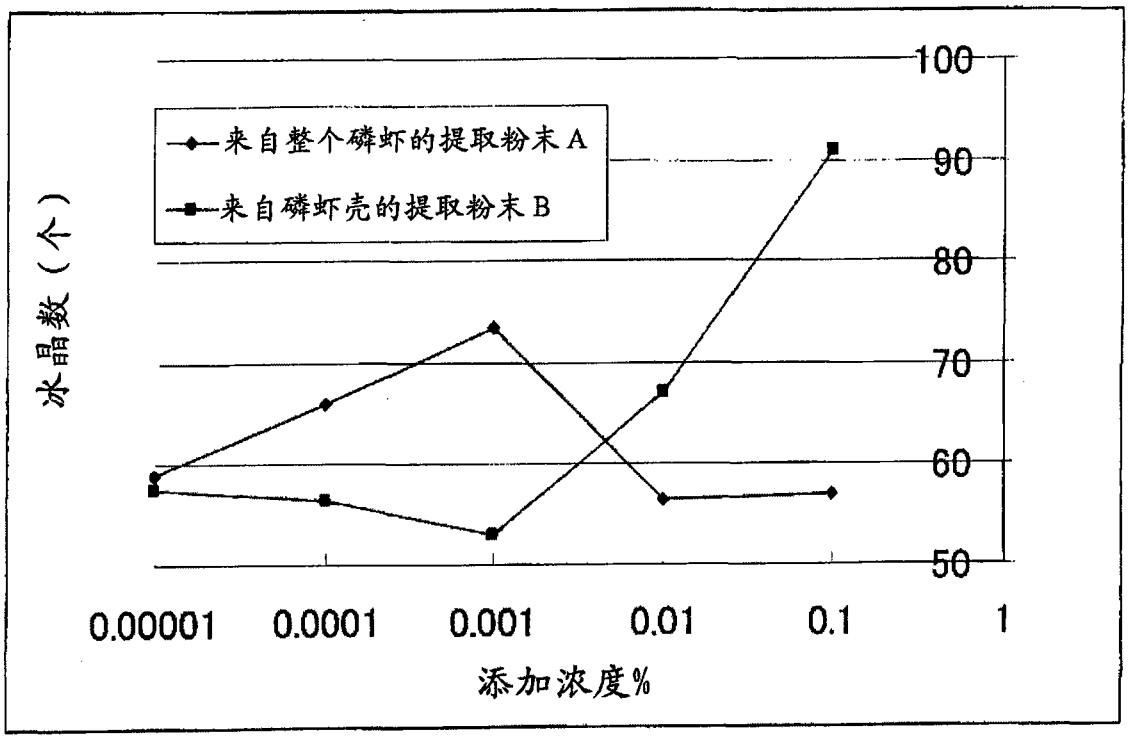

来自整个磷虾的提取粉末A
来自磷虾壳的提取粉末B
冰晶数（个）
100
90
80
70
60
50
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
添加浓度%

图 14

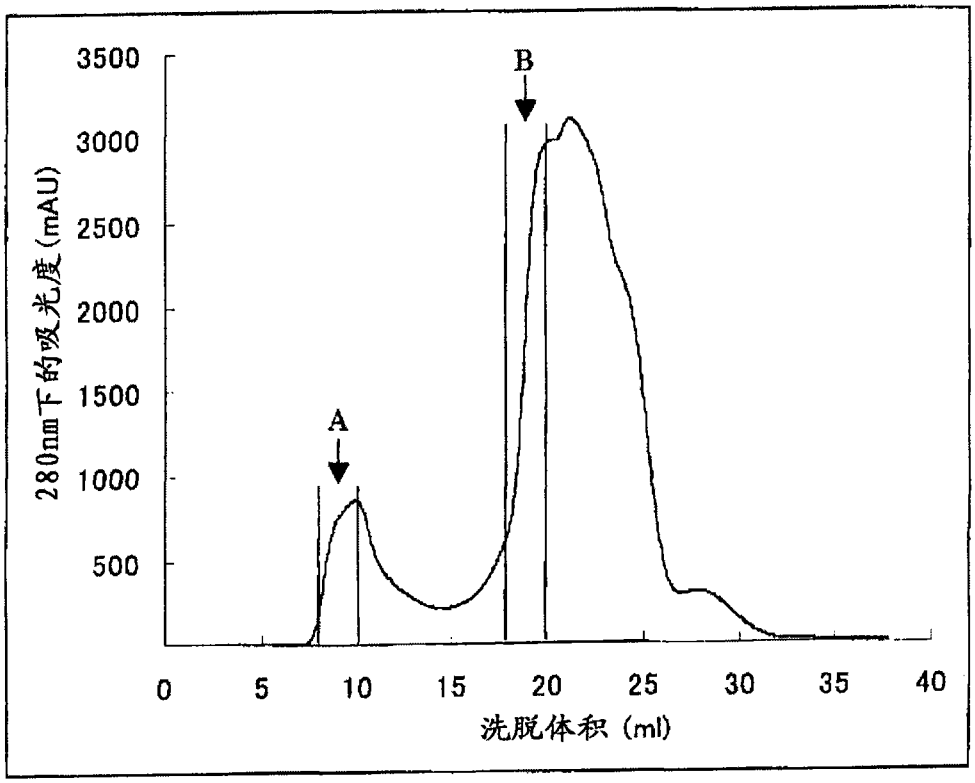

3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
280nm下的吸光度(mAU)
A
B
0
5
10
15
20
25
30
35
40
洗脱体积 (ml)

图 15

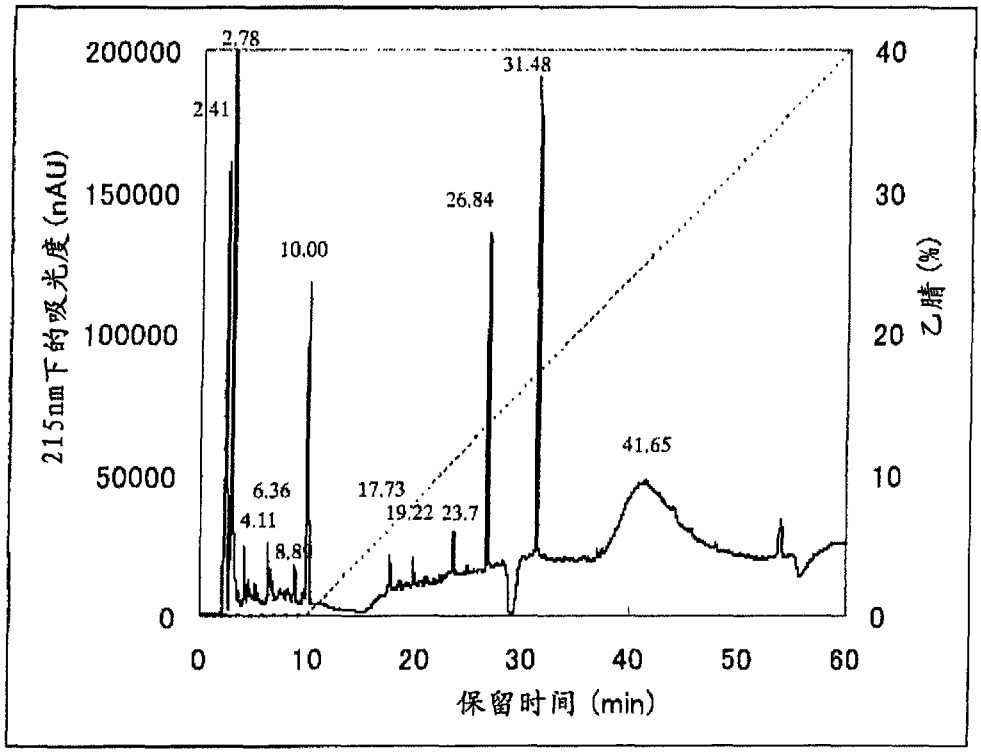

200000
150000
100000
50000
0
215nm下的吸光度 (nAU)
40
30
20
10
0
乙腈 (%)
0
10
20
30
40
50
60
保留时间 (min)
2.78
2.41
31.48
26.84
10.00
41.65
6.36
4.11
8.80
17.73
19.22
23.7

图 16

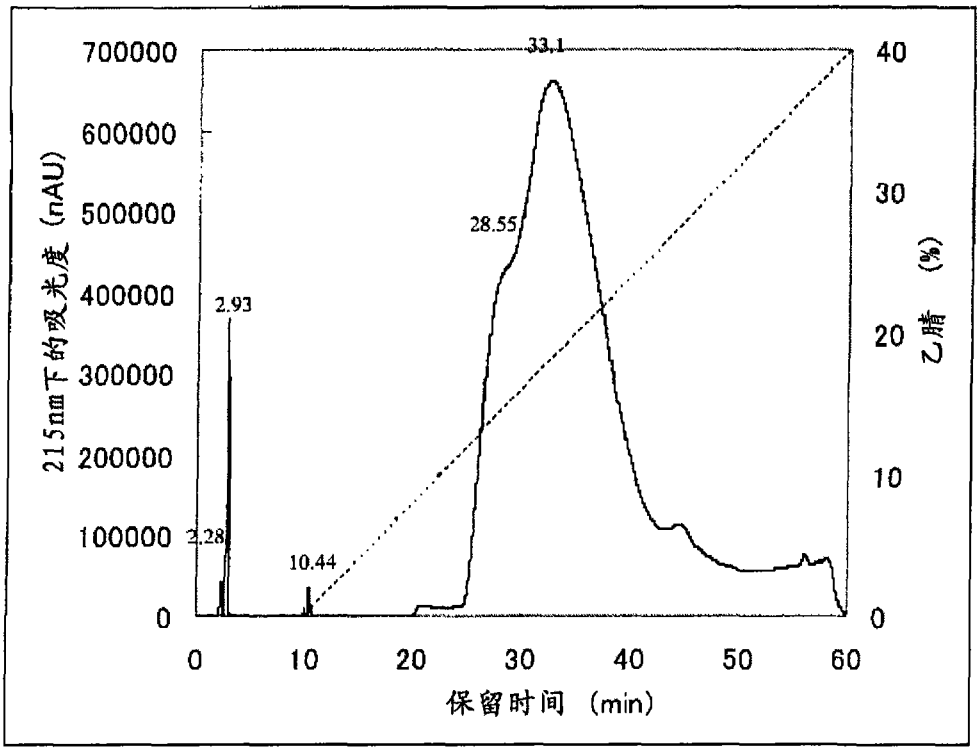

700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
215nm下的吸光度 (nAU)
40
30
20
10
0
乙腈 (%)
0
10
20
30
40
50
60
保留时间 (min)
33.1
28.55
2.93
2.28
10.44

图 17

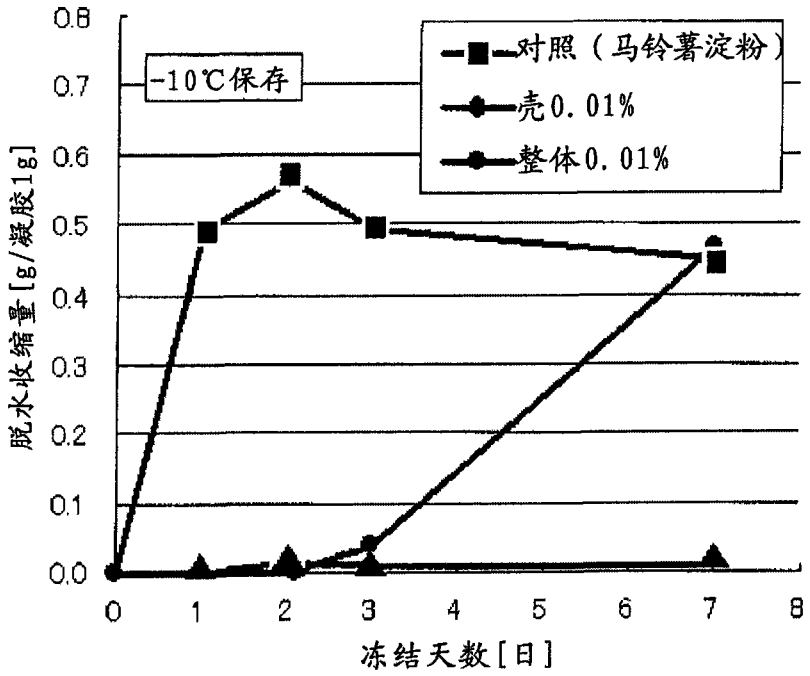


图 18

无添加



图 19

整体的提取粉末

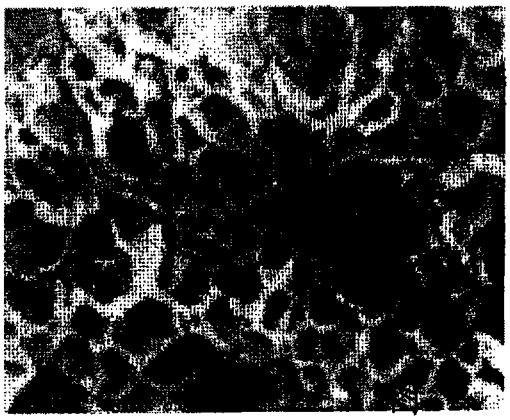


图 20

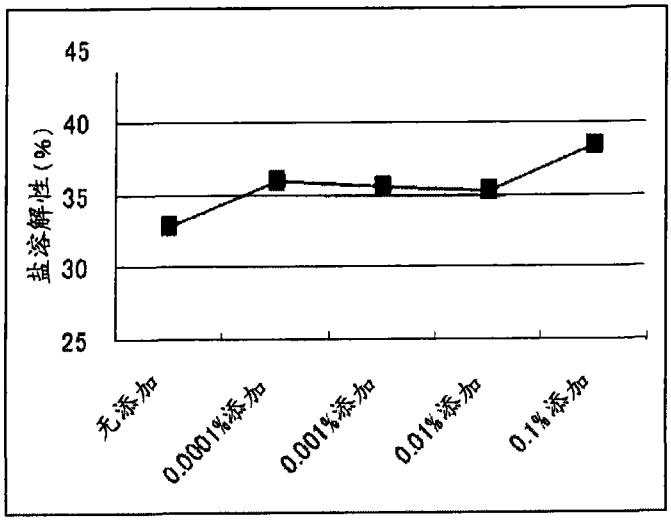

45
40
35
30
25
盐溶解性(%)
无添加
0.0001%添加
0.001%添加
0.01%添加
0.1%添加

图 21

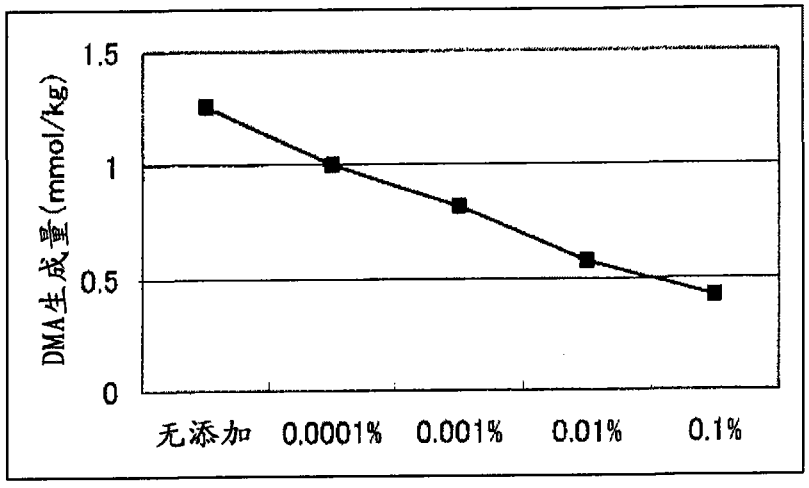

1.5
1
0.5
0
DMA生成量(mmol/kg)
无添加
0.0001%
0.001%
0.01%
0.1%

图 22