

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4175520号

(P4175520)

(45) 発行日 平成20年11月5日 (2008. 11. 5)

(24) 登録日 平成20年8月29日 (2008. 8. 29)

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

A 2 3 G 9/02

請求項の数 10 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願平10-508420	(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2000-515754 (P2000-515754A)		
(43) 公表日	平成12年11月28日 (2000. 11. 28)	(74) 代理人	弁理士 志賀 正武
(86) 国際出願番号	PCT/EP1997/003637		
(87) 国際公開番号	W01998/004148	(74) 代理人	弁理士 岡田 希子
(87) 国際公開日	平成10年2月5日 (1998. 2. 5)	(72) 発明者	バイアス、ルイズ・ジェーン
審査請求日	平成16年6月29日 (2004. 6. 29)		英国、ヘスリントン、ヨーク・ワイオー1 ・5ワイダブリュ、ザ・プラント・ラボラ トリー、デパートメント・オブ・バイオロ ジー、ザ・ユニバーシティ・オブ・ヨーク (番地なし)
(31) 優先権主張番号	96305497.8		最終頁に続く
(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	96305499.4		
(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)		

(54) 【発明の名称】 冷凍菓子製品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 以上の植物由来抗凍結ポリペプチドを含む冷凍菓子製品において、水性組成物中の前記抗凍結ポリペプチドが、 -40°C 以下への急速凍結および続いての -6°C で1時間の貯蔵の後に、 $15\text{ }\mu\text{m}$ 未満の氷晶サイズ数平均を有し、
 前記抗凍結ポリペプチドが、*Polystichum mohriodes*, *Ranunculus biternatus*, *Nothofagus antarctica*, *Cerastium fontanum*, *Colobanthus quitensis*, *Rumex acetosella*, *Salix fragilis*, *Calluna vulgaris*, *Aceana magellanica*, *Pisum sativum*, *Acer saccharoides*, *Oxalis*, *Geranium*, *Daucus carota* (ニンジン), *Vinca minor* (ツルニチニチソウ), *Vinca major*, *Polemonium*, *Buddleia*, *Forsythia*, *Sambucus nigra*, *Juncus squarrosus*, *Carex aquatilis*, *Agrostis tenuis*, *Deschampsia antarctica*, *Festuca contracta*, *Festuca rubra*, *Parodiochloa flabellata*, *Phleum alpinum*, *Poa annua* (スピアグラス), *Poa pratensis* (ケンタッキー・ブルー・グラス), *Rostkovia magellanica*, *Bambosoidae*, *Chorisodontium aciphyllum*, *Drepanocladus uncinatus*, *Isothenicium myosurides*, *Polytrichum alpestre*, *Alectoria nigricans*, *Caloplaca regalis*, *Himantormia lugubris*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia subrudecta*, *Ramalina farinaceae*, *Stereocaulon glabrum*, *Umbilicaria antarctica*, *Usnea subfloridana*, *Poa trivialis*, *Lolium perenne*, *Holcus lanatus*, *Bromus sterilis*, および *Festuca contracta* に由来するものであることを特徴とする冷凍菓子製品。

【請求項 2】

前記抗凍結ポリペプチドが、Lichen科に由来する、請求項1記載の冷凍菓子製品。

【請求項3】

前記抗凍結ポリペプチドが、Alectoria nigricans, Caloplaca regalis, Himantormia lugubris, Hypogymnia physodes, Parmelia subrudecta, Ramalina farinaceae, Stereocaulon glabrum, Umbilicaria antartica, またはUsnea subfloridanaに由来する、請求項2記載の冷凍菓子製品。

【請求項4】

前記抗凍結ポリペプチドが、Juncus squarrosusまたはGeraniumに由来する、請求項1記載の冷凍菓子製品。

【請求項5】

前記抗凍結ポリペプチドが、少なくとも30秒間、60℃を超える温度で熱処理した後に、氷晶の成長を制限するその能力を維持している、請求項1記載の冷凍菓子製品。

【請求項6】

前記抗凍結ポリペプチドが、1分を超える時間、60℃を超える温度で熱処理した後に、氷晶の成長を制限するその能力を維持している、請求項1記載の冷凍菓子製品。

【請求項7】

前記抗凍結ポリペプチドが、Acer saccharoides, Bamboo, Buddleia, Isothecium myosuroides, Ramalina farinaceae, Usnea subfloridana, Forsythia, Oxalis, Poa trivialis, Lolium perenne, Holcus lanatus, Bromus sterilis, Parodiochloa flabellate, Descampsia antartica, Carex aquatilis, Colobanthus quintensisおよびAgrostis tenuis, Festuca contracta, Poa annuaに由来する、請求項5記載の冷凍菓子製品。

【請求項8】

前記抗凍結ポリペプチドが、非毒性植物に由来する、請求項1記載の冷凍菓子製品。

【請求項9】

製品が、ウィンターライ由来の抗凍結ポリペプチドを含まない、請求項1記載の冷凍菓子製品。

【請求項10】

アイスクリーム、フローズンヨーグルト、アイスウォーター、及びアイスマルクから選択される、請求項1記載の冷凍菓子製品。

【発明の詳細な説明】

発明の属する技術分野

本発明は、A F P（抗凍結タンパク）を含有する冷凍食品に関する。

発明の背景

抗凍結タンパクは、文献に記載されてきた。例えば、Marilyn Griffith and K. Vanya Ewart, Biotechnology Advances, Vol. 13, No. 3, 375-402(1995)を参照されたい。抗凍結タンパクは、一般に以下の特性の1つまたはそれ以上を有する：熱ヒステリシス（thermal hysteresis）、氷再結晶化の阻害、氷晶（氷結晶）形の制御および氷核形成剤（ice nucleators）との相互作用。

熱ヒステリシスは、A F Pの最もよく知られた特性であり、この特性は、通常、A F Pの存在について試験するために用いられる。熱ヒステリシスは、融解温度に影響せずに熱ヒステリシス活性A F Pを含有する溶液の見かけの凍結温度を低下させることによりもたらされる。熱ヒステリシス試験によるA F P源の同定は、文献に広く記載されている。例えば、John G. Duman, Cryobiology 30, 322-328(1993)を参照されたい。

氷再結晶化の阻害は、A F Pの別の特性である。この活性は、氷晶成長抑制とも呼ばれている。この特性は、A F Pの存在下およびA F Pの不存在下で、ある時点での結晶の氷晶サイズを比較することにより試験することができる。魚A F Pの試験におけるこの方法の適用は、米国特許第5, 118, 792号（DNA Plant Technology Corporation）に記載されている。

A F Pの第三の特性は、氷晶の形に影響するその能力である。この特性は、氷晶のある面に対するA F Pの選択的結合から由来し、それをもってある方向への結晶成長を制限する

10

20

30

40

50

。こうして、六方晶系の両錐体は、A F Pの存在の指標と考えられる。この方法は、例えばWO 9 2 / 2 2 5 8 1 (University of Waterloo) において細胞外ウィンターライ (winter rye) A F Pの活性を試験するために記載されている。

A F Pの第四の特性は、氷核形成物質の活性を阻害するその能力である。A F Pと氷核形成剤とのこの相互作用は、例えば増大した熱ヒステリシスによりもたらされうる。この特性は、例えばWO 9 6 / 4 0 9 7 3 (University of Notre dame du Lac) において試験されている。

A F Pは、製品の凍結寛容性を改良することについて示唆されてきた。この文脈において多くの適用が示唆されてきた。

例えば、A F Pは、生物学的物質の低温保存を強化することについて示唆された (WO 9 1 / 1 2 7 1 8, Agouron Pharmaceuticals ; WO 9 1 / 1 0 3 6 1, The Regents of the University of California) 。また、A F Pは、例えば化粧品または医薬における、リポソームからの漏れを防止するために示唆された (WO 9 6 / 2 0 6 9 5を参照されたい) 。更に可能な適用は、A F Pを植物中に含ませることにより (または植物中でトランスジェニック技術で産生させることにより) 植物の凍結寛容性を増大させることである (J. Cell Biochem. Suppl. vol. 14e, 1990, p.303 XP002030248, Lee et al., アブストラクト R 2 2 8を参照されたい) 。また、魚A F Pは、食品、例えばフローゼンヨーグルトまたはアイスクリームにおける用途のために示唆された (米国特許第 5, 6 2 0, 7 3 2 号、Pillsbury ; およびWO 9 6 / 1 1 5 8 6, HSC Research and Development limited partnership) 。

しかし、現在まで、A F Pの用途は、商業的規模では適用されていなかった。本出願人は、商業的使用がない理由の1つは、多くのA F Pが記載されてきたが、実践において実際の商業製品における使用は深刻な問題に直面することであると考えている。

本出願人は、これらの問題の重要な理由の1つは、文献に記載されてきた非常に多数のA F Pのうち、各適用について限られたセットのA F Pしか好適に適用できないことを見出した。また、本出願人は、好適なA F Pのこの選択は、所望の適用および/または達成すべき製品の性質に依存することを見出した。

A F Pの特に望ましい源は、植物性物質である。植物性物質は、適度に容易に比較的大量を入手でき、A F P含有濃縮物を得るために比較的簡便な単離手順を用いることができる。更に、植物性物質からのA F Pの使用は、例えば魚A F Pよりも天然野菜供給源を好む傾向がある消費者により、好まれると信じられている。

Marilyn GriffithおよびK. Vanya Ewartは、Biotechnology Advances, Vol. 13, No. 3, 375-402(1995)において、抗凍結活性が見出された27種の高等植物種のリストを挙げている。この論文はまた、A F Pについて広い範囲の可能な適用をも示唆する。

本出願人は、植物A F Pの使用についての特定の適用を選択する場合、その適用において有利に適用することができる限られたセットのA F Pを選択するための特定の試験が必要となることを見出した。

したがって、本発明の目的は、冷凍菓子製品において有利に使用することができる植物A F Pを提供することである。

驚くべきことに、本出願人は、非常に多数の植物がA F Pを含有するという事実にもかかわらず、ほんの限られたセットの植物しか、冷凍菓子製品に優れたテクスチャーを与えることができるA F Pを含有しないことを見出した。驚くべきことに、比較的簡便な試験方法を用いて好適なA F Pを選択することができることを見出された。

したがって、第一の側面においては、本発明は、植物由来の1またはそれ以上のA F Pを含む冷凍菓子製品であって、水中の前記A F Pは、-40℃への急速凍結およびその後の-6℃で1時間の貯蔵 (以下に記載するように測定する) の後、15 μm未満の氷晶サイズを有することを特徴とする冷凍菓子製品に関する。

発明の背景

A F Pは潜在的にアイスクリームのような冷凍菓子製品のテクスチャー特性に好ましい影響を与えるために用いることができる可能性があることは、多数の文献に示唆されていた

10

20

30

40

50

。しかし、これらの文献のほとんどは、いかにしてこれらの好ましい特性を実際に実践において達成することができるかの教示を提供していない。

別のセットの文献は、魚AFPの用途を記載している。

WO 96/11586は、冷凍発酵食品における魚抗凍結ポリペプチドの適用を教示する。この文献は、これらの製品における植物由来の特定のAFPの用途を教示していない。

WO 96/39878は、アイスクリームにおけるAFPの適用を記載している。この適用のための好適なAFPは、南極の魚、北極の (artic) 魚、蠕虫および昆虫の血液および筋肉組織に由来していてもよい。ここでもまた、植物AFPを用いることができるという教示はまったく与えられていない。

米国特許第5, 118, 792号は、実施例3Bにおいて、ポップシクル (popsicle) 混合物中での精製A-Saf5融合タンパクによる再結晶化の阻害を記載している。この文献もまた、植物由来のAFPの用途を教示していない。

WO 92/22581は、ウィンターライの細胞外腔由来の複数のポリペプチドを記載している。これらのポリペプチドのいくつかの可能な適用は一般的に記載されており、これらの中にアイスクリームがある。しかし、良質のアイスクリームを得るためにどのポリペプチドを選択するべきかについての教示は与えられていない。本出願人は、ウィンターライの特定のタンパクのみがアイスクリームにおける用途のために好適であることを見出した (実施例を参照されたい)。

本出願人は、現在までそのように列挙されていなかった非常に多数の植物が、有意なレベルのAFPを含有することを見出した。一方、AFP含有植物のすべてが冷凍菓子のテクスチャーに好ましい影響を与えるために正しいタイプのAFPを提供するわけではないことが見出された。本出願人は、そこで、驚くべきことに、一方では優れたAFP特性を提供し、他方ではアイスクリームのテクスチャー特性に好ましい影響を与えることができる植物源の特定の新規な選択を提供することを目的とする。

特に、好適なAFPは、水性組成物中のAFPを含む組成物を採取し、この組成物を急速に-40℃以下に凍結させ、続いて-6℃で1時間貯蔵することにより、選択することができることが見出された。好適なAFPは、これらの条件下で1時間の貯蔵後、15 μm未満、より好ましくは5~14 μm、最も好ましくは8~12 μmの氷晶サイズをもたらす。急速凍結の温度は、有利には-40~-100℃、好ましくは-80℃である。この特性を決定するための好適な試験の詳細な説明は、実施例Iに示す。

一般に、試験は、AFPおよび水を含むあらゆる好適な組成物に適用することができる。一般に、このような試験組成物中のAFPのレベルは、非常に重要というわけではなく、例えば0.0001~0.5重量%、より好ましくは0.0005~0.1重量%、最も好ましくは0.001~0.05重量%、例えば0.01重量%であることができる。水性組成物中の水のレベルは、有利には30重量%以上、例えば50重量%~99.999重量%である。

AFPおよび水を含むあらゆる好適な組成物を用いて試験を実行することができる。望ましい場合、添加剤 (例えばスクロースまたは緩衝剤) が存在していてもよい。しかし、一般に、AFPを精製形態で得る必要はない。実用的な適用のためには、通常、植物性物質の液体抽出物またはジュースを調製し、次いでこの抽出物またはジュースを試験することで充分である。好適な液体組成物を調製する好適な方法は、実施例IIに示す。

通常、好適なAFPについて試験すべき植物は、低温にさらされたものである。例えば、寒冷な気候において生育した植物、例えば南極の (antartic; 極地) 植物を試験することができる。あるいは、冬期、好ましくは12月~3月、より好ましくは1月~2月、最も好ましくは1月 (北半球)、または6月~9月、より好ましくは7月~8月、最も好ましくは7月 (南半球) に植物を収穫することができる。

本出願人は、多数の植物を上記の試験に付した。その結果を実施例IIIおよびIVに示す。

AFPの好ましい供給源は、*Polystichum mohriodes*, *Ranunculus bitermatus*, *Nothofagus antartica*, *Cerastium fontanum*, *Colobanthus quitensis*, *Rumex acetosella*, *Salix fragilis*, *Calluna vulgaris*, *Aceana magellanica*, *Pisum sativum*, *Acer saccheraroi*

10

20

30

40

50

des, Oxalis, Geranium, Daucus carota (ニンジン), Vinca minor (ツルニチニチソウ), Vinca major, Polemonium, Buddleia, Forsythia, Sambucus nigra, Juncus squarrosus, Carex aquatilis, Agrostis tenuis, Deschampsia antarctica, Festuca contracta, Festuca rubra, Parodiochloa flabellata, Phleum alpinum, Poa annua (スピアグラス), Poa pratensis (ケンタッキー・ブルー・グラス), Rostkovia magellanica, Bambusoideae, Chorisoedontium aciphyllum, Drepanocladus uncinatus, Isoetes myosurioides, Polytrichum alpestre, Aleetoria nigricans, Caloplaca regalis, Himantormia lugubris, Hypogymnia physodes, Parmelia subrudecta, Ramalina farinacea, Stereocaulon glabrum, Umbilicaria antarctica, Usnea subfloridana, Poa trivialis, Lolium perenne, Holcus lanatus, Bromus sterilis, および Festuca contracta から由来する。

本出願人は、本発明の説明において与えられる指針に基づいて、当業者は植物から好適に由来しうる更なる A F P を選択することができると考える。これらの A F P の使用もまた、本発明の範囲内に包含される。

食品における適用のために特に有用な 1 つの態様は、上述の結晶サイズ試験を満足し、非毒性または低毒性植物に由来する、植物 A F P である。この点において、好ましいものは、ニンジン類、草、竹等に由来する A F P である。

上述の供給源からの別の好ましい選択は、Lichen 科、特に Aleetoria nigricans, Caloplaca regalis, Himantormia lugubris, Hypogymnia physodes, Parmelia subrudecta, Ramalina farinacea, Stereocaulon glabrum, Umbilicaria antarctica, Usnea subfloridana から由来する A F P である。これらの A F P は、冷凍菓子製品において特に良好な特性を示す。

特に良好な活性を示す他の A F P は、Juncus squarrosus または Geranium から由来するものである。

いくつかの適用については、60℃を超える温度での熱処理の後、最も好ましくは、少なくとも 30 秒、更に好ましくは 1 分を超え、10 分または 1 時間を超える時間、80～105℃での熱処理の後であっても、(上述の試験により明らかにされる) 氷晶成長を制限するその能力を維持する A F P が選択される。熱安定性である好適な植物供給源は、例えば Acer saccharoides, Bamboo, Buddleia, Isoetes myosurioides, Ramalina farinacea, Usnea subfloridana, Forsythia, Oxalis, Poa trivialis, Lolium perenne, Holcus lanatus, Bromus sterilis, Parodiochloa flabellata, Deschampsia antarctica, Carex aquatilis, Colobanthus quintensis および Agrostis tenuis, Festuca contracta, Poa annua である。

上述した植物に加えて、本出願人は、Secale cereale (ウィンターライ) からの A F P を試験した。いくつかのウィンターライ A F P は WO 92/22581 に記載されている。驚くべきことに、本出願人は、ウィンターライから由来する 32 kDa タンパクは上述の結晶サイズ試験を満足するが、ウィンターライから由来する他のタンパクはその試験を満足しないことを見出した(実施例 IX を参照されたい)。したがって、本発明の目的のためには、ウィンターライ由来の A F P を用いる場合には、好ましくは 32 kDa タンパクを適用する。

本発明の別の好ましい態様は、上述の試験を満足し、ウィンターライに由来しない、植物 A F P の冷凍菓子製品における用途に関する。

発明の詳細な説明

本発明にしたがった冷凍製品は、植物供給源から由来することができる少なくとも 1 つの A F P を含む。

A F P は、あらゆる好適な方法、例えば上述の文献に記載された単離方法によって、植物供給源から得ることができる。あるいは、A F P は、植物から抽出することができ、これは、例えば植物(または植物の部分)から植物抽出物を調製し、場合により続いて濃縮工程を行うことによって行うことができる。上記の抽出物を得る好適な方法の例は、実施例において示す。

また、微生物または植物を、A F P を発現するように遺伝的に改変してもよく、その A F

10

20

30

40

50

Pを本発明にしたがって用いてもよい。

遺伝子操作技術を用いて、天然にA F Pを含有する植物源から直接得られたA F Pに対して少なくとも80%、より好ましくは95%を超える、最も好ましくは100%のホモロジーを有するA F Pを産生させてもよい。本発明の目的のためには、この高レベルのホモロジーを有するこれらのA F Pもまた、「植物由来のA F P」という用語の範囲に含まれる。本発明の目的のためには、「植物由来のA F P」という用語は、好ましくは、非植物性供給源（例えば魚）に天然に存在し、植物によりトランスジェニック経路で産生されるA F Pを含まない。

遺伝子操作技術は、以下のようにして用いてもよい。すなわち、適切な宿主細胞または生物を、所望のポリペプチドについてのコード領域を含有する遺伝子構築物で形質転換する。

10

ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、好適な発現ベクター中に挿入することができる。上記ベクターは、転写および翻訳に必要な要素を、それらが適切な条件下で発現されるような方式（例えば正しいリーディングフレームの適性な向きで、かつ適切なターゲティングおよび発現配列を備えて）でコードする。

これらの発現ベクターを構築するために必要な方法は、当業者には周知である。

ポリペプチドコード配列を発現させるために、多数の発現系を用いることができる。これらとしては、適切な発現ベクターで形質転換された、細菌、酵母、昆虫細胞系、植物細胞培養系および植物が挙げられるが、これらに限られない。

上述の供給源から得ることができるA F Pは、あらゆる好適な冷凍菓子製品において用いることができる。本発明の目的のためには、「冷凍菓子製品」という用語は、ミルク含有冷凍菓子、例えばアイスクリーム、フローズンヨーグルト、シャーベット、ソルベ、アイスミルクおよびフローズンカスタード、ウォーターアイス、グラニタおよびフローズンフルーツピューレが含まれる。いくつかの目的のためには、発酵冷凍食品における使用は、好ましさが劣る。

20

好ましくは、冷凍菓子製品中のA F Pのレベルは、最終製品ベースで0.0001~0.5重量%、より好ましくは0.0005~0.3重量%、最も好ましくは0.001~0.2重量%である。

好ましくは、冷凍菓子中の固体（例えば糖、脂肪、香料等）のレベルは、2重量%を超え、より好ましくは4~70重量%である。

30

望ましい場合、本発明の冷凍菓子製品は、例えば50~500%の超過量まで、空気を含ませてもよい。

本発明の冷凍菓子製品を調製する方法は、調製のためのあらゆる好適な方法から選択することができる。A F Pは、一般に調製の種々の段階で添加することができ、例えばこれを成分の最初のプレミックスに添加したり、または後に調製プロセスの後の段階で添加することができる。いくつかの適用については、製造プロセスの比較的遅い段階で、例えば製品の（部分的）予備凍結の後に、A F Pを添加することが好ましい。

冷凍菓子製品のための凍結プロセスは、あらゆる好適な凍結プロセスから選択することができ、場合によっては、例えば50~300%の超過量への、含気（エアレーション）工程を含んでいてもよい。いくつかの目的のためには、凍結工程は、例えば-30 F（Fahrenheit）以下の温度での、寒冷硬化工程を含むことが有利である。

40

いくつかの適用のためには、冷凍菓子製品に2以上の異なるA F Pの混合物を含ませることが有利である可能性がある。これについての1つの理由は、例えば、用いるべきA F Pの植物供給源が1を超えるA F Pを含有し、例えば用いるべき植物抽出物中にそれらが両方存在するために、これらを添加することが好都合であることであり得る。あるいは、異なる供給源からの1を超えるA F Pを添加することがしばしば望ましい可能性がある。

本発明を、以下の実施例により更に説明する。

実施例 I

急速冷却およびその後の-6℃で1時間の貯蔵後の氷晶粒子サイズの決定のための試験好ましい方法は以下のとおりである。

50

I a :

抗凍結活性を、「スプラットアッセイ (splat assay)」(Knight et al., 1988) の変法を用いて測定した。30 % (W/W) スクロース中の 2.5 μ l の試験対象溶液を、適切にラベルした清浄な 16 mm 円形カバースリップ上に移した。第二のカバースリップを溶液の液滴の上に置き、このサンドイッチを指の間で圧迫した。このサンドイッチをドライアイスの箱の中で -80°C に保ったヘキサン浴中に入れた。すべてのサンドイッチの調製が完了したとき、サンドイッチを、ドライアイスで予め冷却したピンセットを用いて -80°C のヘキサン浴から -6°C に保ったヘキサン含有観察室 (viewing chamber) に移した。 -6°C に移した際、サンドイッチは、透明から濁った外観に変化するのが見られた。画像をビデオカメラで記録し、20 倍の対物レンズを用いて画像解析システム (LUCIA、Nikon) にかけた。各スプラットの画像を、時間 (t) = 0 および 60 分後に記録した。あるいは、(好ましさは劣るが) この特性は以下のようにして測定することができる。

I b :

水を含む A F P 含有製品の試料を、30 重量%のスクロースレベルに調整する (試料の出発レベルが 30 % を超える場合、これは希釈によって行い、出発レベルがこれより低い場合、スクロースを 30 % レベルまで添加した)。

試料の 3 μ l の液滴を 22 mm のカバースリップ上に置いた。次に、直径 16 mm のカバースリップをその上に置き、試料の上に 200 g の重りを置いてスライドの厚さを確実に均一にした。カバースリップの端部は、透明のマニキュアでシールした。

スライドを Linkham THM 600 温度制御顕微鏡のステージに置いた。このステージを、急速に (1 分あたり 50°C) -40°C まで冷却して、小さい結晶の大集団を生成させた。次に、ステージの温度を急速に (1 分あたり 50°C) -6°C まで上昇させ、この温度に維持した。

氷相は、Leica Aristoplan 顕微鏡を用いて -6°C で観察した。λ プレートとともに偏光条件を用いて氷晶のコントラストを増強した。氷相の状態 (氷晶のサイズ) は、 $T = 0$ および $T = 1$ 時間で 35 mm 顕微鏡写真術により記録した。これにより 15 μm 未満の平均粒子サイズ (視覚的決定、数平均) は、冷凍菓子製品における使用のために好適な A F P を示す。

実施例 II

A F P および水を含む組成物を得る方法

A. 植物部分 (例えば根、茎、つぼみまたは葉) の新鮮組織を、ペッスルおよびモルタル (4°C に冷却したもの) を用いて等量の緩衝液 A (例えば 10 mM EDTA、20 mM アルコルビン酸、トリスで pH 7.4 に緩衝化したもの) を用いてすりつぶすことができる。このホモジネートを 1 層または複数層のモスリンを通してろ過し、更に使用するまで水中に維持する。

この方法は、一般にほとんどの植物に適用することができ、A F P を含む新鮮植物ジュースを提供する。一般に、この目的のために植物全体を用いることができるが、実際的な理由でしばしば部分のみ (例えば樹木の葉、根菜の根、および草本植物の茎) を用いてもよい。

B. 草本のように熱に耐える供給源から A F P を抽出する方法。この方法は、混合草を用いて例示される。しかし、この方法を他の熱安定性植物に同様に適用してもよいことは明らかである。

混合草組織 (Poa trivialis, Lolium perenne, Holcus lanatus, Bromus sterilis) を 1 月に刈り取った (その月の平均気温は 3.5°C であり、植物の適切な寒冷気候順化を確実にした)。更に処理し、水でよく洗ってごみを除去するために、草組織を迅速に実験室に移送した。

500 g の刈り取った草を 650 ワットの電子レンジ中に置き、最大出力で 5 分間加熱して、これにより温度を $85 \sim 100^{\circ}\text{C}$ に上昇させた。次に、刈り取った草を周囲温度まで冷却した。

加熱工程後、A F P の豊富なジュースを草からろ過して分離した。等量の水の存在下で連

続して5分間物質を攪拌し、次いで3層のモスリンを通して絞った。

実施例III

種々の植物のスクリーニング。非南極植物は、1月（中冬期）に収穫した。南極植物は、中夏期に収穫した（2月～3月）。

別に記載していない場合、実施例II aに記載した方法にしたがって、根を用いてAFP含有ジュースを調製した。

試料を、実施例I aの試験に付した。冷凍菓子製品における適用に好適なAFPは、正の記号（+）で示す。

更に、このジュースの熱ヒステリシス特性を以下のようにして測定した。

AFPを含有する製品の試料の熱ヒステリシスを、マイクロスライド（Camlab Cambridge、パス長0.1mm）上に融解した製品を置くことにより決定した。マイクロスライドの端部は、ワセリンでシールした。エアロゾル凍結スプレーを用いて氷を試料に導入した。次いでスライドを-0.1℃に温度制御したエタノール浴中に浸漬した。5分間平衡化した後、試料を検査した。氷が完全に融けている場合、浴の温度を0.1℃の段階で下げ、平衡化した。これらの工程を、試料中に少量の氷晶が存在する温度に達するまで繰り返した。その温度での平衡化の後、浴温度を1分あたり0.01℃の段階で低下させた。試料の凍結点を、平衡化した結晶から氷成長が始まる温度として記録した。次に、試料の融解温度を、すべての氷晶が融解するまで、凍結点から始めて1分あたり0.01℃の段階で温度を上昇させることによって決定した。この温度は、試料の融解温度である。試料の熱ヒステリシスは、融解温度と凍結温度との間の差である。有意な程度の熱ヒステリシスを有するAFPを、正の記号（+）で示す。以下の結果が得られた。

10

20

植物名	熱ヒステリシス	再結晶阻害(例 1)
<i>Equisitum hymenale</i>	+	-
<i>Picea glauca</i>	+	-
<i>Dicentra cucularia</i>	+	-
<i>Viola sp.</i>	+	-
<i>Brassica oleracea</i>	+	-
<i>Brassica rapa</i>	+	-
<i>Brassica napus</i>	+	-
<i>Daucus carota</i>	+	+
<i>Vinca minor</i>	+	+
<i>Solanum tuberosum</i>	+	-
<i>Poa annua</i>	+	-
<i>Poa pratensis</i>	+	-
<i>Secale cereale</i>	+	*)
<i>Petroselinum crispum</i>	+	-
<i>Salvia officinales</i>	+	-

*) 注：活性であるが、29～32kDa タンパクであった。

これらの結果は、多数の植物が熱ヒステリシス特性を示すが、これらの少数のもののみしか再結晶試験を満足しないことを明らかに示す。

実施例IV

種々の植物のスクリーニング。非南極植物は、1月（中冬期）に収穫した。南極植物は、中夏期に収穫した（2月～3月）。

別に記載していない場合、実施例II aに記載した方法にしたがって、根を用いてA F P含有ジュースを調製した。

試料を、実施例 I aの試験に付した。冷凍菓子製品における適用に好適なA F Pを、正の記号(+)で示す。

植物名	RI 試験
Water horsetail	-
Asplenium scolopendrium	-
Polystichum mohriodes	+
Pinus sylvestris	-
Picea glauca	-
Cupress sp	-
Laurus	-
Ranunculus biternatus	+
Dicentra	-
Platanus orientalis	-
Urtica	-
Pterocarya fraxinifolia	-
Nothofagus antarctica	+
Nothofagus oblique	-

10

20

30

Betula pendula	-
Beta vulgaris	-
Cerastium fontanum	+
Colobanthus quitensis (pearlwort)	+
Rumex acetosella	+
Paeonia	-
Hypericum	-
Alcea	-
Viola	-
Populus alba	-
Salix alba 'Britzensis'	-
Salix daphnoides	-
Salix fragilis	+
Sorbus aria	-
Prassica napus	-
Erysimum	-
Calluna vulgaris	+
Primula	-
Hydrangea	
Sedum	-
Acaena magellanica	+
Crategus monogyna	-
Cotoneaster spp x2	-
Fragaria x ananassa	-

10

20

30

40

Alchemilla	-
Cytisus	-
Pisum sativum	+
Vicia faba	-
Medicago sativa	-
Daphne	-
Eucalyptus	-
Aucuba	-
Ilex	-
Acer saccharoides	+
Rhus	-
Oxalis	+
Geranium	+
Hedera	-
Daucus carota	+
Pastinaca sativa	-
Vinca	+
Polemonium	+
Rosmarinus	-
Buddleia	+
Forsythia	+
Fraxinus ornus	-
Lonicera pileata	-
Sambucus nigra	+
Lactuca sativa	-

10

20

30

40

Tragopodon porrifolius	-
Helianthus tuberosus	-
Juncus squarrosus	+
Carex aquatilis	+
Agrostis tenuis	+
Deschampsia antarctica	+
Festuca contracta	+
Festuca rubra	+
Parodiochloa flabellata	+
Phleum alpinum	+
Poa annua	+
Poa pratensis	+
Rostkovia magellanica (grass)	+
Bambosoideae sp	+
Muscari armenicum	-
Allium ampeloprasum cv Alaska	-
Allium cepa	-
Chorisodontium aciphyllum	+
Drepanocladus uncinatus	+
Isothecium myosuroides	+
Neckera complanata	-
Polystichum alpestre	+
Polytrichum commune	-
Polytrichum formosum	-
Racomitrium lanuginosum	-

10

20

30

40

Sphagnum capillofolium	-
Sphagnum palustre	-
Alectoria nigricans	+
Caloplaca regalis	+
Himantormia lugubris	+
Hypogymnia physodes	+
Parmelia subrudecta	+
Ramalina farinaceae	+
Stereocaulon glabrum	+
Umbilicaria antarctica	+
Usnea subfloridana	+

10

20

実施例 V

アイスクリームを製造するための液体プレミックスを、以下のものを混合することにより作成した。

成分	重量%
スキムミルク粉末	11.390
スクロース	3.410
マルトデキストリン (MD40)	4.000
Locust bean ガム	0.072
コーンシロップ 63DE	20.705
グアーガム	0.048
Genulacta L100	0.020
バター	9.015
Avicel RC581	0.240
ゼラチン	0.140
モノグリセリド (パルミテート)	0.450
バニリン	0.010
AFP (実施例IIbのもの)	0.100 またはなし (対照)
水	残り

10

20

*) 注：AFPは、添加水の一部を希釈剤として用いて濃縮AFP溶液として添加した。パーセンテージはAFPの量を指す。

このミックスを好都合に85℃で15秒間低温殺菌し、缶に入れて冷蔵した。

このミックスを、従来の家庭用ミキサーで約100%の超過量までホイップし、続いて家庭用フリーザー中で静置して凍結させることにより、アイスクリームの製造に用いることができる。

30

本発明にしたがった組成物は、対照試料よりも顕著に優れたテクスチャーを有していた。同様の結果を、以下の植物供給源を用いて得ることができる：Acer saccharoides, Bamboo, Buddleia, Isothecium, myosuroides, Ramalina farinaceae, Usneasubfloridana, Forsythia, Oxalis, Poa trivialis, Lolium perenne, Holcus lanatus, Bromus sterilis, Parodiochloa flabellata, Deschampsia antarctica, Carexaquatilis, Colobanthus quinensisおよびAgrostis tenuis, Festuca contracta, Poa annua。

実施例VI

アイスクリームを製造するための液体プレミックスを、以下のものを混合することにより調製した。

40

成分	重量%
スキムミルク粉末	10.00
スクロース	13.00
マルトデキストリン (MD40)	4.00
Locust bean 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 (実施例II bのもの)	0.01 またはなし (対照)
水	残り

10

*) 注：A F Pは、水の一部の中の濃縮A F P溶液として添加した。パーセンテージはA F Pの量を指す。

20

成分を周囲温度で混合し、続いて89℃で60秒間低温殺菌した。このミックスを無菌的に500mlのパックに詰め、シールして周囲温度で貯蔵した。

このミックスを、従来の家庭用ミキサーで約70%の超過量までホイップし、続いて家庭用フリーザー中で静置状態で凍結することによりアイスクリームの製造に用いることができる。2ヵ月間の貯蔵後、本発明にしたがった組成物は、対照試料よりも顕著に優れたテクスチャーを有していた。

実施例VII

この例は、ニンジンA F Pの単離および配列決定を説明する。同様の方法を他の植物A F Pに用いることができる。

30

寒冷気候順化したニンジンの根組織を、予め冷却したペッスルおよびモルタルの中で、3倍容量(W/V)の緩衝液(20mMアルコルペン酸、10mMEDTA、50mMトリス-HCl、pH7.2)中でホモジナイズし、1層のモスリンを通してろ過した。ろ液を6,000×gで4℃で10分間遠心した。上清を集め、100,000×gで4℃で1時間遠心した。この工程からの100,000×g上清を可溶性画分、ペレットをミクロソーム画分と呼ぶ。

上清を、予め50mMトリス-HCl、pH7.4で平衡化した30mlのファストフローQセファロース(Pharmacia)カラムに、Gradifrac低圧クロマトグラフィシステム(Pharmacia)により4℃に制御したHiLoadポンプP-50で5ml/分の流速で供給して、溶出液をUVモニター(モニターUV1、Pharmacia)によりOD280で監視し、チャートレコーダー(REC102、Pharmacia)で記録した。カラムを、OD280が0に戻るまで、50mMトリス-HCl、pH7.4で同じ流速で洗浄した。次に、トリス-HCl、pH7.4中、0~0.4M塩化ナトリウム(NaCl)の150mlのグラディエントを適用し、続いて、2M NaClでカラムを洗浄した。溶出液画分を実施例Iのようにスプラットアッセイに付した。

40

抗凍結活性を含有する画分をプールし、以下のようにしてポリエチレングリコールを用いて濃縮した。水道水で洗浄し、50mMEDTA、pH7.5中で10分間煮沸し、ミリQ水ですすいでおいた10kDaカットオフの透析チューブ(Sigma)に画分を移した。濃縮すべき試料を含有する透析チューブを、分子量15,000~20,000の固体ポリエチレングリコール化合物(Sigma)でカバーし、4時間まで、または透析チューブ内の試料

50

容積が10倍減少するまで、4℃でインキュベートした。

Qセファロースカラムからのプールした濃縮物を、フェニルセファロースカラム、SMARTスーパーデックス75ゲル透過カラムまたはFPLCスーパーデックス75ゲル透過カラムのいずれかに適用した。

ニンジン根抗凍結タンパクを、以下のようにしてゲル透過クロマトグラフィにより精製した。

試料の20μlアリコート、0.15M NaClを含有する50mMトリス-HCl、pH7.4（緩衝液E）で予め平衡化したSMARTスーパーデックス75カラム（Pharmacia）に、流速40μl/分で適用し、平衡化緩衝液中で同じ流速でゲル透過により成分を分離した。溶出液は、OD280およびOD215で監視した。0.85～0.89mlの間で80μl画分を集め、0.89～1.24mlの間で40μl画分を集め、そして1.24～3.0mlの間で100μlの画分を集めた。カラムのボイド容積（V_o）は、ブルーデキストランの溶液の保持容積から決定したところ、0.91mlであった。スーパーデックスカラムは、5mg/ml BSA（分子量66kDa、保持（V_e）=1.02ml）、3mg/mlカルボン酸アンヒドラーゼ（分子量29kDa、V_e=1.22ml）、2mg/mlチトクロームC（分子量12.4kDa、V_e=1.41ml）、および2mg/mlアプロチニン（分子量6.5kDa、V_e=1.59ml）を含有する10μlの溶液を適用することにより較正し、分子量の対数に対してV_e/V_oの標準曲線をプロットした。抗凍結活性を含有する画分は、実施例Iのスプラットアッセイにより同定し、活性のピークは1.16mlの保持容積および40kDaの見かけの分子量を示した。これらの測定値は、寒冷気候順化したニンジンからの38kDaバンドが抗凍結ペプチドであったことを確認するものであった。

Laemmli（1970）にしたがって、Bioradミニシステムを用いてSDS-PAGEを行った。SDS-PAGEにより解析すべき試料を、SDS-PAGE試料緩衝液（Laemmli, 1970）に溶解させ、ドライヒーティングブロック（Techne）上で100℃で5分間加熱し、室温で10,000×gで3分間遠心した。試料（10～50μl）をミニゲル（Biorad；0.75、1.0または1.5mm厚、10、12、15%アクリルアミドまたは10～20%グラディエントアクリルアミド（Bioradからのプレポアド））に適用し、電気的に分離した。分離したポリペプチドは、固定し、ゲル中でクマシー・ブルー（0.1%（W/V）クマシー・ブリリアント・ブルー、酢酸／メタノール／ミリQ水（5：4：31、容量）中）で染色するか、または製造者の指示書にしたがってBiorad銀染色キットを用いて銀染色した。ゲルを、製造者の指示書にしたがってBiorad Gelairドライヤー中で2枚のGelairセロハン（collophane）シートの間で乾燥した。SDS-PAGE上での見かけの分子量の決定のために、製造者の指示書にしたがってSigmaの高および低分子量マーカーキットを用いた。

寒冷気候順化ニンジン根および非寒冷気候順化ニンジン根を用いてイオン交換クロマトグラフィを行った。得られたSDS-PAGEゲルは、寒冷気候順化試料中に約38kDaのバンドの存在を示した。このバンドは、非寒冷気候順化根中でははるかに少量であった。したがって、この（約）38kDaのバンドに抗凍結活性が帰属するとされた。

タンパク配列決定のために、約38kDaのニンジン根タンパクを前記の実施例に記載したように精製し、次いで、更なる精製を確実にするために、配列決定すべき試料をSDS-PAGEゲルから切り出して、ポリアクリルアミドゲルのスライス中でインサイチュでタンパク分解的に消化した。

約38kDaのほとんど純粋なタンパクの調製物（いくらかの少量の夾雑タンパクをなお含んでいた）を、12%ポリアクリルアミドゲルに付した。各々2μgのタンパクを3つのレーンに入れ、色素のフロントがゲルの底部に達するまで、ゲル中を電気泳動させた。次いで、ゲルを0.2%クマシー・ブリリアント・ブルー（W/V）、30%メタノール（V/V）、1%酢酸（V/V）中で20分間染色し、次いでタンパクのバンドが見えるようになるまで30%メタノールで脱色した。38kDaのバンドは、隣接するレーンに入れた分子量マーカーと比較することにより同定し、混在するバンドを排除するように注意しながら各レーンからのバンドを外科用メスの刃で切り出した。

ゲルのスライスを、清浄なエッペンドルフチューブに移し、0.5mlの50%アセトニトリル (V/V)、100mM トリス-C1、pH 8.5を用いて2回洗浄した。洗浄により、クマシーで染色され、部分的に脱水されたゲルスライスのいくらかが除去された。次いで、ゲルスライスを、チューブから取り出して、有意に縮んで巻き上がりはじめるまで実験台上で空気中で乾燥した。次に、これらをエッペンドルフチューブに戻し、まず、10μlの、1μgのエンドプロテイナーゼ Lys C (Boehringer Mannheim) を含有する100mM トリス-C1、pH 8.5で再水和した。これは、リジン残基のカルボキシ末端側でポリペプチド鎖を特異的に切断するプロテイナーゼである。更に、トリス緩衝液を、ゲルスライスが十分に再水和されるまで添加し、次いで37℃で16時間インキュベートした。

10

インキュベーション後、1μlのトリフルオロ酢酸をチューブに添加して反応を停止させ、次いでゲルスライスを0.3mlの60%アセトニトリル (V/V)、0.1% TFA (V/V) で、30℃で30分間、2回洗浄した。これは、再びゲルスライスを部分的に脱水し、それらを縮ませて、生成されたペプチドを溶出させるためであった。上清を別の清浄なエッペンドルフチューブに移し、次いで遠心エバポレーター中で2時間、試料がほぼ乾燥するまで乾燥し、0.1% TFAで0.1mlの容量に再懸濁した。

次に、SMART微量精製システム (Pharmacia) 上で逆相HPLCによりペプチドを分離した。ペプチド消化物を、0.1% TFA (溶媒A) で平衡化したC18カラム (2.1×100mm) 上に流速0.1ml/分で付した。次いで、カラムを、0~70%の溶媒B (90%アセトニトリル (V/V)、0.085% TFA (V/V)) のグラディエントで、同じ流速で70分間にわたって溶出した。光学密度を214nmで監視し、個々のペプチドピークを手動で進行させながらフラクションコレクターで集めた。製造者の推奨にしたがって液相化学サイクルを用いて、モデル492Perkin Elmerタンパクシーケンサーにかけることにより、ポリペプチドを配列決定した。

20

38kDaバンド中のいくつかのポリペプチドフラグメント (A~E) を解析し、これらは、以下の配列と実質的に相同な配列を有していた：

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

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

30

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

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

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

40

抗凍結タンパクの製造のための細胞培養物は、以下のようにして作成した。

新規な細胞培養を、Gamborg and Wetter 1975、Torres 1989、Dodds and Roberts 1985に記載された方法に基づいて開始した。

寒冷気候順化ニンジン (Autumn King)：

貯蔵根の表面を、まず、10% Teepol界面活性剤で洗浄し、続いて流水下でこすり洗いし、次いで流水で15分間すすぐことにより滅菌した。(サイズに基づいて) 実施可能な場合、根の皮をむいた。次に、根を無菌的に0.5cmのスライスに切り、これらを振とうしながら70% (V/V) エタノール中に10分間置き、続いて振とうしながら10% (V/V) Domestos+2滴のTween 20 (Sigma) 中に25分間置いた。次に、切片を滅菌蒸留水で3回洗浄した。およそ0.5cmの直径の円筒を、外科用メスを用いてスライスを通じて切り

50

取り、残りを2～3mmの長さに切った。これらの組織ディスク（外生体）を、60mlのSterilin容器に入れられた30g/lスクロース、10mg/lインドール酢酸（IAA）、0.1mg/lキネチンおよび8g/lテクニカルアガーを含有する固体MS培地に無菌的に移した。外生体を、20℃で暗黒下でインキュベートした。

必要なときに、生じたカルスを小さい切片に分けて、これを新鮮な培地にプレーティングした。次いで、活発に生育するカルスから、懸濁培養を開始した。

更に、ニンジン細胞懸濁培養株（NORおよびOX6）を、Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Leedsから入手した。10mlのこれらの培養物を、90mlの25g/lスクロースおよび1mg/l 2, 4-Dを含有する新鮮Murashige and Skoog培地（Sigma）に7日ごとにサブ培養した。培養物は、暗黒下で、25℃で、旋

10

回振とうインキュベーター中で150rpmでインキュベートした。

NOR培養物を、以下のようにして寒冷処理した。

18×5mlの7日目のNOR培養物を、45mlのニンジンMS培地を含有する18×100mlの三角フラスコに加えた。この培養物を、前に記載したように25℃で4日間インキュベートし、次に、インキュベーターの温度を4℃に低下させた。すぐに2個のフラスコを取り出して、t=0として、前に記載したように細胞および培地を収穫した。残りのフラスコは、t=8時間、1日、2日、4日、7日、9日、11日および14日に2個ずつ収穫した。

NORおよびOX6のより大規模な培養物を用いて寒冷気候順化処理を繰り返した。これらは、25℃での生育の4日および7日後に4℃に移した。t=0、t=7日およびt=14日の時点で培養物を収穫した。収穫することに加えて、各時点で各培養物についてPCVを決定した。

20

NOR寒冷気候順化細胞を、以下のようにして実施例Iのようなスプラットアッセイのために調製した。急速冷凍細胞を、ペッスルとモルタルを用いて液体窒素中で微細粉末に破碎した。粉末化した試料を、2×容量の10mMEDTA+20mMアスコルビン酸中に再懸濁し、30秒間渦巻攪拌により混合して、次に10,000×gで10分間遠心した。陰性対照として緩衝液対照を用いて上清の10μlアリコートのスプラットした。RI活性は、寒冷気候順化細胞においては検出することができたが、非寒冷気候順化試料中には検出することができなかった。

NOR懸濁液からの培地試料を、以下のようにして解析した。NORニンジン培地を、100μlの1Mトリス-HCl、pH7.4を添加することにより緩衝化した。次に、これを、1mlのQセファロースカラム（Pharmacia）に1ml/分の流速で適用し、結合した分子を、0.5M NaClを含有する50mMトリス-HCl、pH7.4の3mlアリコートで溶出した。1mlの画分を集めた。

30

このアニオン交換法は、t=0、2日、4日、7日、11日の寒冷気候順化培地試料およびt=7日の非寒冷気候順化培地試料を分画するためにも用いた。画分を、実施例Iに記載したようなサンドイッチスプラットアッセイにより活性について試験した。

培地中の抗凍結活性を、以下のようにしてゲル透過クロマトグラフィにより精製した。上記のQセファロースカラムからの14の寒冷気候順化0.5M塩化ナトリウム溶出液（画分2）を、アセトン沈殿に付し、ペレットを50μlの50mMトリス-HCl+0.15M

40

NaCl、pH7.2中に再懸濁した。次に、これを、10,000×gで10分間遠心し、20μlをPharmacia SMARTシステムでスーパーデックス75ゲル透過カラム上に適用した。流速は、40μl/分であり、移動（mobile）相は50mMトリス-HCl+0.15M NaCl、pH7.2であった。80μlの画分を集め、スプラットした。この手順を、Qセファロースカラムからのt=14日の非寒冷気候順化0.5M NaCl溶出液および新鮮培地を用いて繰り返した。

活性タンパクの更なる単離は、上述のようなSDS-PAGE解析により行うことができる。

実施例VIII

寒冷気候順化ニンジン根からの根抽出物を、冷水中で新しく抜いた寒冷気候順化ニンジン

50

をこすり洗いすることにより調製した。頂部を除去し、家庭用ジュース抽出器 (Russel Hobbs、モデル番号 9915) を用いてジュースを抽出した。ジュースを 1 リットルのブロックに凍結させて、アイスクリーム試作における使用のために回収する前に -20°C で貯蔵した。

ニンジン A F P ジュースを、以下のアイスクリーム処方に添加した。

成分	重量%
スキムミルク粉末	10.000
スクロース	13.000
MD 40	4.000
Locust bean ガム	0.144
Genulacta L100	0.016
MGP	0.300
バターオイル	8.000
バニリン	0.012
水	64.528
ニンジン抽出物 (1~10mg A F P / kg を含有する寒冷気候 順化ニンジン由来のもの)	4.472

上記の処方を凍結させ、106%超過量までエアレーションすることによりアイスクリームを調製した。

新鮮試料および -10°C で 10 日間の貯蔵により酷使した試料について測定を行った。比較として、ニンジン抽出物なしの試料を同様に測定した。測定は、以下のように行った。

試料を、Prolan 環境キャビネット中で約 12 時間、 -18°C で平衡化した。アイスクリームの各パッチから代表的に 3 つの試料を選び、各ブロックの中央からアイスクリームの薄層を顕微鏡スライド上にスミアすることにより Cryostat 温度制御キャビネット中で各々からスライドを調製した。ホワイトスピリットの 1 滴をスライドに適用し、次いでカバースライドを適用した。各スライドを、次に、温度制御した顕微鏡ステージに移した (Leit LaborLux S, Leica 10×対物レンズ、温度 -18°C)。氷晶の像 (約 400 個の氷晶) を集め、ビデオカメラ (Sanyo CCD) を通じて画像保存および解析システム (LEICA Q520M C) にリレーした。

保存した氷晶像は、境界線に沿って線を引くことにより手動でハイライトし、次いでこれが結晶全体をハイライトした。次いで、ハイライトされた結晶の像を、最も長い直線 (長さ)、最も短い直線 (幅)、アスペクト比 (長さ/幅) を完了するのに必要な画素の数をカウントする画像解析ソフトウェアを用いて測定した。アイスクリームの 1 パッチの各氷晶についてのデータをスプレッドシートに取り入れて、ここでデータのセットの解析を行って平均および標準偏差を見出した。

アイスクリーム硬度の測定は、Hounsfield H10KM ユニバーサルテスター、Hounsfield 100 N ロードセルおよび 10 cm シリンダー状ステンレススチールプローブを用いて行った。アイスクリーム試料は、 -18°C に設定した Prolan 温度制御キャビネット中で 486 ml のアイスクリームブロックを 16 時間インキュベートすることにより調製した。

アイスクリームブロックを Prolan 温度制御キャビネットから取り出し、Hounsfield H10KM ユニバーサルテスターに置いた。10 cm シリンダー状プローブをアイスクリームブロックに 400 mm/分の一定速度で 20 mm の深さまで押し込んだ。加圧の間に記録された最大力を用い、アイスクリーム硬度として表現した。試料の亀裂または破碎が観察された場合、

これは、右側の欄に示した。
以下の結果が得られた。

試料	氷結晶サイズのパラメーター				物質の特性	
	平均結晶長 (μm)	平均結晶幅 (μm)	平均結晶形 ファクター	平均結晶 アスペクト比	硬度 / N	破碎観察 n
ニンジン AFP (新鮮)	26.79 $\pm$ 1.3	19.00 $\pm$ 0.9	1.15 $\pm$ 0.013	1.43 $\pm$ 0.024	40.8	あり
ニンジン AFP (酷使)	33.48 $\pm$ 1.3	24.61 $\pm$ 0.9	1.13 $\pm$ 0.013	1.37 $\pm$ 0.020	59.9	あり
対照 (新鮮)	33.67 $\pm$ 1.1	24.79 $\pm$ 0.8	1.12 $\pm$ 0.008	1.38 $\pm$ 0.018	27.3	なし
対照 (酷使)	61.77 $\pm$ 2.7	46.54 $\pm$ 2.0	1.11 $\pm$ 0.010	1.37 $\pm$ 0.020	32.7	なし

以下の結論を導くことができる：

- 最初の氷晶サイズは、ニンジンAFPを含有するアイスクリームの方が小さく、したがってニンジンAFPは再結晶を阻害する。
- ニンジンAFPアイスクリーム中の氷晶は、その再結晶化過程において遅延される。
- ニンジンAFPアイスクリーム中の氷晶形は、従来のアイスクリームにおいて見られる結晶形と有意に異なる。
- ニンジンAFPを含有するアイスクリームの物質特性は、従来のアイスクリームについて記されているものから改変されている。すなわち、アイスクリームは従来のアイスクリームより硬いが、それでもなお例えば魚AFPを含有するアイスクリームよりは柔らかい。第二に、ニンジンAFPを含有するアイスクリームは、破碎することが観察された。GeraniumまたはJuncus squarrosusを用いて同様によい結果を得ることができる。

実施例IX

この例では、ウィンターライからの種々のタンパクの単離およびそれらの試験を記載する。

30日間寒冷気候順化したライ植物からの葉を、3cmの長さに切り、蒸留水中で十分に洗浄して細胞内容物を除去した。葉の片をペーパータオルでパット乾燥し、5mMEDTA、10mMアスコルビン酸、2mMカプロン酸、2mMベンズアミジンおよび1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)の抽出媒体中に完全に浸漬した。次に、これらを、60分間ブフナーフラスコ中に真空浸透させ、その後、葉を取り出し、完全にパット乾燥した。次に、これらをカットオフプラスチックシリンジ筒中に縦に配置し、2,000×gで30分間穏やかに遠心した。アポプラスチック抽出物をシリンジの下のエッペンドルフチューブに集めた。

このアポプラスチック抽出物を、PM10膜を有するAmicon限外ろ過器を用いて7倍濃縮した。最初の精製は、50 μl の濃縮アポプラスチック抽出物をSMART分離システムでサイズ排除スーパーデックス75PC3.2/3.0(分離域3~70kDa)カラム(共にPharmacia)上に適用することによって行った。緩衝液は、50mMトリス-HCl、pH9.5であった。分離は、流速50 μl /分で行い、50 μl の画分を2.5mlの容量

まで集め、実施例 I に記載したように再結晶についてアッセイした。

活性画分を、50 mM トリス-HCl、pH 9.5 で平衡化した強力アニオン交換 MonoQ FPLC カラム (Pharmacia) に適用し、0.5 M までの塩化ナトリウムの直線状グラデーションを含む同じ緩衝液を用いてタンパクを溶出した。溶出緩衝液を25分間にわたって0.5 M NaCl の濃度まで添加して、10分間維持し、15分間にわたって0 M に減少させた。流速1 ml/分でクロマトグラフィを行い、1 ml の画分を集めた。実施例 I にしたがった試験において陽性であった画分を、7,000 rps の Centricon PM10 遠心濃縮器で容量が50 μ l に減少するまで濃縮し、再び S75 カラムに適用した。実施例 I の試験を満足した画分は、約150 mM 塩の単一ピークであった。

この活性画分を SDS-PAGE 上で分離した (実施例 VII と同様の方法論)。これにより、32 kDa が活性画分であることが確認された。

10

ウィンターライタンパクのこの32 kDa 画分は、冷凍菓子製品の製造において有利に用いることができる。

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 96308362.1
(32)優先日 平成8年11月19日(1996.11.19)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
- (31)優先権主張番号 97301719.7
(32)優先日 平成9年3月14日(1997.3.14)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
- (31)優先権主張番号 97301733.8
(32)優先日 平成9年3月14日(1997.3.14)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
- (72)発明者 ダーリン、ドナルド・フランク
英国、シャーンブルック、エムケイ44・1エルキュー、コルワース・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 ドゥース、シャルロット・ジュリエット
英国、ヘスリントン、ヨーク・ワイオー1・5ワイダブリュ、ザ・プラント・ラボラトリー、デパートメント・オブ・バイオロジー・ザ・ユニバーシティ・オブ・ヨーク（番地なし）
- (72)発明者 フェン、リチャード・アンソニー
英国、シャーンブルック・エムケイ44・1エルキュー、コルワース・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 リリフォード、ピーター・ジョン
英国、シャーンブルック・エムケイ44・1エルキュー、コルワース・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 マッカーサー、アンドリュー・ジョン
英国、シャーンブルック・エムケイ44・1エルキュー、コルワース・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 ニードム、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、コルワース・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 サイドボトム、クリストファー
英国、シャーンブルック・エムケイ44・1エルキュー、コルワース・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、コルワース・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、マーガレット・フェリシア
英国、ヘスリントン、ヨーク・ワイオー1・5ワイダブリュ、ザ・プラント・ラボラトリー、デパートメント・オブ・バイオロジー、ザ・ユニバーシティ・オブ・ヨーク（番地なし）

審査官 山中 隆幸

- (56)参考文献 国際公開第92/022581 (WO, A1)
Plant Physiol., 1995年, vol.109, p.879-889
Plant Physiol., 1994年, vol.104, p.971-980
Plant Physiol., 1996年, vol.110, p.845-857
Plant Physiol., 1992年, vol.100, p.593-596
Biotechnology Advances, 1995年, vol.13, p.375-402

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A23G 1/00 - 9/30
C12N 15/00 - 15/90
C07K 1/00 - 19/00
JSTPlus(JDreamII)
PubMed
BIOSIS/WPI(DIALOG)