

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7249695号

(P7249695)

(45)発行日 令和5年3月31日(2023.3.31)

(24)登録日 令和5年3月23日(2023.3.23)

(51)国際特許分類

F I

C 0 9 B 61/00 (2006.01)

C 0 9 B

61/00

A

C 0 9 B 67/54 (2006.01)

C 0 9 B

67/54

Z

C 0 9 B 67/44 (2006.01)

C 0 9 B

67/44

A

C 1 2 P 23/00 (2006.01)

C 1 2 P

23/00

請求項の数 15 (全17頁)

(21)出願番号 特願2021-549659(P2021-549659)

(86)(22)出願日 令和2年10月13日(2020.10.13)

(65)公表番号 特表2022-545594(P2022-545594
A)

(43)公表日 令和4年10月28日(2022.10.28)

(86)国際出願番号 PCT/CN2020/120622

(87)国際公開番号 WO2022/021612

(87)国際公開日 令和4年2月3日(2022.2.3)

審査請求日 令和3年8月24日(2021.8.24)

(31)優先権主張番号 202010733602.3

(32)優先日 令和2年7月27日(2020.7.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者 515223167

中国海洋大学

中▲華▼人民共和国山▲東▼省青▲島▼
市▲労▼山区松▲嶺▼路2 3 8号

(74)代理人 110002468

弁理士法人後藤特許事務所

(72)発明者 齊 祥明

中華人民共和国 2 6 6 1 0 0 , 山東省
青島市松嶺路2 3 8号

(72)発明者 梁 康琳

中華人民共和国 2 6 6 1 0 0 , 山東省
青島市松嶺路2 3 8号

(72)発明者 黄 文燦

中華人民共和国 2 6 6 1 0 0 , 山東省
青島市松嶺路2 3 8号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法、アスタキサンチン水溶液の調製方法及びアスタキサンチン凍結乾燥粉の調製方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液を混合して細胞破碎し、浸出液を得るステップ(1)と、

ステップ(1)における前記浸出液を攪拌・浸出させて固液分離し、水溶性アスタキサンチン複合体を得るステップ(2)とを含み、

ステップ(1)におけるアスタキサンチンとアスタキサンチン含有原料に天然に存在するタンパク質、核酸又は多糖成分が相互作用して、自己組織化形態の水溶性アスタキサンチン複合体を形成し、前記有機酸含有溶液のpHは3.0～6.5であり、前記アスタキサンチン含有原料は、ヘマトコッカス藻、赤色酵母ファフィア、甲殻類動物又はクロレラのいずれか1種又は少なくとも2種の組合せを含み、前記有機酸は、リンゴ酸、酒石酸、グリシン、シュウ酸又はクエン酸のいずれか1種又は少なくとも2種の組合せを含み、前記有機酸含有溶液は有機酸pH緩衝液である、

水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法。

【請求項2】

前記アスタキサンチン含有原料は、ヘマトコッカス藻である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ステップ(1)における前記有機酸含有溶液中の有機酸の質量濃度は0.1～2.0mol/L

10

20

L / Lである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記有機酸含有溶液の pH は 5 . 0 ~ 6 . 3 である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記有機酸は、クエン酸である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記有機酸 pH 緩衝液は、リンゴ酸及びリンゴ酸ナトリウム緩衝液、酒石酸及び酒石酸ナトリウム緩衝液、グリシン及び H C l 緩衝液、シュウ酸及びシュウ酸ナトリウム溶液緩衝液、又はクエン酸及びクエン酸ナトリウム緩衝液のいずれか 1 種又は少なくとも 2 種の組合せを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記有機酸 pH 緩衝液は、クエン酸及びクエン酸ナトリウム緩衝液である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液との比重は 0 . 1 ~ 1 0 g : 1 0 ~ 4 0 m L である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ (1) 及び / 又はステップ (2) に補助剤を加えて浸出を補助し、前記補助剤はタンパク質、核酸又は多糖のいずれか 1 種又は少なくとも 2 種の組合せを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 10】

ステップ (2) における前記攪拌・浸出の時間は 6 ~ 7 2 h であり、前記攪拌・浸出の温度は 2 0 ~ 3 5 であり、前記攪拌・浸出は遮光・密閉条件で行われる、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ (2) における前記固液分離は遠心分離を含み、前記遠心分離の温度は 2 ~ 5 であり、前記遠心分離の後にフィルタを用いて遠心分離で得られた上清を濾過し、水溶性アスタキサンチン複合体溶液を得る、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 12】

ステップ (2) に固液分離で得られたアスタキサンチン含有原料残渣を少なくとも 1 回再浸出するステップ (3) をさらに含み、前記再浸出は、前記アスタキサンチン含有原料残渣と有機酸含有溶液を混合して浸出液を得て、ステップ (2) にリサイクルすることを含み、前記再浸出はステップ (1) と同じ及び / 又は異なる有機酸含有溶液を使用し、前記再浸出はステップ (1) と同じ有機酸含有溶液を使用してから、ステップ (1) と異なる有機酸含有溶液を使用する、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液を混合して細胞破碎し、浸出液を得るステップ (1) であって、前記有機酸の質量濃度が 0 . 1 ~ 2 . 0 m o l / L で pH が 3 . 0 ~ 6 . 5 の有機酸 pH 緩衝液は、アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液との比重が 0 . 1 ~ 1 0 g : 1 0 ~ 4 0 m L であるステップ (1) と、ステップ (1) における前記浸出液を 2 0 ~ 3 5 の遮光・密閉条件で 6 ~ 7 2 時間攪拌・浸出させてから、2 ~ 5 、7 0 0 0 ~ 9 0 0 0 r / m i n で 3 0 ~ 6 0 分間遠心分離した後、フィルタを用いて遠心分離で得られた上清を濾過し、水溶性アスタキサンチン複合体を得るステップ (2) と、ステップ (2) に固液分離で得られたアスタキサンチン含有原料残渣と有機酸含有溶液を混合して浸出液を得て、ステップ (2) にリサイクルし、少なくとも 1 回再浸出するステップ (3) とを含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

40

50

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を用いて調製する、アスタキサンチン水溶液の調製方法。

【請求項 15】

請求項 14 に記載のアスタキサンチン水溶液を用いて凍結乾燥させて調製する、アスタキサンチン凍結乾燥粉の調製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は生化学の技術分野に関し、特に水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法及びそれにより調製されたアスタキサンチン水溶液に関する。

10

【背景技術】

【0002】

アスタキサンチンは、光による損傷からの肌の保護、動脈硬化及び関連疾患の予防、抗癌活性、免疫系機能の強化、目及び中枢神経系の健康の維持、抗感染等の生理活性を有し、食品、医薬、化粧品及び養殖等の分野に幅広い用途があり、したがって、関連するアスタキサンチン抽出及び使用の技術はますます多くの人々の注目を集めている。

【0003】

現在の特許及び関連文献の研究には、アスタキサンチン抽出に関する技術は、主に有機溶剤抽出法、超臨界CO₂抽出法、酵素加水分解法及びマイクロ波抽出法等を含むが、これらの方法にはいずれもいくつかの問題がある。

20

【0004】

CN110724083Aは、有機溶剤抽出法を開示しており、抽出時にアスタキサンチンの構造が不安定したため、異性化反応が発生してその耐酸化活性が低下する可能性がある。且つ、このタイプの有機溶剤抽出法で使用されるほとんどの有機溶剤は一定の毒性があり、抽出後の試薬残留の問題があり、食品工業での製品の使用が制限される。

【0005】

CN109608376Aは、超臨界CO₂抽出法を開示しているが、該方法は生産用途で数十の大気圧の耐圧能力が要求され、設備要求が高く、投資が大きく、生産コストが高く、且つ該技術は耐高压設備の操作につながり、生産技術に対する要求が高く、それは工業生産上の使用も制限される。

30

【0006】

CN107805215Bは、酵素加水分解法によってアスタキサンチンを抽出する方法を開示しており、抽出過程に酵素加水分解法を用いてヘマトコッカス藻の壁を2回破壊し、アスタキサンチンの抽出率を向上させるが、反応は温度、pH及び時間等の操作条件に対する要求が比較的高く、且つ操作過程が複雑であり、酵素製剤の使用も製造コストを増加させる。

【0007】

2007年、王靈昭らは、アスタキサンチンを有機的に抽出するときにマイクロ波法を用いて補助（「マイクロ波法によってヘマトコッカス藻におけるアスタキサンチンを抽出するプロセスに関する研究」、王靈昭等、食品研究及び開発、第28巻、第12期、第96~100頁を参照）し、抽出率を向上させたが、マイクロ波抽出過程で温度が上昇し、アスタキサンチンの酸化分解が引き起こし、また、マイクロ波抽出の選択性が比較的低く、アスタキサンチンの分離に不利であった。

40

【0008】

上記の各技術及び方法はいずれもアスタキサンチンの抽出のみに関するが、アスタキサンチンは多くの生理活性を有するものの、水に溶けないため、産品使用に多くの問題に直面し、よって、抽出したアスタキサンチンは最終産品を形成するために再加工する必要があることがよくある。したがって、水溶液中のアスタキサンチンの分散能力を改善し、アスタキサンチンの安定性を向上させることは、アスタキサンチンの産品化過程におけるボ

50

トルネック問題になっている。

【0009】

現在、アスタキサンチンの水溶性の改善に関する国内外の特許及び関連する研究は、主にマイクロカプセル法、乳化剤法、ナノ沈殿法及び包接法等を含む。

【0010】

CN108403666Aは、マイクロカプセル法を開示しており、該方法は生物分子の安定性と物理性を改善できるが、不連続操作があり、連動化生産に不利であり、包埋物のリサイクルが容易ではなく、調製コストが高い等の問題を引き起こす。

【0011】

2013年、Navideh Aらは、親水性乳化剤（ポリソルベート及びスクロースエステル）を加えることにより、アスタキサンチンの水溶性を向上させたが、該技術は、適切な乳化及び均質化手段と乾燥技術に依存すると同時に、乳化及び揮発後に残った有機溶剤は、さらに、アスタキサンチン製品に一定の生物学的安全性の問題を引き起こした（「Effects of Selected Polysorbate and Sucrose Ester Emulsifiers on the Physicochemical Properties of Astaxanthin Nanodispersions」, Navideh A等, Molecules, 第18期, 第768～777頁を参照）。

10

【0012】

2007年、Xiaolin Chenらは、包接化合物法を用いてアスタキサンチンを β -シクロデキストリンに包接（「The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin」, Xiaolin Chen等, Food Chemistry, 第101期, 第1580～1584頁を参照）し、アスタキサンチンの溶解性及び安定性を向上させたが、該方法は、薬物負荷量が低く、一般に9%～14%に過ぎず、リソースの浪費を引き起こし、生産コストが増加し、工業化生産に不利であった。

20

【0013】

CN109646425Aは、キトサン及びDNAを用いてアスタキサンチンナノ系を構築する方法を開示しており、該方法は、操作が簡単で設備に対する要求が高くないが、ほとんどのポリマー材料の成分は人工合成等の化学的方法により得られたため、その結果、ポリマー材料は生物相容性、分解能力、細胞毒性及び有機溶剤残留等の方面でいくつかの不足がある。

30

【0014】

要するに、従来の天然アスタキサンチン製品の調製プロセスは、抽出技術及び水溶性アスタキサンチン複合体調製技術の2つのステップを含むことが多く、且つ2つのステップのプロセスに関するさまざまな技術はいずれも一定の欠陥がある。

【0015】

したがって、上記の問題を軽減し、アスタキサンチンの水溶性及び安定性を向上させることができる水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を開発する必要がある。

40

【発明の概要】

【0016】

従来の技術に存在する問題に鑑みて、本願は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は従来の抽出技術及び水溶性アスタキサンチン複合体調製技術の2つのステップに存在する技術的な欠陥を克服し、アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液を混合した後に細胞破碎してから浸出することで、天然アスタキサンチンと原料に天然に存在するタンパク質、核酸又は多糖等の成分との間の相互作用を実現し、これにより、天然アスタキサンチン抽出と水溶性アスタキサンチン複合体調製とを1つのステップで結合することを実現し、別途にアスタキサンチンを改性する必要がなく、且つアスタキサンチンの供給源が天然であり、操作プロセスが簡単であり、設備に対する要求が低く、

50

生産コストが低く、環境に優しく安全であり、有機溶剤の残留がなく、工業化が容易に実現する。

【 0 0 1 7 】

この目的を達成するために、本願は以下の技術案を講じた。

第 1 の態様において、本願は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、

アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液を混合して細胞破碎し、浸出液を得るステップ (1) と、

ステップ (1) における前記浸出液を攪拌・浸出させて固液分離し、水溶性アスタキサンチン複合体を得るステップ (2) とを含む。

10

【 0 0 1 8 】

本願に係る水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法は、アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液を混合した後に細胞破碎することにより、有機酸環境を通じてアスタキサンチンとアスタキサンチン含有原料に天然に存在するタンパク質、核酸又は多糖成分の相互作用を促進し、自己組織化形態の水溶性アスタキサンチン複合体を形成し、そのうち、これらの天然の成分はアスタキサンチンの外部に包まれることで安定した水溶性を示し、調製されたアスタキサンチン水溶液中のアスタキサンチンは凝集等の現象が発生せず、そして本方法のアスタキサンチンの供給源が天然であり、操作プロセスが簡単であり、設備に対する要求が低く、生産コストが低く、環境に優しく安全であり、有機溶剤の残留がなく、工業化が容易に実現する。

20

【 0 0 1 9 】

そして、本願は食用の食品グレードの有機酸を使用し、最終的に得られるアスタキサンチンに溶剤残留がなく、後続の食品分野、生物医学分野、又は化粧品分野等の分野でのアスタキサンチンの化学的安全性を効果的に確保できる。

【 0 0 2 0 】

好ましくは、前記アスタキサンチン含有原料は、ヘマトコッカス藻、赤色酵母ファフィア、甲殻類動物又はクロレラのいずれか 1 種又は少なくとも 2 種の組合せを含み、そのうち、典型的であるが非限定的な組合せは、ヘマトコッカス藻及び赤色酵母ファフィアの組合せ、ヘマトコッカス藻及びクロレラの組合せ、赤色酵母ファフィア及びクロレラの組合せであり、好ましくはヘマトコッカス藻である。

30

【 0 0 2 1 】

本願に係るアスタキサンチン含有原料は、ヘマトコッカス藻の湿った生物資源から選択されることが好ましい。

【 0 0 2 2 】

好ましくは、ステップ (1) における前記有機酸含有溶液中の有機酸の質量濃度は $0.1 \sim 2.0 \text{ mol/L}$ であり、例えば、 0.1 mol/L 、 0.2 mol/L 、 0.5 mol/L 、 0.8 mol/L 、 1 mol/L 、 1.2 mol/L 、 1.3 mol/L 、 1.5 mol/L 、 1.8 mol/L 又は 2 mol/L 等であってもよい。

【 0 0 2 3 】

好ましくは、前記有機酸含有溶液の pH は $3.0 \sim 6.5$ であり、例えば、 3.0 、 3.2 、 3.5 、 3.8 、 4.0 、 4.2 、 4.5 、 4.8 、 5.0 、 5.2 、 5.5 、 5.8 、 6.0 、 6.2 、 6.3 又は 6.5 等であってもよく、好ましくは $5.0 \sim 6.3$ である。

40

【 0 0 2 4 】

本願に係る有機酸含有溶液の pH は、 $5.0 \sim 6.3$ が好ましく、溶液中のアスタキサンチンと他の天然成分との相互作用をよりよく促進して浸出率を向上させることができる。

【 0 0 2 5 】

好ましくは、前記有機酸はリンゴ酸、酒石酸、グリシン、シュウ酸又はクエン酸のいずれか 1 種又は少なくとも 2 種の組合せを含み、そのうち、典型的であるが非限定的な組合せは、リンゴ酸及び酒石酸の組合せ、リンゴ酸及びグリシンの組合せ、リンゴ酸及びシュウ

50

酸の組合せ、酒石酸及びグリシンの組合せ、グリシン及びクエン酸の組合せであり、好ましくはクエン酸である。

【 0 0 2 6 】

好ましくは、前記有機酸含有溶液は有機酸 pH 緩衝液である。

【 0 0 2 7 】

本願で使用される有機酸含有溶液は、有機酸 pH 緩衝液が好ましく、これは、pH が浸出液中の各物質の等電点に大きな影響を及ぼし、これによりアスタキサンチンと溶液中の天然物質との自己組織化の程度に影響を及ぼし、最終的にアスタキサンチンの抽出率及び耐酸化性に影響を及ぼし、且つ細胞中の細胞液は元々一定の pH 値を持って、pH 緩衝液を使用することで長時間浸出過程における溶液 pH の安定性を効果的に確保し、さらに浸出率を向上させることができるためである。

10

【 0 0 2 8 】

好ましくは、前記有機酸 pH 緩衝液は、リンゴ酸及びリンゴ酸ナトリウム緩衝液、酒石酸及び酒石酸ナトリウム緩衝液、グリシン及び HCl 緩衝液、シュウ酸及びシュウ酸ナトリウム溶液緩衝液、又はクエン酸及びクエン酸ナトリウム緩衝液のいずれか 1 種又は少なくとも 2 種の組合せを含み、そのうち、典型的であるが非限定的な組合せは、リンゴ酸及びリンゴ酸ナトリウム緩衝液とグリシン及び HCl 緩衝液の組合せ、シュウ酸及びシュウ酸ナトリウム溶液緩衝液とクエン酸及びクエン酸ナトリウム緩衝液の組合せ、クエン酸及びクエン酸ナトリウム緩衝液とリンゴ酸及びリンゴ酸ナトリウム緩衝液の組合せ、シュウ酸及びシュウ酸ナトリウム溶液緩衝液とグリシン及び HCl 緩衝液の組合せ、リンゴ酸及びリンゴ酸ナトリウム緩衝液とグリシン及び HCl 緩衝液の組合せであり、好ましくはクエン酸及びクエン酸ナトリウム緩衝液である。

20

【 0 0 2 9 】

好ましくは、前記アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液との比重は 0.1 ~ 1.0 g : 1.0 ~ 4.0 mL であり、例えば、0.1 g : 1.0 mL、2 g : 1.0 mL、5 g : 1.0 mL、1.0 g : 1.0 mL、0.1 g : 2.0 mL、0.5 g : 2.0 mL、1 g : 2.0 mL、5 g : 2.0 mL、1.0 g : 2.0 mL、0.1 g : 3.0 mL、0.5 g : 3.0 mL、1 g : 3.0 mL、2 g : 3.0 mL、5 g : 3.0 mL、1.0 g : 3.0 mL、0.1 g : 4.0 mL、0.5 g : 4.0 mL、1 g : 4.0 mL、2 g : 4.0 mL、5 g : 4.0 mL 又は 1.0 g : 4.0 mL 等であってもよい。

30

【 0 0 3 0 】

好ましくは、ステップ (1) における前記細胞破碎の方法は超音波破壊装置を用いて細胞破碎することを含む。

【 0 0 3 1 】

好ましくは、前記細胞破碎の時間は 30 ~ 60 min であり、例えば、30 min、35 min、40 min、45 min、50 min、55 min 又は 60 min 等であってもよい。

【 0 0 3 2 】

好ましくは、ステップ (1) 及び / 又はステップ (2) に補助剤を加えて浸出を補助する。

【 0 0 3 3 】

本願は、食品用の補助剤を別途に加えることにより、天然アスタキサンチンと原料に天然に存在するタンパク質、核酸、多糖等成分との間の相互作用を実現し、さらに、水溶性アスタキサンチン複合体の組織化を促進し、水溶性アスタキサンチン複合体の抽出率を向上させることができる。

40

【 0 0 3 4 】

好ましくは、前記補助剤はタンパク質、核酸又は多糖のいずれか 1 種又は少なくとも 2 種の組合せを含み、そのうち、典型的であるが非限定的な組合せは、タンパク質及び核酸の組合せ、タンパク質及び多糖の組合せ、核酸及び多糖の組合せである。

【 0 0 3 5 】

好ましくは、ステップ (2) における前記攪拌・浸出の時間は 6 ~ 72 h であり、例え

50

ば、6 h、8 h、10 h、12 h、15 h、20 h、24 h、25 h、30 h、35 h、40 h、45 h、48 h、50 h、60 h又は72 h等であってもよく、好ましくは12～48 hである。

【0036】

好ましくは、前記攪拌・浸出の温度は20～35 であり、例えば、20 、22 、25 、26 、27 、28 、29 、30 、32 、33 又は35 等であってもよい。

【0037】

好ましくは、前記攪拌・浸出は遮光・密閉条件で行われる。

【0038】

好ましくは、ステップ(2)における前記固液分離は遠心分離を含み。

10

【0039】

好ましくは、前記遠心分離の温度は2～5 であり、例えば、2 、3 、4 又は5 等であってもよい。

【0040】

好ましくは、前記遠心分離の時間は30～60 minであり、例えば、30 min、35 min、40 min、45 min、50 min、55 min又は60 min等であってもよい。

【0041】

好ましくは、前記遠心分離の回転速度は7000～9000 r/minであり、例えば、7000 r/min、7500 r/min、7800 r/min、8000 r/min、8200 r/min、8500 r/min、8600 r/min又は9000 r/min等であってもよい。

20

【0042】

好ましくは、前記遠心分離の後にフィルタを用いて遠心分離で得られた上清を濾過し、水溶性アスタキサンチン複合体溶液を得る。

【0043】

好ましくは、前記方法は、ステップ(2)に固液分離で得られたアスタキサンチン含有原料残渣を少なくとも1回再浸出するステップ(3)をさらに含む。

【0044】

本願では、浸出環境が相対的に温和であるため、一度にアスタキサンチンを完全に抽出できず、固液分離した後のアスタキサンチン含有原料残渣に有機酸含有溶液を加えて再抽出し、且つ何度もリサイクルし、全体プロセスの歩留まりを向上させることができる。

30

【0045】

好ましくは、前記再浸出は、前記アスタキサンチン含有原料残渣と有機酸含有溶液を混合して浸出液を得て、ステップ(2)にリサイクルすることを含む。

【0046】

好ましくは、前記再浸出はステップ(1)と同じ及び/又は異なる有機酸含有溶液を使用する。

【0047】

好ましくは、前記再浸出はステップ(1)と同じ有機酸含有溶液を使用してから、ステップ(1)と異なる有機酸含有溶液を使用する。

40

【0048】

本願では、好ましくは、同じ有機酸溶液を用いて浸出し、アスタキサンチンの抽出率が低い場合、この時、溶液中の各物質の濃度はこのpH条件下で既に等電点に達し、異なるpHの有機酸含有溶液を置き換えて再抽出し、抽出率をさらに向上させることができる。

【0049】

本願の好ましい技術案として、前記方法は、

アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液を混合して細胞破碎し、浸出液を得るステップ(1)であって、前記有機酸の質量濃度が0.1～2.0 mol/LでpHが3.0

50

～ 6 . 5 の有機酸 p H 緩衝液は、アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液との比重が 0 . 1 ～ 1 0 g : 1 0 ～ 4 0 m L であるステップ (1) と、

ステップ (1) における前記浸出液を 2 0 ～ 3 5 の遮光・密閉条件で 6 ～ 7 2 時間攪拌・浸出させてから、2 ～ 5 、7 0 0 0 ～ 9 0 0 0 r / m i n で 3 0 ～ 6 0 分間遠心分離した後、フィルタを用いて遠心分離で得られた上清を濾過し、水溶性アスタキサンチン複合体を得るステップ (2) と、

ステップ (2) に固液分離で得られたアスタキサンチン含有原料残渣と有機酸含有溶液を混合して浸出液を得て、ステップ (2) にリサイクルし、少なくとも 1 回再浸出するステップ (3) とを含む。

【 0 0 5 0 】

10

第 2 の態様において、本願は第 1 の態様に記載の水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を用いて製造されたアスタキサンチン水溶液を提供する。

【 0 0 5 1 】

本願に係るアスタキサンチン水溶液は、アスタキサンチンの含有量が比較的高く、且つアスタキサンチンが重合せずに安定であり、良好に保存できる。

【 0 0 5 2 】

第 3 の態様において、本願は第 2 の態様に記載のアスタキサンチン水溶液を用いて凍結乾燥させて調製されたアスタキサンチン凍結乾燥粉を提供する。

【 0 0 5 3 】

本願は、アスタキサンチン水溶液を凍結乾燥させてアスタキサンチン凍結乾燥粉を調製することができ、これは、アスタキサンチンの濃度を向上させる目的を達成するだけでなく、水に再溶解する時の再溶解性効果がよい。

20

【 0 0 5 4 】

従来技術に比べて、本願は少なくとも以下の有益な効果を有する。

(1) 本願に係る水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法は、アスタキサンチンを抽出してから水溶性アスタキサンチン複合体を調製する従来の欠陥を克服し、両者を結合して水溶性アスタキサンチン複合体を 1 つのステップで得て、且つ調製されたアスタキサンチン水溶液中のアスタキサンチンの濃度が 7 2 . 6 6 μ g / m L 以上に達し、初回の抽出率が最大 3 7 . 4 5 w t % 以上に達し、複数回の抽出率は総合して 6 8 . 0 5 w t % 以上に達することができる。

30

(2) 本願に係る水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法は、食品用の安全な有機酸溶液を使用し、溶剤残留がなく、操作が穏やかで工業化生産に適している。

(3) 本願に係るアスタキサンチン水溶液は、溶液性質が安定であり、アスタキサンチン含有量が高く、且つ凍結乾燥後の再溶解効果がよい。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 5 】

【図 1】本願に係る水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法のフロー模式図である。

【図 2】本願の実施例 1 で調製された水溶性アスタキサンチン複合体の透過型電子顕微鏡図である。

【発明を実施するための形態】

40

【 0 0 5 6 】

以下、図面を参照しながら、具体的な実施形態によって本願の技術案をさらに説明する。

【 0 0 5 7 】

以下、本願をさらに詳細に説明するが、下記の実例は本願の簡単な例に過ぎず、本願の請求項の保護範囲を代表又は限定せず、本願の保護範囲は請求項を基準とする。

【 0 0 5 8 】

本願に係る水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法のフロー模式図は図 1 に示すものであり、前記方法は、具体的に、

アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液を混合して細胞破碎し、浸出液を得るステップ (1) と、

50

ステップ(1)における前記浸出液を攪拌・浸出させてから、固液分離した後、水溶性アスタキサンチン複合体を得るステップ(2)と、

ステップ(2)に固液分離で得られたアスタキサンチン含有原料残渣と有機酸含有溶液を混合して浸出液を得て、ステップ(2)にリサイクルし、少なくとも1回再浸出するステップ(3)とを含む。

【0059】

一、実施例

実施例1

本実施例は、水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、
- 20 の冷蔵庫からヘマトコッカス藻(湿った藻)を取り出して解凍し、ヘマトコッカス藻の生物資源1gを量り、濃度が0.1mol/LでpHが6.0のクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液20mLを加えた後、十分に均一に混合し、ヘマトコッカス藻混合液を超音波破碎装置で30分間破碎し、浸出液を得るステップ(1)と、

ステップ(1)における前記浸出液を50mLの茶色の指型ボトル内に移し、磁気攪拌機上に置き、25、遮光・密閉で24時間攪拌・浸出させるステップ(2)と、

ステップ(2)で浸出させた混合液を遠心チューブに移し、遠心機を用いて4、8000rpmの条件で30分間遠心分離し、遠心分離後に上清を孔径3μmの使い捨てフィルタで濾過し、均一で安定したオレンジレッドの半透明状態の濃度が72.66μg/mLの水溶性アスタキサンチン複合体を得るステップ(3)とを含む。

【0060】

本実施例で調製された水溶性アスタキサンチン複合体の形態を分析し、新鮮に調製された水溶性アスタキサンチン複合体1滴を取ってきれいなパラフィン板に滴下し、銅メッシュを液滴の表面に静かに置き、液滴を銅メッシュに浸した。10分後に銅メッシュを取り外し、濾紙で銅メッシュの表面の液体をきれいに拭き取り、その後、液体が付けられた表面の銅メッシュを、正面を上方に向けて置いた。銅メッシュの正面を1%のリタンゲステン酸で10分間染色して乾燥処理させ、透過型電子顕微鏡(JEM-1400透過型電子顕微鏡、日本JEOL社)で視野を調整して現象を観察した。

【0061】

本実施例で調製された水溶性アスタキサンチン複合体の透過型電子顕微鏡図は図2に示すものであり、調製された水溶性アスタキサンチン複合体は、規則的で完全な形状で分散性の良い球形を呈し、且つほとんどのアスタキサンチン粒子の直径が40~100nmの範囲にあり、凝集現象が発生せず、比較的高い安定性を有した。

【0062】

実施例2

本実施例は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、ステップ(1)の「pHが6.0のクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液」を「pHが3.0のクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液」に置き換える以外、すべて実施例1と同じであった。

【0063】

実施例3

本実施例は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、ステップ(1)の「pHが6.0のクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液」を「pHが4.0のクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液」に置き換える以外、すべて実施例1と同じであった。

【0064】

実施例4

本実施例は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、ステップ(1)の「pHが6.0のクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液」を「pHが5.0のクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液」に置き換える以外、すべて実施例1と同じであった。

【 0 0 6 5 】

実施例 5

本実施例は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、ステップ (1) の「クエン酸 / クエン酸ナトリウム緩衝液」を「グリシン / H C l 緩衝液」に置き換える以外、すべて実施例 1 と同じであった。

【 0 0 6 6 】

実施例 6

本実施例は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、実施例 1 のステップ (3) に遠心分離で得られたアスタキサンチン含有原料残渣を用いて 6 回再抽出し、具体的には、

ステップ (3) に遠心分離で得られたアスタキサンチン含有原料残渣と濃度が 0 . 1 m o l / L で p H が 6 . 0 のクエン酸 / クエン酸ナトリウム緩衝液を 1 g : 2 0 m L の比重で混合し、浸出液を得て、ステップ (2) にリサイクルし、6 回の再浸出をリサイクルするステップを含む。

【 0 0 6 7 】

実施例 7

本実施例は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、実施例 1 のステップ (3) に遠心分離で得られたアスタキサンチン含有原料残渣を用いて 1 0 回再抽出し、具体的には、

ステップ (3) に遠心分離で得られたアスタキサンチン含有原料残渣と濃度が 0 . 1 m o l / L で p H が 6 . 0 のクエン酸 / クエン酸ナトリウム緩衝液を 1 g : 2 0 m L の比重で混合し、浸出液を得て、ステップ (2) にリサイクルし、最初の 6 回の再浸出をリサイクルするステップ (4) と、

ステップ (4) に遠心分離で得られたアスタキサンチン含有原料残渣と濃度が 0 . 1 m o l / L で p H が 5 . 0 のクエン酸 / クエン酸ナトリウム緩衝液を 1 g : 2 0 m L の比重で混合し、浸出液を得て、ステップ (2) にリサイクルし、最後の 4 回の再浸出をリサイクルするステップ (5) とを含む。

【 0 0 6 8 】

実施例 8

本実施例は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、
- 2 0 の冷蔵庫からクロレラ (湿った藻) を取り出して解凍し、クロレラの生物資源 1 0 g を量り、濃度が 0 . 1 m o l / L で p H が 3 . 0 のクエン酸 / クエン酸ナトリウム緩衝液 4 0 m L を加えた後、十分に均一に混合し、藻混合液を超音波破碎装置で 6 0 分間破碎し、浸出液を得るステップ (1) と、

ステップ (1) における前記浸出液を 5 0 m L の茶色の指型ボトル内に移し、磁気攪拌機上に置き、3 5 、遮光・密閉で 1 2 時間攪拌・浸出させるステップ (2) と、

ステップ (2) で浸出させた混合液を遠心チューブに移し、遠心機を用いて 3 、7 0 0 0 r p m の条件で 6 0 分間遠心分離し、遠心分離後に上清を孔径 2 . 5 μ m の使い捨てフィルタで濾過し、均一で安定したオレンジレッドの半透明状態の水溶性アスタキサンチン複合体を得るステップ (3) とを含む。

【 0 0 6 9 】

実施例 9

本実施例は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、
- 2 0 の冷蔵庫から赤色酵母ファフィアを取り出して解凍し、赤色酵母ファフィア酵母の生物資源 0 . 5 g を量り、濃度が 0 . 1 5 m o l / L で p H が 6 . 5 のリンゴ酸 / リンゴ酸ナトリウム緩衝液 1 0 m L を加えた後、十分に均一に混合し、藻混合液を超音波破碎装置で 6 0 分間破碎し、浸出液を得るステップ (1) と、

ステップ (1) における前記浸出液を 5 0 m L の茶色の指型ボトル内に移し、磁気攪拌機上に置き、2 0 、遮光・密閉で 4 8 時間攪拌・浸出させるステップ (2) と、

ステップ (2) で浸出させた混合液を遠心チューブに移し、遠心機を用いて 5 、9 0

10

20

30

40

50

0 0 r p mの条件で4 0 分間遠心分離し、遠心分離後に上清を孔径3 μ mの使い捨てフィルタで濾過し、均一で安定したオレンジレッドの半透明状態の水溶性アスタキサンチン複合体を得るステップ(3) とを含む。

【0 0 7 0】

実施例 1 0

本実施例は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、ステップ(1) の「クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液」を「酒石酸/酒石酸ナトリウム緩衝液」に置き換える以外、すべて実施例 1 と同じであった。

【0 0 7 1】

実施例 1 1

本実施例は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、ステップ(1) の「クエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液」を「クエン酸溶液」に置き換える以外、すべて実施例 1 と同じであった。

【0 0 7 2】

実施例 1 2

本実施例は水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法を提供しており、前記方法は、ステップ(5) の最後の4 回の再抽出にA T P合成酵素のβ サブユニット0 . 0 0 1 gを加える以外、すべて実施例 7 と同じであった。

【0 0 7 3】

二、テスト及び結果

1、抽出率

水溶性アスタキサンチン複合体溶液中のアスタキサンチン含有量のテスト方法：メタノールとクロロホルムを用いて水溶性アスタキサンチン複合体からアスタキサンチンを抽出し、1 m Lの水溶性アスタキサンチン複合体を取って有機溶剤で抽出し、1 m Lのメタノールと2 m Lのクロロホルムを順番に加えた。水相がほぼ無色になるまで抽出し、有機相を収集し、窒素で乾燥させてから、メタノールとメチル t e r t - ブチルエーテルをそれぞれ0 . 5 m L (1 / 1、v / v) で、0 . 2 2 μ mの有濾過膜を通過させて分析用のサンプルを収集した。アスタキサンチン標準品(1 m g) をメタノールとメチル t e r t - ブチルエーテルそれぞれ5 m L (1 / 1、v / v) で完全に溶解させた後、0 . 2 2 μ mの有機濾過膜を通過させて分析用のサンプルを収集し、H P L Cでその中のアスタキサンチン含有量を測定した。

【0 0 7 4】

クロマトグラフィーカラム：Y M C - C a r o t e n o i d - C 3 0 クロマトグラフィーカラム(4 . 6 m m × 2 5 0 m m、5 μ m) ；移動相：Aはメタノールで、Bはメチル t e r t - ブチルエーテルである；線形勾配で溶出：0 ~ 1 5 m i n、Bは1 0 % ；1 5 ~ 2 5 m i n、Bは1 0 % から6 0 % に上昇；2 5 ~ 3 5 m i n、Bは6 0 % から1 0 % に下降；流速：1 m L / m i n ；D A D検出波長：4 7 6 n m ；カラムオープン温度：3 5 ；サンプル注入量：2 0 μ L。式(1) に従って、1 m Lの水溶性アスタキサンチン複合体中のアスタキサンチンの含有量を計算した。

【数 1】

$$\mu_g = \frac{S_1 \times m \times A}{S_2} \quad (1)$$

式(1) 中、 μ_g ：1 m Lの水溶性アスタキサンチン複合体中のアスタキサンチンの質量； S_1 ：水溶性アスタキサンチン複合体中のアスタキサンチンのピーク面積； S_2 ：アスタキサンチン標準品のピーク面積； m ：2 0 μ Lのアスタキサンチン標準溶液中のアスタキサンチンの質量、2 m gであり、 A ：換算係数、5 0である。

【 0 0 7 5 】

抽出率の計算：上記実験方法に従ってアスタキサンチン含有原料から合計アスタキサンチンを抽出し、原料のアスタキサンチンの合計含有量を得て、式（ 2 ）に従ってアスタキサンチン抽出率を計算した。

【 数 2 】

$$\text{抽出率\%} = \frac{\text{水溶性アスタキサンチン中のアスタキサンチンの含有量}}{\text{アスタキサンチン含有原料中のアスタキサンチンの合計含有量}} \times 100\% \quad (2)$$

10

【 0 0 7 6 】

上記方法に従って実施例 1 ～ 4 におけるアスタキサンチンの抽出率を計算し、表 1 に示した。

【 0 0 7 7 】

【 表 1 】

実施例	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5
抽出率 (w t %)	3 7 . 4 5 ± 0 . 8 7	3 . 9 3 ± 0 . 3 4	1 4 . 1 7 ± 1 . 2 2	2 4 . 1 3 ± 1 . 4 1	1 . 4 4 ± 0 . 2 5

20

【 0 0 7 8 】

上記方法に従って実施例 6 における 6 回の再抽出の抽出率を計算し、実施例 1 における初回の抽出及び実施例 6 における 6 回の再抽出の結果を表 2 に示した。

【 0 0 7 9 】

【 表 2 】

抽出回数	抽出率 (w t %)
初回抽出	3 7 . 4 5 ± 0 . 8 7
第 1 回再抽出	1 1 . 6 6 ± 0 . 9 8
第 2 回再抽出	8 . 1 1 ± 0 . 5 5
第 3 回再抽出	3 . 7 1 ± 1 . 2 9
第 4 回再抽出	1 . 8 9 ± 0 . 4 9
第 5 回再抽出	0 . 5 2 ± 0 . 2 2
第 6 回再抽出	0 . 5 4 ± 0 . 1 7

40

【 0 0 8 0 】

上記方法に従って実施例 7 における最後の 4 回の再抽出の抽出率を計算し、再抽出の結果を表 3 に示した。

【 0 0 8 1 】

50

【表 3】

抽出回数	実施例 7 抽出率 (w t %)
第 7 回再抽出	1. 6 7 ± 0. 4 4
第 8 回再抽出	1. 3 1 ± 0. 3 7
第 9 回再抽出	0. 6 1 ± 0. 2 4
第 1 0 回再抽出	0. 5 8 ± 0. 1 1

10

【 0 0 8 2 】

2、耐酸化性

耐酸化性分析方法：A B T S⁺フリーラジカル消去率によって水溶性アスタキサンチン複合体の耐酸化能力を測定した。2. 6 m m o l / L の過硫酸カリウム溶液と 7. 4 m m o l / L の A B T S 溶液を茶色の指型ボトルに等量混合し、室温・遮光で 1 2 時間反応させて、作業溶液を得た。一晩静置した A B T S⁺溶液を無水エタノールで希釈して、7 3 4 n m の吸光度を 0. 7 0 0 ± 0. 2 0 にすると、使用可能となった。

【 0 0 8 3 】

9 6 孔板に 1 0 μ L の水溶性アスタキサンチン複合体を取り、2 0 0 μ L の希釈後の A B T S⁺溶液を加え、十分に混合して均一に揺動し、室温・遮光で 1 時間反応させ、マイクロプレートリーダーを用いて 7 3 4 n m の波長で吸光度を測定し、吸光度値を A 1 に記録した。1 0 μ L の水溶性アスタキサンチン複合体を取って 2 0 0 μ L の無水エタノールと十分に混合し、常温・遮光で 1 時間反応させ、マイクロプレートリーダーを用いて 7 3 4 n m の波長で吸光度を測定し、吸光度値を A 2 に記録した。1 0 μ L の無水エタノールと 2 0 0 μ L A B T S⁺溶液を取って十分に混合し、常温・遮光で 1 時間反応させ、マイクロプレートリーダーを用いて 7 3 4 n m の波長で吸光度を測定し、吸光度値を A 0 に記録した。

20

【 0 0 8 4 】

上記のステップを 3 回繰り返してデータをそれぞれ記録し、水溶性アスタキサンチン複合体の A B T S⁺フリーラジカルに対する消去率を式 (3) に従って計算した。

30

【数 3】

$$\text{消去率}\% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式 (3) 中、A 1：サンプルと A B T S⁺フリーラジカルとを反応させた後の吸光度値；
A 2：サンプル自身の吸光度値；A 0：空白グループの吸光度値。

40

【 0 0 8 5 】

上記方法に従って実施例 1 ～ 5 における水溶性アスタキサンチン複合体の耐酸化性を計算し、A B T S⁺フリーラジカル消去率で表示した結果を表 4 に示した。

【 0 0 8 6 】

50

【表 4】

実施例	消去率 (w t %)
実施例 1	82.99 ± 2.67
実施例 2	32.51 ± 1.98
実施例 3	50.48 ± 2.34
実施例 4	68.89 ± 2.55
実施例 5	25.32 ± 1.56

10

【0087】

表 1 及び表 4 から、以下の点が分かった。

(1) 実施例 1 ~ 4 から分かるように、クエン酸 / クエン酸ナトリウム緩衝系で水溶性アスタキサンチン複合体を調製する効果は、系の pH に関連し、pH が 3.0 ~ 6.0 の範囲内のアスタキサンチンの抽出率は pH の増加につれて増加し、且つそれにより得られた水溶性アスタキサンチン複合体の耐酸化性は pH の増加につれて増加し、pH が 5.0 ~ 6.0 のときに、水溶性アスタキサンチン複合体の調製効果が良好であり、アスタキサンチン抽出率は最大 37.45 % に達し、耐酸化性は A B T S⁺フリーラジカル消去率で最大 82.99 w t % 以上に達することができた。

20

(2) 実施例 1 及び実施例 5 から分かるように、実施例 5 ではグリシン / H C l 緩衝液を使用することに対して、実施例 1 ではクエン酸 / クエン酸ナトリウム緩衝系を使用し、実施例 1 における抽出率は 37.45 w t % であり、A B T S⁺フリーラジカル消去率は 82.99 w t % であることに對して、実施例 5 における抽出率はわずかに 1.44 w t % であり、A B T S⁺フリーラジカル消去率はわずかに 25.32 w t % であり、これにより、本願は特定の緩衝溶液系を選択することにより、水溶性アスタキサンチン複合体の抽出率及び耐酸化性を向上させることを示した。

【0088】

表 2 及び表 3 から分かるように、浸出・抽出した後のアスタキサンチン原料残渣に依然としてアスタキサンチンを含有し、複数回の抽出で全体プロセスの抽出率を向上させることができ、且つ同じ pH の緩衝液を用いて複数回浸出・抽出した後にアスタキサンチンの抽出率はますます低減し、この時、pH 緩衝液の配合比又は pH を変えると、浸出・抽出の抽出率を再度向上させ、浸出・抽出条件が穏やかで過度の操作が不要であるため、複数回の浸出・抽出で抽出率を向上させることは、工業化生産に非常に容易であり、その中、実施例 7 で 10 回の再抽出した後に全体の抽出率は 68.05 w t % に達し、比較的高い工業使用価値を持っていた。

30

【0089】

そして、実施例 8 ~ 9 では、実施例 1 と類似する抽出効果を取得でき、同様に、1 つのステップで水溶性アスタキサンチン複合体を調製でき、ここで省略する。

40

【0090】

実施例 1 ではクエン酸 / クエン酸ナトリウム緩衝液を使用することに対して、実施例 10 では酒石酸 / 酒石酸ナトリウム緩衝液を使用し、抽出率及び調製された水溶性アスタキサンチン複合体の耐酸化性は実施例 1 よりも劣り、それに対して本願ではリンゴ酸 / リンゴ酸ナトリウム系を使用してアスタキサンチンを抽出する時の効果は両者間に介在し、比較的良好な抽出率及び耐酸化性を取得できた。

【0091】

実施例 11 では、pH 緩衝液系ではなく、クエン酸溶液を使用したため、抽出過程では pH の安定を保証することが困難であり、クエン酸 / クエン酸ナトリウム緩衝液を使用することに対して、抽出率が下降した。

50

【 0 0 9 2 】

実施例 1 2 では、再抽出過程にタンパク質を追加することにより、溶液中のアスタキサンチンの組織化を促進し、アスタキサンチンの抽出率を向上させた。

【 0 0 9 3 】

要するに、本願に係る水溶性アスタキサンチン複合体の調製方法は、アスタキサンチン含有原料と有機酸含有溶液を混合した後に細胞破碎してから浸出することにより、天然アスタキサンチンと原料に天然に存在するタンパク質、核酸又は多糖等の成分との間の相互作用を実現することができ、その初回の抽出率は 1 . 4 4 w t % 以上であり、初回の抽出率は最大 3 7 . 4 5 w t % 以上に達し、複数回の抽出率は総合して 6 8 . 0 5 w t % に達することができ、そして、1つのステップで溶剤残留なしに水溶性アスタキサンチン複合体を得ることができ、アスタキサンチンの供給源が天然であり、操作プロセスが簡単であり、工業化が容易に実現する。

10

【 0 0 9 4 】

本願は、上記実施例によって本願の詳細な構造特徴を説明したが、本願は上記の詳細な構造特徴に限定されず、即ち、本願は上記の詳細な構造特徴に依拠しか実施できないことを意味しないことを本出願人より声明する。当業者にとって、本願に対する任意の改善、本願で選択される部材の等価置換及び補助部材の添加、具体的な手段の選択等は、すべて本願の保護範囲及び開示範囲内にあることが明らかである。

20

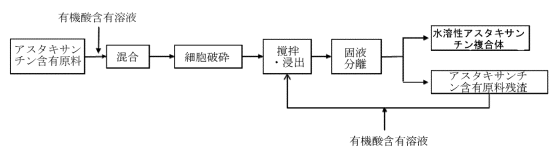
30

40

50

【図面】

【図 1】



【図 2】

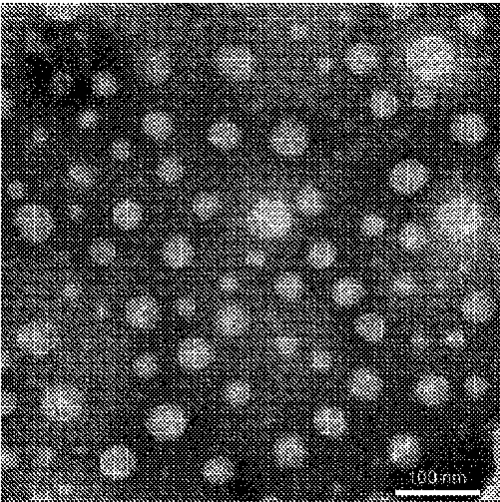


图 2

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 毛 相朝

中華人民共和国 266100, 山東省青島市松嶺路238号

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 特開2010-172293(JP, A)

特開平06-264055(JP, A)

特開2012-031067(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C09B 61/00

C09B 67/54

C09B 67/44

C12P 23/00

CAplus/REGISTRY(STN)