

(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
2017年11月2日(02.11.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/187672 A1

- (51) 国際特許分類:
C08B 37/08 (2006.01) *C07B 61/00* (2006.01)
C07H 5/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/001740
- (22) 国際出願日: 2017年1月19日(19.01.2017)
- (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 2016-089270 2016年4月27日(27.04.2016) JP
- (71) 出願人: 昭和電工株式会社(SHOWA DENKO K. K.) [JP/JP]; 〒1058518 東京都港区芝大門一丁目13番9号 Tokyo (JP). 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 藤田 一郎(FUJITA Ichiro); 〒1058518 東京都港区芝大門一丁目13番9号 昭和電工株式会社内 Tokyo (JP). 福岡 淳(FUKUOKA Atsushi); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 小林 広和(KOBAYASHI Hirokazu); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 大家 邦久, 外(OHIE Kunihisa et al.); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町二

丁目14番6号 セルバ人形町6階 大家特許事務所 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, 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:** METHODS FOR PRODUCING CHITIN OLIGOMER, N-ACETYLGLUCOSAMINE, AND 1-O-ALKYL-N-ACETYLGLUCOSAMINE

(54) 発明の名称: キチンオリゴマー、N-アセチルグルコサミン及び1-オ-アルキル-N-アセチルグルコサミンの製造方法

(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for producing a chitin oligomer (method 1) characterized in that a chitin-containing biomass is partially hydrolyzed while pulverizing using a pulverizer in the presence of water and an acid catalyst selected from phosphoric acid, nitrous acid, and organic acids, a method for producing N-acetylglucosamine (method 2) characterized in that water is added to the chitin oligomer obtained by method 1, and the result is heated and hydrolyzed, and a method for producing 1-O-alkyl-N-acetylglucosamine (method 3) characterized in that an alcohol is added to the chitin biomass, and the result is alcoholized.

(57) 要約: 本発明はキチン含有バイオマス、リン酸、亜硝酸及び有機酸から選択される酸触媒と水の共存下で粉碎装置を用い粉碎しながら部分加水分解することを特徴とするキチンオリゴマーの製造方法(方法1)、方法1により得られたキチンオリゴマーに水を加えて加熱し加水分解することを特徴とするN-アセチルグルコサミンの製造方法(方法2)、及びキチンオリゴマーにアルコールを加えて加アルコール分解することを特徴とする1-オ-アルキル-N-アセチルグルコサミンの製造方法(方法3)に関する。

WO 2017/187672 A1

明 細 書

発明の名称：

キチンオリゴマー、N－アセチルグルコサミン及び1－O－アルキル－N－アセチルグルコサミンの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、環境負荷と取扱い上の危険度が低い触媒を用いたキチンの加水分解反応により、キチン含有バイオマスからキチンオリゴマー、N－アセチルグルコサミン（NAG）及び1－O－アルキル－N－アセチルグルコサミンを製造する方法に関する。

背景技術

[0002] キチンは、NAGが β -1, 4-グリコシド結合した含窒素多糖高分子であり、エビ、カニなどの甲殻類、昆虫類、キノコなどの真菌に含まれる、自然界に豊富に存在するバイオマスである。

[0003] キチンの加水分解生成物や加アルコール分解生成物などの加溶媒分解生成物には、様々な効果効能を有し各種機能素材として利用できるものがある。

例えば、加水分解生成物であるNAGが2～7個程度重合したキチンオリゴマーは、NAG取得のための前駆体として有用な成分であることに加え、抗腫瘍、免疫賦活、抗菌の作用（Trend Food Sci. Technol., 1999, 10, 37-51；非特許文献1）や、ビフィズス菌増殖による腸内環境調整作用、植物生体防御機構活性化作用であるエリシター活性が報告されており、医薬用素材、機能性食品、農業資材としても注目されている。特に近年の研究では、キチンオリゴマーに植物生体防御機構活性化作用であるエリシター活性が認められており、農業資材としての活用が望まれている。しかし、加水分解生成物に硫酸根等が残留している場合、農業資材とするためには精製が必要となる。そのため、長期にわたり耕地に散布しても悪影響が生じない素材が求められている。

[0004] また、加水分解生成物の単量体であるNAGは、体内に取り込まれること

によりヒアルロン酸などのムコ多糖類の生合成を促進して、ひざ・関節痛の改善や美肌・保湿などの効果が認められる成分であり、同様の効果を示すグルコサミンより苦みがなく、利用効率が高いことから、近年、機能性食品、医薬関連原料、美容関連原料としての利用が期待されている。

[0005] さらに、加メタノール分解生成物であり、NAG誘導体である1-O-メチル-N-アセチルグルコサミン（以下、MeNAGと略記することがある。）は、血球凝集を阻害することによるインフルエンザ及びがんの抑制効果を有していることから医薬品原料として注目されており（Arch. Biochem. Biophys., 1987, 259, 79-88；非特許文献2、J. Biol. Chem., 1989, 264, 173-177；非特許文献3）、さらに有機触媒（J. Org. Chem., 2012, 6390-6406；非特許文献4）、リガンド（J. Org. Chem., 1997, 62, 6012-6028；非特許文献5）、ゲル化剤（Tetrahedron, 2010, 66, 962-5971；非特許文献6）などへの用途展開の可能性が示されている物質である。

[0006] 酸を用いる、キチンからのキチンオリゴマーやNAGの製造方法としては、キチンに濃塩酸を用いて40℃前後の加熱条件で3～4時間の反応を行い部分加水分解してオリゴマーを生成させ、引き続き後工程を行う方法が開発されている（特公平5-33037号公報；特許文献1、特開2009-167140号公報；特許文献2、特許5426099号公報；特許文献3）。特許文献1及び2では、後工程に酵素反応を導入し、特許文献3では後工程に冷却晶析を導入してNAGの生成している。しかしながら、これらの方法は、酸触媒のモル数に対する、基質であるキチン中のN-アセチルグルコサミン単位（ $C_8H_{13}NO_5$ ）のモル数の比（以下、S/C比と略記する。）が0.08～0.14であって、基質に対して大量の濃塩酸が使用されている上、製造されるオリゴマーやNAGのキチンに対する収率が低いという問題がある。また別の酸では、硫酸を用いて0～50℃で5分～2時間の処理をする方法も開発されている（特開2002-88093；特許文献4）が、この方法もS/Cは0.05～0.5であり大量の硫酸を使用している。

このように現在開発されている酸を用いる製造方法は、いずれも取扱いに

くい強酸を大量に用いるため、環境負荷とコストがかかるという問題がある。

[0007] 一方、酸を用いず、キチンに対してキチン分解酵素生産能を有する微生物を利用する方法が提案されている（特開2004-41035号公報；特許文献5、特開2008-253252号公報；特許文献6）。しかし、これらの方法は、4～5日の長時間を要し、キチンの分解効率も低く、生産性が低いという問題を抱えている。

[0008] また、MeNAGは、特許文献1～3に記載の通り、塩酸でキチンを部分加水分解して作成したキチンオリゴマーに、メタノールを加えて加熱する加メタノール分解法により製造されているが、この場合も大量の酸を使用する問題がある。

[0009] 以上のことから、取扱い易い酸を少ない使用量で用いる環境負荷の低い、キチンオリゴマー、N-アセチルグルコサミン及び1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンの効率的な製造方法の確立が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特公平5-33037号公報

特許文献2：特開2009-167140号公報

特許文献3：特許5426099号公報

特許文献4：特開2002-88093公報

特許文献5：特開2004-41035号公報

特許文献6：特開2008-253252号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Trend Food Sci. Technol. , 1999 , 10, 37-51

非特許文献2：Arch. Biochem. Biophys. , 1987, 259, 79-88

非特許文献3：J. Biol. Chem. , 1989, 264, 173-17

7

非特許文献4: J. Org. Chem., 2012, 6390-6406

非特許文献5: J. Org. Chem., 1997, 62, 6012-602

8

非特許文献6: Tetrahedron, 2010, 66, , 962-597

1

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の目的は、取扱い易い酸触媒を従来法に比べて少量用いたキチン含有バイオマスの加水分解反応による、キチンオリゴマー、N-アセチルグルコサミン及び1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンの製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、酸触媒を用いるキチン含有バイオマスの加水分解反応において、酸触媒を取扱い上の危険度が低い酸にして、従来法に比べて少ない量で使用し、水の存在下でキチン含有バイオマスを物理的に粉砕することにより部分加水分解してキチンオリゴマーを製造できることを見出した。また、このキチンオリゴマーに水を加えて加熱し、加水分解することによりN-アセチルグルコサミンを製造できること、さらに、キチンオリゴマーにアルコールを加えて加熱し、加アルコール分解することにより、1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンを製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0014] すなわち、本発明は以下の[1]～[9]のキチンオリゴマーの製造方法、[10]～[11]のN-アセチルグルコサミンの製造方法、及び[12]～[15]の1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンの製造方法に関する。

[1] キチン含有バイオマスを、リン酸、亜硝酸及び有機酸から選択される酸触媒と水の共存下で粉砕装置を用い粉砕しながら部分加水分解すること

を特徴とするキチンオリゴマーの製造方法。

[2] 前記酸触媒がリン酸である前項1に記載のキチンオリゴマーの製造方法。

[3] 前記酸触媒のモル数(C)に対するキチン中のN-アセチルグルコサミン単位($C_8H_{13}NO_5$)のモル数(S)の比(S/C)が0.2~20である前項2に記載のキチンオリゴマーの製造方法。

[4] 予め酸触媒を含浸させたキチン含有バイオマス水を水の存在下で粉砕する前項1~3のいずれかに記載のキチンオリゴマーの製造方法。

[5] 酸触媒を溶解した溶媒とキチン含有バイオマスを混合し、その後溶媒を除去して酸触媒をキチン含有バイオマスに含浸させ、得られた酸触媒を含浸させたキチン含有バイオマスを水の存在下で粉砕する前項4に記載のキチンオリゴマーの製造方法。

[6] 前記溶媒が、キチン含有バイオマスを変性させず、酸触媒活性を阻害せず、かつ加熱あるいは蒸留で除去できるものである前項5に記載のキチンオリゴマーの製造方法。

[7] 前記溶媒が、水、ジエチルエーテル、ヘキサン、及びベンゼンから選択される前項6に記載のキチンオリゴマーの製造方法。

[8] 粉砕装置がボールミルである前項1~7のいずれかに記載のキチンオリゴマーの製造方法。

[9] ボールミルが、遊星ボールミルまたは転動ボールミルである前項8に記載のキチンオリゴマーの製造方法。

[10] 前項1~9のいずれかに記載の方法により得られたキチンオリゴマーに水を加えて加熱し加水分解することを特徴とするN-アセチルグルコサミンの製造方法。

[11] 加熱温度が100~260℃である請求項10に記載のN-アセチルグルコサミンの製造方法。

[12] 前項1~9のいずれかに記載の方法により得られたキチンオリゴマーにアルコールを加えて加アルコール分解することを特徴とする1-0-

アルキル-N-アセチルグルコサミンの製造方法。

[13] アルコールが1価アルコールである前項12に記載の1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンの製造方法。

[14] 前記アルコールがメタノールであり、前記1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンが1-O-メチル-N-アセチルグルコサミンである前項12または13に記載の1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンの製造方法。

[15] 加熱温度が120～280℃である前項12～14のいずれかに記載の1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンの製造方法。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、キチン含有バイオマスから、環境負荷の低い酸触媒を用いてキチンオリゴマー、N-アセチルグルコサミン及び1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンを低コストで製造することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]酸触媒と物理的な力の相乗効果によるキチンのグリコシド結合のみの切断を示す図である。

[図2]反応温度190℃で実施したキチンオリゴマーの加水分解反応（実施例5）の温度プロファイルを示す。

[図3]本発明によるキチンからの、キチンオリゴマー、N-アセチルグルコサミン、及び1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンの合成のスキームを示す。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明方法の実施形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は本発明の代表的な例を示したものであり、本発明はそれらに限定されるものではない。

[0018] キチン含有バイオマス（固体基質）：

バイオマスとは一般的には「再生可能な生物由来の有機性資源で化石資源を除いたもの」を指すが、本発明で使用する「キチン含有バイオマス」（以

下、固体基質ということがある。)は、例えば、エビ、カニなどの甲殻類、節足動物、昆虫類、イカ、貝、沖アミなどの殻や表皮、キノコなどの菌類の細胞壁など主にキチンを含むバイオマスである。

[0019] キチン含有バイオマスは、精製処理してあるものでも、精製処理してないものでも用いることができる。精製処理してあるものとしては、アルカリによるタンパク質の溶解、酸によるカルシウムの溶解などの処理をした後に、中和、固液分離、水洗などの処理をしてタンパク質やカルシウムなどの不純物の除去を行い、キチンを含有するものが挙げられる。さらに、工業的に調製したキチンなどでもよい。

キチン含有バイオマスは、不純物として原料由来のタンパク質、リン酸、鉄、銅、亜鉛、モリブデン、珪素、アルミニウム、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウムなどを含有するものでもかまわない。

[0020] キチン含有バイオマスの形態は、乾体でも湿体でもかまわず、結晶性でも非結晶性でもかまわない。キチン含有バイオマスは反応に先立ち粗粉碎することが望ましい。粗粉碎により触媒との接触性が増加して、加水分解反応が促進される。したがって、キチン含有バイオマスの形状・大きさは、粉碎するのに適していることが好ましい。そのような形状・大きさとしては、例えば粒径が20～1000 μm の粉体状が挙げられる。

[0021] 粗粉碎処理は、例えば、シュレッダー、ジョークラッシャー、ジャイレトリクラッシャー、コーンクラッシャー、ハンマークラッシャー、ロールクラッシャー、及びロールミルなどの粗粉碎機、スタンプミル、エッジランナ、切断・せん断ミル、ロッドミル、自生粉碎機及びローラミルなどの中粉碎機を用いて実施することができる。粉碎処理時間は、処理後原料が均一に微粉化されればよく、特に限定されるものではない。

[0022] 酸触媒：

本発明において用いる酸触媒は、キチンを加水分解できる触媒であれば特に限定されるものではなく、例えば、主成分であるキチンの主鎖を形成している β -1,4グリコシド結合を加水分解する活性を有する触媒が好ましい

。

[0023] 酸触媒としては、環境負荷と取扱い上の安全性の観点からリン酸及び／または有機酸を用いることが好ましく、例えば、リン酸、亜硝酸などの無機酸や、ギ酸、酢酸、シュウ酸、プロピオン酸、クエン酸、コハク酸などの有機酸を用いることができる。また、これらを併用することも可能である。さらに酸触媒によるキチン含有バイオマスの加水分解速度を高めることができること、分解産物と一緒に農業資材として使うことができることから、リン酸、酢酸、クエン酸、亜硝酸がより好ましく、植物の栄養源となるリン酸が最も好ましい。

[0024] 本発明は、図3のスキームに示すように、固体基質中のキチンを部分加水分解してキチンオリゴマーを製造する方法（方法1）、方法1で製造したキチンオリゴマーを水中で加水分解してN-アセチルグルコサミンを製造する方法（方法2）、及び方法1で製造したキチンオリゴマーをアルコール溶媒中で加水アルコール分解して1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンを製造する方法（方法3）からなる。以下、各方法を説明する。

[0025] 方法1（部分加水分解反応）：

固体基質の部分加水分解は、基質に酸触媒を含浸させた後、粉砕による機械応力を掛けることにより行う。なお部分加水分解とは、キチンの解重合生成物の大部分が水溶性のオリゴマー単位に留まり、モノマー単位まで達する解重合が少ない加水分解反応のことを言う。

[0026] キチンは、NAGのポリマー主鎖を形成する β -1, 4グリコシド結合と、C2位に側鎖を形成しているアセトアミド基（ $-\text{NHCOCH}_3$ ）のアミド結合の2つの加水分解対象となる結合を有するが、本発明の目的化合物はいずれも、側鎖のアセトアミド基を有するものであるため、主鎖の β -1, 4グリコシド結合が選択的に加水分解されることが重要である。

[0027] 酸触媒（C）と固体基質（S）の比率は、特に限定されるものではないが、反応時の部分加水分解効率、反応後の基質残渣低減の観点から、S/Cのモル比が0.2～20で行うことができ、0.5～15が好ましく、1～1

Oがより好ましい。

[0028] 固体基質への酸触媒の含浸方法は、それぞれを直接混合して行うことができる。また酸触媒を溶解した溶媒と基質を混合したのち、溶媒を蒸留や加熱することにより除去することもできる。使用する溶媒は、基質を変性せず、酸触媒活性を阻害も失活もせず、不揮発性でない（すなわち、加熱・蒸留で除去できる）ものであれば特に限定されない。例えば、水、ジエチルエーテル、ヘキサン、ベンゼンなどが適当である。

[0029] 部分加水分解時の水分は、酸触媒を含浸した固体基質に物理吸着した水分が1～3質量％程度あれば十分に部分加水分解を賄えるので、通常は水を添加しなくても問題ないが、水を添加することもできる。

酸触媒を含浸した固体基質を粉砕することにより、部分加水分解を実現することができる。ここで粉砕により固体基質が微粉化されることによる効果としては、含浸した酸触媒のより均一な拡散、比表面積増大に伴う物理応力の伝達効率の向上、キチンのアモルファス化による固体基質の加水分解性の向上が考えられる。

[0030] 粉砕処理に用いる装置としては、ポットミル、チューブミル、コニカルミルなどの転動ボールミル、旋回流型ジェットミル、衝突タイプジェットミル、流動層型ジェットミル、湿式タイプジェットミルなどのジェット粉砕機、らいかい機（擂潰機）、オングミルなどのせん断ミル、乳鉢、石うすなどのコロイドミル、ハンマーミル、ケージミル、ピンミル、ディスインテグレータ、スクリーンミル、ターボ型ミル、遠心分級ミルなどの衝撃式粉砕機、さらには自転及び公転の運動を採用した種類の粉砕機である遊星ボールミルなどが挙げられる。

本発明の目的である、主鎖のグリコシド結合の選択的な加水分解の実現の観点からは、用いる粉砕装置は、固体基質に圧縮力が強く加わり、主鎖の両方向に引っ張り応力が加えられるボールミルが好ましく、遊星ボールミル、転動ボールミルがより好ましく、遊星ボールミルが最も好ましい。

[0031] 粉砕処理の温度は、側鎖のアセトアミド基を脱離させずに、主鎖の β -1

、4 グリコシド結合を選択的に加水分解できれば、特に限定されるものではないが、常温～100℃が好ましい。より好ましくは45～90℃、さらに好ましくは60～80℃である。

粉碎処理の時間は、固体基質の部分加水分解が進み、水溶性になるのであれば、特に限定されるものではない。処理終点を見極めるために、経時的に取得したサンプルの水溶性を確認することが好ましい。

[0032] 部分加水分解（方法1）で得られた反応生成物は、引き続き、後述の加水分解を行う方法2や加アルコール分解を行う方法3の原料として使用できる他、中和や脱塩などの精製処理を行いキチンオリゴマーとして使用することもできる。

[0033] 方法2（加水分解反応）及び方法3（加アルコール分解反応）：

方法2の加水分解反応、及び方法3の加アルコール分解反応では、いずれも方法1の部分加水分解で得られた反応生成物を原料として用いることができる。実際には、原料を溶媒（水またはアルコール）に溶解した後、加熱して反応を行う。方法2では溶媒に水を使用し、キチンオリゴマーからNAGが製造される。方法3では溶媒にアルコールを使用し、キチンオリゴマーからNAG誘導体である1-O-アルキル-N-アセチルグルコサミンが製造される。

方法3で使用する溶媒には、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、2-メチル-1-プロパノール、2-メチル-2-プロパノールなどの1価アルコールが好ましい。原料を溶解させて反応の効率や均一性を得るという観点から、溶媒は、メタノール、エタノールがより好ましく、メタノールが最も好ましい。

[0034] 反応は、通常は、原料と溶媒の存在下、常圧で密閉した容器中で行う。例えば、溶媒が水の場合、水蒸気分圧が0.1 MPa以上の加圧状態となる温度で行う。加圧状態となる加熱温度は、方法2の加水分解反応は、好ましくは100～260℃、より好ましくは130～230℃、さらに好ましくは150～210℃である。また、方法3の加アルコール分解反応は、好まし

くは120～280℃、より好ましくは150～250℃、さらに好ましくは170～230℃である。なお、加熱温度は反応時の溶液の温度である。当該範囲とすることで、目的生成物の製造収率を高めることができる。本発明の製造方法における反応は、通常はオートクレーブなどの密閉容器内で実施されるため、加熱開始時は常圧であっても、上記温度で反応系が加熱されると加圧状態となる。

[0035] さらに、反応前または反応中に密閉容器内を加圧し、反応することもできる。加圧する圧力は、例えば0.1～30MPa、好ましくは1～20MPa、さらに好ましくは2～10MPaである。

[0036] 反応における加熱では、室温から反応温度に到達する時間は、好ましくは5～60分、より好ましくは5～30分、さらに好ましくは5～20分である。反応温度までに到達すると同時に、加熱を止めて冷却することが好ましい。このようにすることで、NAGの製造収率を高めることができる。

[0037] 分解に用いる水の量（原料1質量部に対する質量比）は、少なくともバイオマスのキチンオリゴマーを全量加溶媒分解できる量であるが、反応混合物の流動性や攪拌性を考慮して、好ましくは1～500質量部、より好ましくは2～350質量部、さらに好ましくは2～200質量部である。当該範囲とすることにより、分解反応において高い生成物収率と生成物濃度を両立できる。

[0038] 反応は反応混合物を攪拌しながら行うことが好ましい。反応形式は、バッチ式または連続式などのいずれでもよい。

実施例

[0039] 以下、実施例及び比較例を挙げて本発明をさらに説明するが、本発明はこれらの記載により限定されるものではない。

[0040] [使用原料]

カニ殻を乾燥、粉碎し、高温の希水酸化ナトリウム水溶液と室温の希塩酸水溶液にそれぞれ数時間浸漬することにより、タンパク質、炭酸カルシウムを除去して精製したキチンを用いた。

[0041] [キチンの部分加水分解反応（方法１）]

比較例１：未処理キチン

精製したキチン（平均粒径 $73\ \mu\text{m}$ ）をそのまま用いた。このサンプルを未処理キチンとする。

[0042] 比較例２：リン酸含浸キチン１

未処理キチン（平均粒径 $73\ \mu\text{m}$ ） $10\ \text{g}$ （NAG単位として $49.2\ \text{mmol}$ ）をリン酸 $2.4\ \text{g}$ （ $24.6\ \text{mmol}$ 、S/C比 2.0 ）を含む水 $30\ \text{mL}$ に分散させた後、減圧を乾燥して、含水率 2.5 質量％の粉末を得た。このサンプルをリン酸含浸キチン１とする。

[0043] 比較例３：リン酸含浸キチン２

未処理キチン（平均粒径 $73\ \mu\text{m}$ ） $10\ \text{g}$ （NAG単位として $49.2\ \text{mmol}$ ）をリン酸の量を $4.8\ \text{g}$ （ $49.2\ \text{mmol}$ 、S/C比 1.0 ）を含む水 $30\ \text{mL}$ に分散させた後、減圧を乾燥して、含水率 4.5 質量％の粉末を得た。このサンプルをリン酸含浸キチン２とする。

[0044] 比較例４：キチン粉砕物

未処理キチン（平均粒径 $73\ \mu\text{m}$ ） $5.0\ \text{g}$ を直径 $5\ \text{mm}$ のアルミナボール $100\ \text{g}$ と共に容量 $250\ \text{mL}$ のアルミナポットに入れた。このポットを遊星ボールミル（フリッチュ社製、PULVERISETTE（登録商標）6）にセットして $500\ \text{rpm}$ で連続 6 時間処理した。その結果、 4.2 質量％の物理吸着水を含有する粉末を得た。このサンプルをキチン粉砕物（平均粒径 $42\ \mu\text{m}$ ）とする。

[0045] 実施例１：リン酸含浸キチン粉砕物１

$5\ \text{g}$ の硫酸含浸キチン１を、直径 $5\ \text{mm}$ のアルミナボール $100\ \text{g}$ と共に容量 $250\ \text{mL}$ のアルミナポットに入れた。このポットを遊星ボールミル（フリッチュ社製、PULVERISETTE 6）にセットして $500\ \text{rpm}$ で連続 6 時間処理した。その結果、 3.1 質量％の物理吸着水を含有する粉末を得た。このサンプルをリン酸含浸キチン粉砕物１とする。

[0046] 実施例２：リン酸含浸キチン粉砕物２

5 g の硫酸含浸キチン 2 を、直径 5 mm のアルミナボール 100 g と共に容量 250 mL のアルミナポットに入れた。このポットを遊星ボールミル（フリッチュ、PULVERISETTE 6）にセットして 500 rpm で連続 6 時間処理した。その結果、5.3 質量% の物理吸着水を含有する粉末を得た。このサンプルをリン酸含浸キチン粉砕物 2 とする。

[0047] 比較例 5：硫酸含浸キチン粉砕物

キチン（平均粒径 $73\ \mu\text{m}$ ）10.0 g（NAG 単位として 49.2 mmol）を硫酸 2.4 g（24.6 mmol、S/C 比 2.0）を含む水 30 mL に分散させた後、減圧乾燥して取得した粉末を 5 g 分取し、直径 5 mm のアルミナボール 100 g と共に容量 250 mL のアルミナポットに入れた。このポットを遊星ボールミル（フリッチュ、PULVERISETTE 6）にセットして 500 rpm で連続 6 時間処理した。その結果、3.1 質量% の物理吸着水を含有する粉末を得た。このサンプルを硫酸含浸キチン粉砕物とする。

[0048] [キチンの部分加水分解反応サンプルの溶解度測定]

実施例 1～2 及び比較例 1～5 の各サンプル 100 mg を秤量して、蒸留水 50 mL に添加し振とうした後、10 分間の超音波処理を行い、可溶分を溶解させた。一連の処理は温度 $25\ ^\circ\text{C}$ で行い、得られた懸濁液は、 $0.1\ \mu\text{m}$ のポリテトラフルオロエチレン（PTFE）のフィルターでろ過して、固体残渣はさらに 5 mL の蒸留水でろ過洗浄し、 $110\ ^\circ\text{C}$ のオーブンに入れて一晩乾燥した後、質量を測定し、以下の計算式で溶解度を算出した。

[数1]

溶解度(%)

$$= \{(\text{秤量サンプルの質量} - \text{回収固形分の乾燥質量}) / \text{秤量サンプルの質量}\} \times 100$$

[0049] 溶解度の測定結果を表 1 に示す。未処理キチン（比較例 1）は 0% で全く溶解性を示さなかった。処理を施したものにおいても、酸添加のみ行ったリン酸含浸キチン 1（比較例 2）は 1.2%、リン酸含浸キチン 2（比較例 3）は 4.4% となり、またボールミル粉砕のみ行ったキチン粉砕物サンプル

(比較例4)は5.2%となり、いずれも大幅に低い溶解度しか示さなかった。

一方、酸含浸したキチンを酸存在下でボールミル粉碎したリン酸含浸キチン粉碎物(実施例1～2)及び硫酸含浸キチン粉碎物(比較例5)は、いずれも99%の溶解度を示し殆ど溶解した。

これらの結果より、酸触媒の添加や遊星ボールミル粉碎の単一処理では、キチンを可溶化する効果は殆どなかったが、酸存在下で機械的応力付与する粉碎処理を実施することにより格段の相乗効果が得られ、キチンの可溶化を大幅に促進することが確認された。

さらに、強酸である硫酸の代わりに、危険性が強酸より低く、環境負荷が高い弱酸であるリン酸を使用しても遊星ボールミルによりキチンを可溶化させることが確認された。

なお、比較例2及び比較例3において、可溶化率と生成物の合計収率が逆転しているのは、キチンに担持されたリン酸が洗浄で完全に除かれず、見かけ上の可溶化率が低くなったためであると考えられる。

[0050] [キチンの部分加水分解反応サンプルの水懸濁液ろ液の酢酸測定]

実施例1～2及び比較例1～5の各サンプルの水懸濁液ろ液を、高速液体クロマトグラフ(装置:島津製作所製LC-10ATVP、カラム:Phenomenex(登録商標) Synergi 4 μ m Hydro-RP 80Å ϕ 4.6 $\times$ 250mm、移動相:40mMリン酸カリウム緩衝液、pH2.9、0.8mL/分、30℃、検出:示差屈折率)により酢酸を定量分析した。その結果、いずれのサンプルも酢酸は検出されなかった。

これにより、酸触媒共存下のボールミル粉碎によるキチンの部分加水分解では、キチンを構成するNAGユニットのC2位にあるアセトアミド基($-NHCOCH_3$)のアミド結合は保持され、NAGユニット同士を繋ぐグリコシド結合が選択的に切断されることが示唆された。これは、少量の酸触媒が共存し加水分解しやすい系において、ボールミル粉碎による機械的応力がキチンを押しつぶして重合の両方向に引き伸ばす作用、すなわち主鎖を形成す

るグリコシド結合を引っ張る作用を及ぼすことにより、従来の酸添加のみで行う加水分解では得られなかったグリコシド結合の選択的な加水分解を加速させる相乗効果が得られるものと推測される（図1参照）。

[0051] [キチンの部分加水分解反応サンプルの水懸濁液ろ液のHPLC分析]

実施例1～2及び比較例2～5の各サンプルの水懸濁液ろ液をHPLC（高速液体クロマトグラフ）（装置：島津製作所製LC-10ATVP、カラム：Phenomenex Rezex RPM-Monosaccharide Pb++ $\phi 7.8 \times 300$ mm、移動相：水、0.6 mL/分、70℃、検出：示差屈折率）で分析し、NAG及びオリゴ糖（重合度2～8）の収率を以下の計算式により算出した。

[数2]

$$\text{収率(\%)} = \{ \text{生成物のNAG単位の数} / (\text{加えた原料のNAG単位の数}) \} \times 100$$

[0052] 結果を表1に示す。酸添加のみ行ったリン酸含浸キチン1（比較例2）はNAG 1.2%、オリゴ糖 1.4%、リン酸含浸キチン2（比較例3）はNAG 2.6%、オリゴ糖 3.9%となり、ボールミル粉碎のみ行ったキチン粉碎物サンプル（比較例4）はNAG 0.1%、オリゴ糖 1.3%となり、いずれも大幅に低い収率しか得られなかった。

一方、酸存在下でボールミル粉碎したサンプルは、リン酸含浸粉碎キチン1（実施例1）はNAG 3.3%、オリゴ糖 70%、リン酸含浸キチン2（実施例2）はNAG 5.1%、オリゴ糖 61%、硫酸含浸粉碎キチン（比較例5）はNAG 10.0%、オリゴ糖 60%となり高いオリゴマー収率を示した。この結果より、リン酸、硫酸のいずれを用いても、酸含浸キチンを粉碎することにより、収率よくキチンオリゴマーを得られることが確認できた。また、得られたキチンオリゴマーは植物生体防御機構活性化作用が報告されており農業資材としての用途が期待される物質である。農業資材の用途を考えた場合、硫酸を使用して製造したキチンオリゴマーを長期的に散布すると、硫酸根の蓄積による酸性土化のリスクがあるため、精製の工程が必要となる。一方、リン酸を使用して製造したキチンオリゴマーでは、含有するリ

ン酸根が植物の栄養源として活用されるため、精製を行わずに畑などへの散布ができる可能性があり、その経済的なメリットも大きいと言える。

[0053] [表1]

	処理条件		結果			
	サンプル名(処理手順)	S/C ^[a]	溶解度 (%)	NAG収率 (%)	オリゴマー収率 (%)	農業散布剤としての適性
実施例1	リン酸含浸キチン粉砕物1 (酸添加して粉砕したキチン)	2.0	99	3.3	70	○
実施例2	リン酸含浸キチン粉砕物2 (酸添加して粉砕したキチン)	1.0	99	5.1	61	○
比較例1	未処理キチン (未処理)	— ^[b]	0	0.0	0	× (有効成分なし)
比較例2	リン酸含浸キチン1 (酸含浸したキチン)	2.0	1.2 ^[c]	0.7	1.4	× (有効成分微量)
比較例3	リン酸含浸キチン2 (酸含浸したキチン)	1.0	4.4 ^[c]	2.6	3.9	× (有効成分微量)
比較例4	キチン粉砕物 (酸なしで粉砕したキチン)	— ^[b]	5.2	0.1	1.3	× (有効成分微量)
比較例5	硫酸含浸キチン粉砕物 (酸添加して粉砕したキチン)	2.0	99	10.0	60	△ (硫酸の蓄積)

[a] 基質／触媒比すなわち NAG モノマー単位 ($C_8H_{13}NO_5$) と酸触媒のモル数の比

[b] 触媒なし

[c] 可溶化率と生成物の合計収率が逆転しているのは、キチンに担持されたリン酸が洗浄で完全に除かれず、見かけ上の可溶化率が低くなっているためであると考えられる

[0054] [方法2 (加水分解反応)]

実施例3～7 及び比較例6：

表2に記載した各サンプルをキチンとして406mg分（NAG単位として2mmol）と、水40mLを、高压反応器（内容積100mL，オーエムラボテック（株）製オートクレーブ，ハステロイ（登録商標）C22製）に入れた後、600rpmで攪拌しながら室温から表2に記載した反応温度まで約16分加熱した。反応温度に到達した時点で加熱を止め、反応器を風冷し、冷却後、反応液を遠心分離装置により液体と固体に分離して上清サンプルの分析を行った。反応温度190℃の場合の温度プロファイルは図2に示す通りである。

[0055] 固形分を除去した液相サンプルの生成物は、HPLC（装置：島津製作所製LC-10ATVP、カラム：Phenomenex Rezex RP

M-Monosaccharide Pb++ $\phi 7.8 \times 300 \text{ mm}$ 、移動相：水、 0.6 mL/分 、 70°C 、及びカラム：Shodex（登録商標）

SUGAR SH-1011 $\phi 8 \times 300 \text{ mm}$ 、移動相：水、 0.5 mL/分 、 50°C 、検出：示差屈折率）によりNAGを定量分析した。

[0056] 以下に生成物の収率の計算式を示す。

[数3]

$$\text{NAG収率(\%)} = \{ (\text{NAGのモル数}) / (\text{加えた原料のNAG単位のモル数}) \} \times 100$$

[0057] 分析結果を表2に示す。未処理キチンを 190°C で反応した条件（比較例6）では殆どNAGが生成しなかったのに対し、S/C比2.0のリン酸含浸キチン粉砕物1の加水分解反応のNAG収率は、 170°C （実施例3）で26%、 180°C （実施例4）で36%、 190°C （実施例5）で34%となった。またS/C比1.0のリン酸含浸キチン粉砕物2では、 170°C （実施例6）で40%、 180°C （実施例7）で44%となった。NAG収率はリン酸含浸キチン粉砕物2の方が全般的に高く、最大のNAG収率を得る温度はいずれも 180°C であることが確認された。

[0058] [表2]

No.	反応条件 ^[a]		反応結果
	サンプル	反応温度($^\circ\text{C}$)	NAG収率(%) ^[b]
実施例3	リン酸含浸キチン粉砕物1	170	26
実施例4	リン酸含浸キチン粉砕物1	180	36
実施例5	リン酸含浸キチン粉砕物1	190	34
実施例6	リン酸含浸キチン粉砕物2	170	40
実施例7	リン酸含浸キチン粉砕物2	180	44
比較例6	未処理キチン ^[c]	190	≤ 1

[a] 反応条件: キチン 406mg、溶媒 40mL、反応温度まで加熱後すぐに冷却

[b] NAG モノマー単位($\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5$)のモル数に基づく

[c] 触媒なし

産業上の利用可能性

[0059] 本発明の方法によれば、キチンから、取扱い易い弱酸触媒を用いて、既存の製造方法よりも少ない酸触媒の使用量でキチンオリゴマー、N-アセチルグルコサミン及び1- α -アルキルN-アセチルグルコサミンを、環境負荷を低減し低コストで効率的に製造でき、医薬、化粧品、食品、農業、飼料分野に有用な高機能素材を提供することができる。

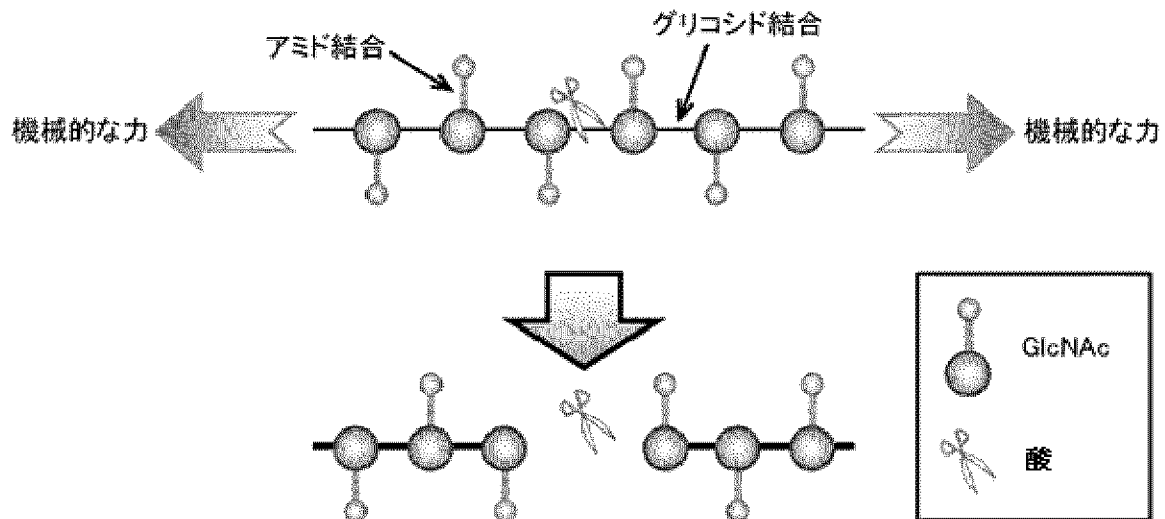
請求の範囲

- [請求項1] キチン含有バイオマスを、リン酸、亜硝酸及び有機酸から選択される酸触媒と水の共存下で粉碎装置を用い粉碎しながら部分加水分解することを特徴とするキチンオリゴマーの製造方法。
- [請求項2] 前記酸触媒がリン酸である請求項1に記載のキチンオリゴマーの製造方法。
- [請求項3] 前記酸触媒のモル数（C）に対するキチン中のN－アセチルグルコサミン単位（ $C_8H_{13}NO_5$ ）のモル数（S）の比（ S/C ）が0.2～2.0である請求項2に記載のキチンオリゴマーの製造方法。
- [請求項4] 予め酸触媒を含浸させたキチン含有バイオマスを水の存在下で粉碎する請求項1～3のいずれかに記載のキチンオリゴマーの製造方法。
- [請求項5] 酸触媒を溶解した溶媒とキチン含有バイオマスを混合し、その後溶媒を除去して酸触媒をキチン含有バイオマスに含浸させ、得られた酸触媒を含浸させたキチン含有バイオマスを水の存在下で粉碎する請求項4に記載のキチンオリゴマーの製造方法。
- [請求項6] 前記溶媒が、キチン含有バイオマスを変性させず、酸触媒活性を阻害せず、かつ加熱あるいは蒸留で除去できるものである請求項5に記載のキチンオリゴマーの製造方法。
- [請求項7] 前記溶媒が、水、ジエチルエーテル、ヘキサン、及びベンゼンから選択される請求項6に記載のキチンオリゴマーの製造方法。
- [請求項8] 粉碎装置がボールミルである請求項1～7のいずれかに記載のキチンオリゴマーの製造方法。
- [請求項9] ボールミルが、遊星ボールミルまたは転動ボールミルである請求項8に記載のキチンオリゴマーの製造方法。
- [請求項10] 請求項1～9のいずれかに記載の方法により得られたキチンオリゴマーに水を加えて加熱し加水分解することを特徴とするN－アセチルグルコサミンの製造方法。
- [請求項11] 加熱温度が100～260℃である請求項10に記載のN－アセチ

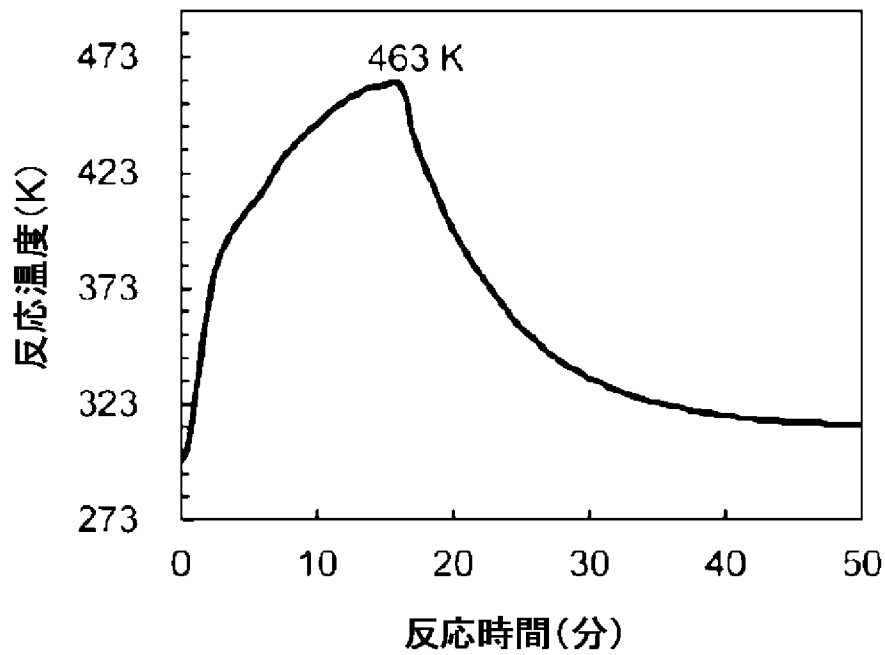
ルグルコサミンの製造方法。

- [請求項12] 請求項1～9のいずれかに記載の方法により得られたキチンオリゴマーにアルコールを加えて加アルコール分解することを特徴とする1－O－アルキル－N－アセチルグルコサミンの製造方法。
- [請求項13] アルコールが1価アルコールである請求項12に記載の1－O－アルキル－N－アセチルグルコサミンの製造方法。
- [請求項14] 前記アルコールがメタノールであり、前記1－O－アルキル－N－アセチルグルコサミンが1－O－メチル－N－アセチルグルコサミンである請求項12または13に記載の製造方法。
- [請求項15] 加熱温度が120～280℃である請求項12～14のいずれかに記載の1－O－アルキル－N－アセチルグルコサミンの製造方法。

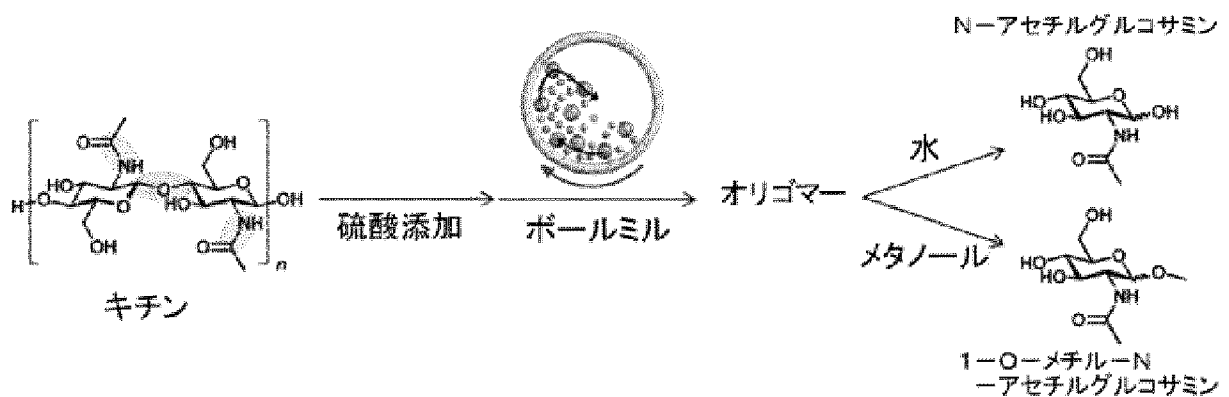
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/001740

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B37/08(2006.01)i, C07H5/06(2006.01)i, C07B61/00(2006.01)n

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)

C08B37/08, C07H5/06, C07B61/00

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	Hirokazu KOBAYASHI et al., "Acetyl-ki o Hoji shita Chitin no Shokubaiteki Kaijugo", Shokubai Toronkai Toronkai A Yokoshu, 2016 Nen 9 Gatsu, 118, page 147	1-15
A	JP 2002-282825 A (Japan Science and Technology Corp.), 02 October 2002 (02.10.2002), paragraphs [0044] to [0045] (Family: none)	1-15
A	JP 2001-2705 A (Nippon Suisan Kaisha, Ltd.), 09 January 2001 (09.01.2001), a whole article (Family: none)	1-15

☒ 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
24 February 2017 (24.02.17)

Date of mailing of the international search report
14 March 2017 (14.03.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/001740

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 2002-177000 A (Nippon Suisan Kaisha, Ltd.), 25 June 2002 (25.06.2002), a whole article (Family: none)	1-15
A	JP 2003-212902 A (Tottori-Ken), 30 July 2003 (30.07.2003), paragraph [0005] (Family: none)	1-15
A	JP 63-273493 A (Kyogyo Kumiai NFI), 10 November 1988 (10.11.1988), a whole article (Family: none)	1-15
A	JP 62-138496 A (Ihara Chemical Industry Co., Ltd.), 22 June 1987 (22.06.1987), a whole article & US 4804750 A & EP 226452 A2 & DE 3687142 A & DE 3687142 T & NO 864982 A & FI 865024 A & DK 592886 A & CA 1297832 A & ES 2043604 T & KR 10-1990-0002853 B1 & DK 592886 A0	1-15

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C08B37/08(2006.01)i, C07H5/06(2006.01)i, C07B61/00(2006.01)n

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（IPC））

Int.Cl. C08B37/08, C07H5/06, C07B61/00

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus (STN)

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
P, A	小林広和 他, アセチル基を保持したキチンの触媒的解重合, 触媒 討論会討論会A予稿集, 2016年9月, 118, 第147頁	1-15
A	JP 2002-282825 A (科学技術振興事業団) 2002.10.02, 段落[004 4]-[0045] (ファミリーなし)	1-15
A	JP 2001-2705 A (日本水産株式会社) 2001.01.09, 全体 (ファミリ ーなし)	1-15

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

24.02.2017

国際調査報告の発送日

14.03.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

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）

伊藤 幸司

4 P

9450

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

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 2002-177000 A (日本水産株式会社) 2002. 06. 25, 全体 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 2003-212902 A (鳥取県) 2003. 07. 30, 段落[0 0 0 5] (ファミリーなし)	1-15
A	JP 63-273493 A (協業組合 エヌエフアイ) 1988. 11. 10, 全体 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 62-138496 A (イハラケミカル工業株式会社) 1987. 06. 22, 全体 & US 4804750 A & EP 226452 A2 & DE 3687142 A & DE 3687142 T & NO 864982 A & FI 865024 A & DK 592886 A & CA 1297832 A & ES 2043604 T & KR 10-1990-0002853 B1 & DK 592886 A0	1-15