総 説

改質乳清タンパク質の開発と製造

(平成9年度 日本食品科学工学会技術賞)

杵川洋一*・後藤茂男*・北畠直文**

Development and Manufacture of Process Whey Protein

Yoh-ichi KINEKAWA*, Shigeo GOTO* and Naofumi KITABATAKE**

* Daiichi-Kasei Co., Ltd., 7-1, Okanonishi-cho, Kawata, Yamashina-ku, Kyoto 607

** Research Institute for Food Science, Kyoto University, Gokashou, Uji-shi, Kyoto 611

1. 牛乳乳清タンパク質

低利用食糧資源の有効利用は、資源の枯渇が憂慮される21世紀に向けて、地球規模における人類の課題である。牛乳からバターとカゼイン、あるいはチーズを製造すると、酸乳清 (Acid Whey) およびチーズ乳清 (Cheese Whey, Sweet Whey) と呼ばれる残滓が生成する。乳清中には乳糖やミネラルなどと共に、微量の β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミンや血清アルブミンなどの球状タンパク質が存在する^{1)~3)}。世界における乳清の生成量は、年間約1300万トンであり、これはタンパク質換算で約78万トンにもなる。しかしながら、これらの中で食品素材として有効利用されているものは3%未満であり、ほとんどは家畜飼料や廃棄物となっている⁴⁾⁵⁾。特に、乳清の直接投棄は、環境汚染を起こすため、一定の廃棄処理が必要となるが、それは膨大な経費を乳加工産業へ負担させることとなる。

これまで乳清タンパク質の乳清からの回収は、タンパク質の質の問題は考慮されず、専ら収率の向上にのみ腐心されていたが、今日、膜濃縮技術の進歩は未変性の高品質乳清タンパク質の大量調製を可能ならしめている³⁾。

しかしながら、食品素材として利用されている乳清タンパク質は、透明性、高塩濃度下での加熱ゲル形成性、

乳化安定性や消化性に難点があるため、産業界から改良が望まれていた⁶⁾。

これらのことから、乳清成分、とりわけ乳清タンパク質の機能特性を高め、食品素材としての付加価値を向上させることは、環境の観点だけでなく、タンパク質資源の有効利用においても重要であり、乳業をはじめ食品産業全体の活性化にもつながる。

2. 球状タンパク質の加熱処理と改質乳清タンパク質

球状タンパク質液を加熱した透明液に、塩を加えて再び加熱を行うと、透明で保水性の高いゲルが得られることが、土井らのグループの研究で知られている^{7)~9)}。この特性は、食品素材として重要であるが、産業への利用においては、機能特性や経済性等を十分に満たす食品タンパク質素材は得られていなかった。

筆者らは、牛乳乳清タンパク質が、等電点 (pH 5付近) や分子サイズ (14~67 kDa) が近似した球状タンパク質で構成されていること¹⁰⁾に着目し、加熱した乳清タンパク質の透明性やゲル物性に及ぼす、pHと塩の影響を検討した。その結果、乳清タンパク質は、pHと塩濃度に依存して透明、半透明および白濁した液、ゾルやゲルを形成することが明らかとなった¹¹⁾。そして、中性付近、塩を含まない条件で加熱した、乳清タンパク質の透明液は、元の乳清タンパク質や他の食品タンパク質とは極め

* 株式会社第一化成 (〒607 京都市山科区川田岡ノ西町7-1)

** 京都大学食糧科学研究所 (〒611 京都府宇治市五ヶ庄)

て異なった機能特性や消化・栄養性を有する事を見出した^{6) 11)~17)}。

そこで、本タンパク質液を改質乳清タンパク質 (Proess Whey Protein)^{6) 13)~17)}と命名し、その機能特性を明らかにすると共に、食品素材として大量生産する方法と加工食品への利用に関する研究を行った。

特定条件下で加熱した球状タンパク質液である改質乳清タンパク質が示す特性は、本タンパク質以外にも、卵タンパク質や血清タンパク質でも認められており、また、乳清タンパク質においても報告がある^{18)~22)}。

3. 改質乳清タンパク質の特性

乳清タンパク質液を加熱すると、タンパク質濃度、pH、塩の種類と濃度、加熱の温度と時間に依存して、透明、半透明や白濁したゾルあるいはゲルが得られ、また、ゲルの透明性や硬さや保水性も、これらのファクターの影響を受けることが報告されている^{11) 23)~31)}。

改質乳清タンパク質 (以下、PWPと略す) と加熱処理を行っていない乳清タンパク質 (以下、WPIと略す) を、pH 6.5 で塩を添加し加熱したときの濁度とゲルの破断エネルギーを測定した結果を図1に示す。

WPIは、塩濃度が高くなるに従って濁度は上昇し、ゲルの破断エネルギーは減少した。一方、PWPも同様の傾向を示したが、より透明性が高く、より弾力性の高いゲルを形成した⁶⁾。このことから、PWPは卵白アルブミンで知られている fine strand 構造を持った、soluble linear aggregate (可溶性線状凝集体) であることが示唆された^{6)~9) 11) 12) 33)~35)}。

WPIとPWPのpHを2~11、塩濃度を0~200 mM

に調整し、加熱したときのゲルの凝集性と付着性を測定した結果を図2に示す。凝集性のデータが得られた領域はゲルである。WPIは、中性付近を中心として広い範囲で半透明から白濁したゲルが得られた。PWPでは、WPIよりも広い範囲で透明なゲルやゾルが形成した。また、酸性領域においてもゲルを形成した^{6) 11)}。

一方、中性、高塩濃度域の白濁ゲルは、WPIでは付着性が低いのにに対し、PWPでは高く、同じ白濁ゲルでも両者の物性は異なることが明らかとなっている⁶⁾。

PWPは、WPIと比較して、同一条件において、弾力性の高いゲルがより広いpHと塩濃度範囲で得られた。また、加工食品中に存在する種々の塩類の存在下で加熱を行うと、WPIではゲルを形成しない条件でも、ゲルを形成する^{6) 11) 15)}。

PWPは、0℃から25℃までは、温度上昇に依存して見かけ粘度は低下するが、塩を添加すると、25℃以上では、塩濃度、温度、放置時間に依存して見かけ粘度は上昇し、室温や冷蔵温度においてもゲル化に至る^{6) 11) 13)}。

WPIに、塩化ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムを添加し、25℃で放置した時の見かけ粘度は、放置時間に依存した変化は見られないが、PWPでは、いずれの塩を添加しても、塩濃度と放置時間に依存して見かけ粘度は上昇し、塩化カリウムを除きセルフサポーティング・ゲルを形成する (図3)¹⁵⁾。PWPの塩による粘度上昇やゲル化は、カチオンの離液順列に従う¹⁵⁾。

乳清タンパク質の乳化活性は、加熱変性の度合いや不溶性タンパク質と可溶性タンパク質との比率の影響を受けることが知られている^{36)~38)}。また、乳清タンパク質の

図1 異なる塩濃度で加熱を行った乳清タンパク質 (WPI) と改質乳清タンパク質 (PWP) の濁度とゲルの破断エネルギー

タンパク質濃度; 70 mg/ml, 80℃, 1 h.

図 2 異なる pH と塩濃度で加熱を行った乳清タンパク質 (WPI) と改質乳清タンパク質 (PWP) ゲルの凝集性と付着性

タンパク質濃度; 70 mg/mL, 80°C, 1 h.

乳化物の物性は、タンパク質濃度、pH、加熱温度、乳化方法や油滴のサイズに依存する^{39)~44)}。

PWP は、加熱調製されており表面疎水性度の高い可溶性凝集体であり、また、見かけ粘度が高く、塩の添加によるゲル形成性があるため、高い乳化安定性や特異なゲル形成性を示す。WPI、PWP、大豆タンパク質、カゼインナトリウムおよびしょ糖脂肪酸エステルを用いて調製したエマルジョンの安定性を、電導度法を用いて測定すると、しょ糖脂肪酸エステルや大豆タンパク質やカゼインナトリウムは、酸性域や等電点付近では、凝集体や

沈殿を形成するため、低い安定性を示したが、WPI はいずれの条件でも比較的高い安定性を示し、PWP は更に高い安定性を示した (図 4)⁴⁵⁾。

また、PWP は高い起泡性や起泡安定性を示し、 β -カロテンなどの脂溶性物質を安定化させることも確認されている⁴⁵⁾。

通常エマルジョンは熱力学的に不安定であり、WPI で調製した塩を含むエマルジョンは加熱すると分離するが、PWP は分離せず、油滴を包含したままゲルを形成し、エマルジョンゲルの物性は、pH、塩濃度および加熱

図3 4種の塩を添加した乳清タンパク質(WPI)と改質乳清タンパク質(PWP)液の見かけ粘度の変化
 タンパク質濃度; 70 mg/ml, pH; 7.0, 25°C, B型単一円筒回転粘度計。
 A; 塩化ナトリウム, B; クエン酸三ナトリウム, C; 塩化カリウム, D; 塩化カルシウム。
 A, B, C; ○; 500 mM/WPI, ●; 500 mM/PWP, ■; 300 mM/PWP, ▲; 100 mM/PWP。
 D; ○; 20 mM/WPI, ●; 20 mM/PWP, ■; 15 mM/PWP, ▲; 10 mM/PWP, ◆; 7.5 mM/PWP。

温度に依存する^{16) 46)}。

乳清タンパク質はプロテインスコアの高い、優れた栄養源であることは知られているが、そのままでは消化性に難点がある^{47)~53)}。

WPIとPWPのブタペプシンに対する消化性を、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で分析すると(図5), WPIでは、 α -ラクトアルブミンなどのタンパク質は、pHの低下に伴い完全に加水分解されたが、 β -ラクトグロブリンはペプシンの至適pHにおいても、反応時間を延長しても、酵素を追加しても、加水分解を受けにくい。PWPでは、pHの低下に伴い、 β -ラクトグロブリンを含む全てのタンパク質は、容易に加水分解されることが明らかとなった^{17) 54) 55)}。この傾向は、ヒトやラットやウシのペプシンやキモシンにおいても同様であった。また、PWPは、ブタやラットの膵液やパンクレアチ

ンでも、WPIよりも速やかに加水分解を受けることや、ラットを用いた実験でも、胃や腸において、WPIに比べ、より速やかに消化され、高い栄養性を示すことが明らかとなっている^{17) 55)}。

4. 改質乳清タンパク質食品素材の製造

これまでの研究により、改質乳清タンパク質は、元の乳清タンパク質とは異なった特性を有しており、これらの特性は加工食品素材として有用であることが明らかとなった。

そこで、筆者らは改質乳清タンパク質を食品素材として利用するために、安価に大量生産する方法を検討した。

一般的にタンパク質食品素材は、粉体品や凍結品の形で流通されている。改質乳清タンパク質は、水和させた

状態で先に示す諸々の特性を示す。これらの特性を加工食品の製造プロセスにおいて、簡易にかつ安定的に利用するために、改質乳清タンパク質を溶液状態で供給する方法について研究した。その結果、改質乳清タンパク質は、単体で加熱を行ってもゲル化は起こらない特性を利用した、常温で流通可能なレトルト滅菌を施した液状食品素材製品を製造するための技術を開発した。本技術を用いて大量調製した改質乳清タンパク質は、ラボで調製

したものと同等の特性を有していた。

改質乳清タンパク質食品素材は、「SLAWP/ジェネシス」の商品名で、既に供給され、多くの加工食品に利用されている^{56) 57)}。

5. 改質乳清タンパク質食品素材の食品への利用

PWPの特性は、既に多岐にわたる加工食品に利用されている(表1)^{58)~64)}。PWPの食品への利用を以下に述べる。

(1) PWPは液状で供給可能であるため、粉体素材では必要な溶解工程は不要であり、直接、他の素材と混合することができる。また、単体で加熱を行ってもゲル化や見かけ粘度は上昇しないため、予備加熱することが可能である。

(2) PWPで調製した粘稠液は塩を加えると、冷蔵温度や室温下でも増粘し、一定範囲内においてニュートニアン流体挙動を示す透明な粘稠液を形成する。この特性は、ドレッシングやスープなどに利用される。また、食品添加物増粘剤の代替や、栄養飲料や経腸輸液等への応用も検討されている。また、PWPは低pH(<4)域でも透明な粘稠液を形成するので、酸性の飲料や食品にも利用される。

(3) PWPに塩を加えて加熱すると、従来のタンパク質素材では白濁ゲルや沈殿を形成する塩濃度においても、PWPは透明で保水性や弾力性や熱安定性の高いゲルが得られる。これらの特性は、ハム、ソーセージ、蒲

図4 乳清タンパク質 (○), 改質乳清タンパク質 (●), 大豆タンパク質 (△), カゼインナトリウム (□) および糖脂肪酸エステル (◇) を用いて調製したエマルジョンの安定性

33 g-タンパク質液 (5 mg/ml) + 3.3 g-oil, 17 000 rpm, 90 s, 電導度法。

図5 ブタベブシンで処理した乳清タンパク質 (A) と改質乳清タンパク質 (B) の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動パターン

表1 改質乳清タンパク質の特性と応用

機 能 特 性				応 用
液 体	塩添加	調理加熱		
	なし	なし	温度上昇に伴い粘度低下	増粘剤, 飲料, 経腸輸液
	あり	なし/あり	透明高粘度液, 室温増粘	飲料, ドレッシング, スープ
ゲル, ゾル	あり	なし/あり	透明~白濁ゲルやゾル, 高弾力, 高保水性ゲル, 室温ゲル化, カチオンの離液順列に従う	畜肉・水産加工品, 惣菜, 珍味, デザート, パン, 麺・パスタ, 和・洋・スナック菓子, カプセル, レトルト食品, インスタント食品
乳 化	なし/あり	なし	乳化安定性が高い	飲料, ドレッシング, マヨネーズ
	あり	あり	熱安定性の高い乳化物ゲル形成	ヨーグルト, デザート, 調味料, 惣菜, バター・チーズ加工品
その他	なし/あり	なし/あり	耐熱性, 耐光性向上	カロチノイド系色素, クロロフィル
消化・栄養特性				
胃液, 胆汁により速やかに消化され高い栄養性を示す				栄養付加食品, 介護食品, カプセル, 経腸輸液, ペットフード, 釣り餌

銑などの畜肉・水産加工品やフライ, コロッケなどの惣菜類へは, 物性や保水性の改善やスライスなどの加工適性の改良を目的として利用される。麺類や餅・団子や豆腐などの食品には, 茹で延びや老化を防止し, 凍結やレトルト耐性を付加する目的で, 利用される。また, 耐熱性や栄養性を高めたデザート, レトルト・冷凍・インスタント食品, カプセルなどにも利用が進んでいる。

(4) PWP は, 塩や pH 調整剤を添加するだけで, 室温下でもゲルが得られる。この特性は見かけ上, 冷凍すり身の座り現象に似ている。従って, 加熱に適さない物質や食品, フレーバ化合物や色素などを取り込んだゲル状製品を, 低温で調製することが可能である。これらの特性は, すり身の代替品, 生珍味の保型材, 手作りデザート類, 芳香剤用ゲル化剤, 色素安定剤やカプセル基材などに利用される。

(5) PWP で調製したエマルションは, 中性から酸性域での安定性や加熱に対する安定性が高い。また, 乳化物に塩を加え加熱を行うと, 油滴を包含したまま, 熱安定性の高いエマルションゲルを形成する。これらの特性は, 耐熱性ドレッシングやゲル状マヨネーズ, 乳加工品, フラワーペースト, フィリングやヨーグルト等に利用される。

(6) PWP は, 加熱安定性に優れた泡の調製が可能である。この特性は, ハンペン, パン, ケーキやデザートなどに利用される。

(7) PWP は, 胃液や胆汁により速やかに消化され, 高い栄養性を示す。この特性は, 消化能力の低い乳幼児や高齢者向け食品や医療食品の, タンパク質素材の補強やゲル化剤として利用される。

(8) PWP の持つ特性は, ペットフード, 釣り餌, 化粧品や医薬品なども利用される。

PWP は, 加工食品に有益で, 他の食品タンパク質素材とは異なった多くの特性を持つだけでなく, その利用は, 廃棄物処理, 環境改善や低利用タンパク質資源の有効利用などの観点からも, 食品産業全体の発展に役立つと考えられる。

本研究は, 前日本食品科学工学会会長の故土井悦四郎先生のご指導を受け, 共同研究として進められたものであります。

最後に, この文面を借りて, 本研究の機会を与えていただきました株式会社第一化成, 浪越康男氏に深く感謝申し上げます。また, この一連の研究に対しご指導, ご協力いただいた京都大学食糧科学研究所の教官, 所員並びに株式会社第一化成の研究所所員および関係者の方々に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) ZALL, R.R.: Whey and Lactose Processing

- (Elsevier Applied Science Pub., London), p. 1 (1992).
- 2) PEARCE, R.J.: Whey and Lactose Processing (Elsevier Applied Science Pub., London), p. 73 (1992).
- 3) HOBMAN, P.G.: Whey and Lactose Processing (Elsevier Applied Science Pub., London), p. 195 (1992).
- 4) MULVIHILL, D.M.: Advanced Dairy Chemistry Vol. 1 Proteins (Elsevier Applied Science Pub., London), p. 369 (1992).
- 5) KHORSHIED, M.A., MAHFOUZ, M.B., EL-SAYED, M. M. and EL-SAMRAGY, Y.A.: *Die Nahrung*, **33**, 691 (1989).
- 6) KINEKAWA, Y. and KITABATAKE, N.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 834 (1995).
- 7) KITABATAKE, N., HATTA, H. and DOI, E.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 771 (1987).
- 8) KITABATAKE, N. and DOI, E.: *Food Rev. Int.*, **9**, 445 (1993).
- 9) KITABATAKE, N., SHIMIZU, A. and DOI, E.: *J. Food Sci.*, **53**, 1091 (1988).
- 10) CANNAN, R.K., PALMER, A.H. and KIBRIC, A.C.: *J. Biol. Chem.*, **142**, 803 (1942).
- 11) KITABATAKE, N., DOI, E. and KINEKAWA, Y.: *J. Food Sci.*, **59**, 769 (1994).
- 12) KITABATAKE, N. and KINEKAWA, Y.: *Food Chemistry*, **54**, 201 (1995).
- 13) KITABATAKE, N., FUJITA, Y. and KINEKAWA, Y.: *J. Food Sci.*, **61**, 500 (1996).
- 14) KINEKAWA, Y. and KITABATAKE, N.: *J. Dairy Sci.*, **79**, 350 (1996).
- 15) KINEKAWA, Y., FUYUIKI, T. and KITABATAKE, N.: *J. Dairy Sci.*, submitted, (1996).
- 16) KINEKAWA, Y., FUJITA, Y. and KITABATAKE, N.: *Food Chemistry*, submitted, (1996).
- 17) KITABATAKE, N. and KINEKAWA, Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, submitted, (1997).
- 18) TANI, F., MURATA, M., HIGASA, T., GOTO, M., KITABATAKE, N. and DOI, E.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 2, 209 (1993).
- 19) TANI, F., MURATA, M., HIGASA, T., GOTO, M., KITABATAKE, N. and DOI, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2325 (1995).
- 20) BARBUT, S. and FOEGEDING, F.A.: *J. Food Sci.*, **58**, 867 (1993).
- 21) 中村道子・佐藤 薫・小泉詔一・河内公恵・西谷 紹明・中島一郎：日食工誌，**42**，1 (1995).
- 22) 佐藤 薫・中村道子・小泉詔一・河内公恵・西谷 紹明・中島一郎：日食工誌，**42**，7 (1995).
- 23) GREEN, M.L.: *Food Chemistry*, **6**, 41 (1980).
- 24) MANGINO, M.E., KIM, J.H., DUNKERLEY, J.A. and ZADOW, J.Z.: *Food Hydrocolloids*, **1**, 277 (1987).
- 25) MULVIHILL, D.M. and KINSELLA, J.E.: *J. Food Sci.*, **53**, 231 (1988).
- 26) ZIEBEL, F. and KINSELLA, J.E.: *Milchwissenschaft*, **43**, 689 (1988).
- 27) XIONG, Y.L.: *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 380 (1992).
- 28) PARIS, N., ANEMA, S.G., SINGH, H. and CREAMER, L.K.: *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 460 (1993).
- 29) MANGINO, M.E.: *Food Technol.*, **46**, 114 (1992).
- 30) KUHN, P.R. and FOEGEDING, E.A.: *J. Food Sci.*, **56**, 789 (1991).
- 31) DUNKERLY, J.A. and HAYES, J.F.: *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, **15**, 191 (1980).
- 32) CLARK, A.M., JUDGE, F.J., RICHARDS, J.B., STUBBS, J.M. and SUGGETT, A.: *Int. J. Peptide Protein Res.*, **17**, 380 (1981).
- 33) BARBUT, S. and FOEGEDING, F.A.: *J. Food Sci.*, **58**, 867 (1993).
- 34) LANGTON, M. and HERMANSSON, A.M.: *Food Hydrocolloid*, **5**, 523 (1992).
- 35) STADING, M., LANGTON, M. and HERMANSSON, A. M.: *Food Hydrocolloid*, **7**, 195 (1993).
- 36) PELTONEN-SHALABY, R. and MANGINO, M.E.: *J. Food Sci.*, **51**, 91 (1986).
- 37) BRITTEN, M., GIROUX, H.J., JEAN, Y. and RODRIGUE, N.: *Int. Dairy Journal*, **4**, 25 (1994).
- 38) BEUSCHEL, B.C., CULBERTSON, J.D., PARTRIDGE, J. A. and SMITH, D.M.: *J. Food Sci.*, **57**, 605 (1992).
- 39) MCCLEMENTS, D.J., MONAHAN, J. and KINSELLA, J.E.: *Journal of Texture Studies*, **24**, 411 (1993).
- 40) JOST, R., BAECHLER, R. and MASSON, G.: *J. Food Sci.*, **51**, 440 (1986).
- 41) FOLEY, J. and O'CONNELL, C.: *Journal of Dairy Research*, **57**, 377 (1990).
- 42) AGUILERA, J.M., XIONG, Y.L. and KINSELLA, J.E.: *Food Rec. Int.*, **26**, 11 (1993).
- 43) XIONG, Y.L., AGUILERA, J.M. and KINSELLA, J.E.: *J. Food Sci.*, **56**, 920 (1991).
- 44) YOST, R.A. and KINSELLA, J.E.: *J. Food Sci.*, **57**, 892 (1992).
- 45) 杵川洋一・北畠直文：日本農芸化学会 1994 年度大会講演，東京 (1994).
- 46) 藤田由紀・杵川洋一・北畠直文：日本食品科学工学会第44回大会講演要旨集，p. 102，埼玉 (1997).
- 47) SMIETANA, Z., AMAROWICZ, R., CICHON, R. and ZPENDOWSKI, J.S.: *Milchwissenschaft*, **41**, 704 (1986).
- 48) FORSUM, E. and HAMBRAEUS, L.: Contribution

- of Chemistry to Food Supplies, eds I. (MORTON and D.N. RHODES, Butterworth, London), p. 375 (1974).
- 49) RENNER, E.: Milk and Dairy Products in Human Nutrition, Volkswirtschaft (Verlag, Munchen) (1983).
- 50) REDDY, I.M., KELLA, K.D. and KINSELLA, J.E.: *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 737 (1988).
- 51) ASSELIN, J., HERBERT, J. and AMIOT, J.: *J. Food Sci.*, **54**, 1037 (1989).
- 52) SCHMIDT, D.G. and VAN MARKWIJK, B.W.: *Neth. Milk Dairy J.*, **47**, 15 (1993).
- 53) OTANI, H.: *Jap. J. Zoothech. Sci.*, **52**, 689 (1981).
- 54) 杵川洋一・北畠直文: 日本農芸化学会 1993 年度大会講演要旨集, p. 487, 仙台 (1993).
- 55) 杵川洋一・北畠直文: 日本農芸化学会 1994 年度大会講演要旨集, p. 489, 東京 (1994).
- 56) 北畠直文・土井悦四郎・杵川洋一: 日特出 (1990), 特開平 4-267850, 特開平 4-228036, 特開平 6-292514, 特公平 6-101986.
- 57) KITABATAKE, N., DOI, E. and KINEKAWA, Y.: (1990): New Zealand patent 238596 (1994), Australia patent 647480 (1994); European patent 0473270, (1995), United States patent, 5416196 (1995), Irish patent, 69563 (1996).
- 58) 杵川洋一・北畠直文: 日特開, 平 5-244876 (1993).
- 59) 杵川洋一・北畠直文: 日特開, 平 5-244907 (1993).
- 60) 中村弘康・神原 績・北畠直文・杵川洋一: 日特開, 平 6-335347 (1994).
- 61) 宮本博文・神原 績・北畠直文・杵川洋一: 日特開, 平 6-335368 (1994).
- 62) 佐藤浩司・正岡 悟・杵川洋一・北畠直文: 日特開, 平 8-196216 (1996).
- 63) 杵川洋一・棚橋健治・小林葉子・北畠直文: 日特開, 平 8-289749 (1996).
- 64) 檜原 敏・杵川洋一・上田義則・米本夕紀子・十川 智・北畠直文: 日特願, 平 9-135853 (1997). (平成 9 年 5 月 29 日受理)