

(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23日(23.11.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/199830 A1

(51) 国際特許分類:

C12P 23/00 (2006.01) A61K 8/31 (2006.01)
A23K 10/37 (2016.01) A61K 8/33 (2006.01)
A23K 20/105 (2016.01) A61Q 1/02 (2006.01)
A23K 20/179 (2016.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A23L 5/44 (2016.01) C07K 14/405 (2006.01)
A23L 33/10 (2016.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/017800

(22) 国際出願日: 2017年5月11日(11.05.2017)

(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 2016-099593 2016年5月18日(18.05.2016) JP

(71) 出願人: D I C 株式会社(DIC CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1748520 東京都板橋区坂下三丁目3番58号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 陣内健昌(JINNAI Kensuke); 〒2858668
千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C 株式会

社 総合研究所内 Chiba (JP). 新井久由(ARAI Hisayoshi); 〒2858668 千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C 株式会社 総合研究所内 Chiba (JP). 今井康行(IMAI Yasuyuki); 〒2858668 千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C 株式会社 総合研究所内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 河野通洋(KONO Michihiro); 〒1038233
東京都中央区日本橋三丁目7番20号 D I C 株式会社内 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,

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING PURIFIED PRODUCT OF CAROTENOIDS

(54) 発明の名称: カロテノイドの精製物を得る方法

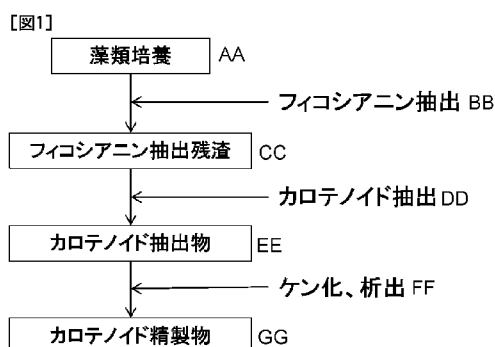


FIG. 1:
AA Algal culture
BB Phycocyanin extraction
CC Phycocyanin extraction residue
DD Carotenoid extraction
EE Carotenoid extract
FF Saponification, precipitation
GG Carotenoid purified product

(57) Abstract: The invention provides a method for producing carotenoids under the following conditions. When the amount of alkaline substance used in step (I) for extracting carotenoids is taken to be x mol Eq relative to the solids fraction mass (1 kg) of residue (A) from which the phycocyanin has been extracted and the amount of alkaline substance used in the saponification step (II) is taken to be y mol Eq relative to the solids fraction mass (1 kg) of carotenoid extract (B), (1) x and y satisfy either of the following conditions. 1) $1 \leq x < 3.0$, $0 < y \leq 6.1$ and $2.0 \leq x + y \leq 8.0$. 2) $2.0 \leq x < 3.0$ and $y = 0$. (2) By satisfying the condition that the temperature at which the step (I) for extracting carotenoids and saponification step (II) are conducted is 30-50°C.



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:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))

(57) 要約: 本発明は以下の条件を有するカロテノイドの製造方法を提供するものである。カロテノイドを抽出する工程(1)におけるアルカリ性物質の使用量を、フィコシアニン抽出した残渣(A)の固形分質量(1 kg)に対してxモル相当量とし、ケン化工程(11)におけるアルカリ性物質の使用量を、カロテノイド抽出物(B)の固形分質量(1 kg)に対してyモル相当量とした場合、(1)x及びyが以下の何れかの条件を満たす。1) $1.0 \leq x < 3.0$ 、 $0 < y \leq 6.1$ 、且つ2) $0 \leq x + y \leq 8.0$ である。2) $2.0 \leq x < 3.0$ 、且つ $y = 0$ である。(2)カロテノイドを抽出する工程(1)及びケン化工程(11)を行う温度が30~50℃である、条件を満たすことによる。

明 細 書

発明の名称：カロテノイドの精製物を得る方法

技術分野

[0001] 本発明は、カロテノイドの精製物を得る方法に関し、特に藻類の培養によりフィコシアニンを産生させた後、該フィコシアニンを抽出した残渣からカロテノイドの精製物を得る方法に関する。

背景技術

[0002] 藍藻、特にスピルリナは、カロテノイド、核酸関連物質、アミノ酸、ビタミン、ミネラル、フィコシアニン色素等の有用物質を多量に含むため、健康食品として利用されるだけでなく、フィコシアニン色素源としても利用されている。フィコシアニン色素は、普通618nmに吸収極大波長があり、水溶性で鮮やかな青色を呈することから、食品、例えば、チューインガム、氷菓等の水溶性天然着色剤として、あるいは、化粧品、例えば、アイシャドー、口紅、クリーム、アイライナー、シャンプー、乳液等の着色剤として利用されている。

[0003] カロテノイドは抗酸化作用を有しており、体内に取り込まれた後にも抗酸化作用等が期待されることから、各種の健康食品やサプリメントにも添加されている。カロテノイドの中でもゼアキサンチンは、養殖魚の色揚げや鶏卵の卵黄質改善等の目的で広く用いられているが、ルテインと共に人間の網膜の黄斑領域に存在するただ2つのカロテノイドであり、AMD（加齢性黄斑変性症）の危険性の低下に関連していることが知られている（特許文献1、非特許文献1）。

[0004] また、ゼアキサンチン、ルテインには強い抗腫瘍促進特性を有することが報告されている（非特許文献2）。最近の報告では、心循環器疾患、アテローム性動脈硬化症、皮膚ガン、卵巣ガン等を誘導する状態への対抗における重要な役割を担うことができることが明らかにされている。

[0005] 前記フィコシアニン色素は、例えば、次の4工程から製造できる（特許文

献2、3)。

- 1) 藍藻藻体成分の水抽出工程、
- 2) 遠心分離工程、
- 3) 限外ろ過による濃縮工程、
- 4) 乾燥工程。

しかしながら、本製造工程によって発生するフィコシアニン分離後の残渣には、未だ多量の核酸関連物質、アミノ酸、カロテノイド色素、ビタミン、ミネラル等が含まれているにも拘らず、廃棄している場合が多く、環境汚染源問題となるだけでなく、貴重なバイオマス資源の浪費にもつながるものである。従って、当該残渣の有効な再利用が望まれている。

[0006] 一方、クロロフィルの分解物は有害性であることも知られている（特許文献4）。

藻類中に含まれるクロロフィルは光過敏症の原因になり、例えば、飼料付与による家畜の障害例は古くから知られており、また、クロレラ錠剤の喫食過多は人体障害を引き起こすことも広く知られることとなった。これはクロロフィルが分解して生ずるフェオフォルバイドに直接起因するものであって、その光感作反応により日光性の皮膚炎等の光過敏症を顕現するが、このフェオフォルバイドは白鼠を用いた光毒性試験の結果、LD₅₀は45.5mg／体重100g以上、MLD₅₀は12mg／体重100g以上の値を有するとされる（非特許文献3）。しかも、クロロフィルは酸性に傾いたり、有機溶剤の共存によってフェオフォルバイドaが生成しやすくなるので、全体から見れば、藻類から抽出したカロテノイドをそのまま健康食品として用いることには問題が残る。

[0007] 微細藻類由来のカロテノイド、特にゼアキサントンの精製においては、クロロフィルとの分離が困難で精製工程が複雑である。これらの点を克服するために、陸上細菌 *Erwinia uredovora* による発酵生産も研究されているが、その収率は極めて低く、実用に耐えうるものではない（非特許文献4）。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特表2005-536547号公報

特許文献2：特開平1-123865号

特許文献3：特開平6-16519号公報

特許文献4：特公平5-27619号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：J M Seddon et al, Dietary Carotenoids, Vitamins A, C, and E, and Advanced Age-Related Macular Degeneration, Journal of the American Medical Association, Vol. 272, No. 9, pages 1413-1420, (1994)

非特許文献2：L Packer, M Hiramatsu, T Oshikawa, (Editors), Antioxidant Food Supplements in Human Health, Academic Press, NY, 1999, pp223 and pp226

非特許文献3：日本農芸科学会誌, 1980年、vol54、No9、721～726頁

非特許文献4：J. Bacteriol. 172, 6704, 1990

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 背景技術に記載のごとく、これまでの技術では、カロテノイド、特にゼアキサンチンに係る有害性物質を含まない工業上有用な製造方法が存在せず、また、残渣の有効利用に資するカロテノイド等の製造方法がないのが現状である。

そこで、本発明では、藻類培養残渣の有効利用に資し、有害性物質を含ま

ないカロテノイドに係る工業上有用な製造方法を提供することを課題とする。

また、本発明では、カロテノイドの精製物を含有する機能性食品、飼料、化粧品、又は食用色素等の提供をも課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明では、藻類の培養によりフィコシアニンを生産させた後、該フィコシアニンを抽出した残渣（A）からカロテノイドの精製物を得る方法であって、

前記残渣（A）からアルカリ性物質の存在下にカロテノイドを抽出する工程（I）を行った後に、ろ過し、

得られたカロテノイド抽出物（B）に含まれるクロロフィルを分解するためのアルカリ性物質を用いたケン化工程（II）と、

その後に行うカロテノイドの析出工程（III）を有し、

カロテノイドを抽出する工程（I）におけるアルカリ性物質の使用量を、フィコシアニンを抽出した残渣（A）の固形分質量（1 kg）に対してxモル相当量とし、

ケン化工程（II）におけるアルカリ性物質の使用量を、カロテノイド抽出物（B）の固形分質量（1 kg）に対してyモル相当量とした場合、

以下の条件を満たすことを特徴とするカロテノイドの精製物を得る方法。

（1）x及びyが以下の何れかの条件を満たす。

1） $1.0 \leq x < 3.0$ 、 $0 < y \leq 6.1$ 、且つ $2.0 \leq x + y \leq 8.0$ である。

2） $2.0 \leq x < 3.0$ 、且つ $y = 0$ である。

（2）カロテノイドを抽出する工程（I）及びケン化工程（II）を行う温度が $30 \sim 50^{\circ}\text{C}$ である。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、藻類培養残渣の有効利用に資する、生体にとって有用なカロテノイドに係る有害性物質を含まない工業上有用な製造方法を提供する

ことができる。

さらには、カロテノイドの精製物を含有する食品、飼料、化粧品、又は食用色素をも提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]本発明の工程の概略を示す図面である。

発明を実施するための形態

[0014] 即ち、本発明は以下の項目から構成される。

1. 藻類の培養によりフィコシアニンを産生させた後、該フィコシアニンを抽出した残渣（A）からカロテノイドの精製物を得る方法であって、前記残渣（A）からアルカリ性物質の存在下にカロテノイドを抽出する工程（I）を行った後に、ろ過し、

得られたカロテノイド抽出物（B）に含まれるクロロフィルを分解するためのアルカリ性物質を用いたケン化工程（II）と、

その後に行うカロテノイドの析出工程（III）を有し、

カロテノイドを抽出する工程（I）におけるアルカリ性物質の使用量を、フィコシアニンを抽出した残渣（A）の固形分質量（1 kg）に対してxモル相当量とし、

ケン化工程（II）におけるアルカリ性物質の使用量を、カロテノイド抽出物（B）の固形分質量（1 kg）に対してyモル相当量とした場合、

以下の条件を満たすことを特徴とするカロテノイドの精製物を得る方法、

（1）x及びyが以下の何れかの条件を満たす。

1） $1.0 \leq x < 3.0$ 、 $0 < y \leq 6.1$ 、且つ $2.0 \leq x + y \leq 8.0$ である。

2） $2.0 \leq x < 3.0$ 、且つ $y = 0$ である。

（2）カロテノイドを抽出する工程（I）及びケン化工程（II）を行う温度が $30 \sim 50^{\circ}\text{C}$ である。

2. アルカリ性物質が水酸化カリウム、又は水酸化ナトリウムである、1.に記載のカロテノイドの精製物を得る方法、

3. 藻類が、スピルリナ、又はフィコシアニンを含有する藍藻類である 1.、又は 2. に記載のカロテノイドの精製物を得る方法、
4. カロテノイドが、ゼアキサンチン、 β -カロテン、又はミクソキサントフィルである 1. ～ 3. の何れかに記載のカロテノイドの精製物を得る方法、
5. 1. ～ 4. の何れかに記載のカロテノイドの精製物を得る方法により得られたカロテノイドを含有する食品、飼料、化粧品、又は食用色素。

[0015] 本発明では、先ず藻類中のフィコシアニンを水懸濁液中に抽出させた抽出液を得る工程（第一工程）を行う。この抽出液の調製に用いることのできる藻類は、アルスロスピラ（*Arthrospira*）属、スピルリナ（*Spirulina*）属、アフアニゾメノン（*Aphanizomenon*）属、フィッシェレラ（*Fischerella*）属、アナベナ（*Anabaena*）属、ネンジュモ（*Nostoc*）属、シネコキスチス（*Synechocystis*）属、シネココッカス（*Synechococcus*）属、トリポスリクス（*Tolypothrix*）属、スイゼンジノリ（*Aphanothece*）属、マスティゴクラディス（*Mastigoclausa*）属、プルロカプサ（*Pleurocapsa*）属等のフィコシアニンを含有する藻類が挙げられるが、工業的規模で生産され、その安全性が確認されているアルスロスピラに属するものが望ましい。

[0016] 本発明で用いる藻類としては、生の藻類や、乾燥処理した藻類等が挙げられるが、藻類中のフィコシアニンを水懸濁液中に抽出させた抽出液を得る工程においてフィコシアニンが抽出されやすいこと、抽出できるフィコシアニンの量も安定していることから乾燥処理した藻類が好ましい。

[0017] 生の藻類は、例えば、水中で培養された藻を遠心分離、ろ過等の方法により収穫され、通常水分を 70～90 質量%含有している。藻類は、通常水中で自然光、又は人工光により培養されるが、光が照射され光合成を行っている状態の藍藻を収穫するのが好ましい。特に自然光下の屋外培養槽で培養されている藍藻においては、夜間若しくは光照射が始まった直後に収穫された

藍藻よりは、光合成が継続して行われ、水温も上昇してくる午前１０時以降から日没までに収穫された藍藻がより好ましい。

[0018] 乾燥処理した藻類としては、例えば、前記の方法で培養した生の藻類を、凍結乾燥処理したものや、スプレー乾燥処理したもの等が挙げられる。

[0019] 本発明の藻類からのフィコシアニンの抽出方法は第一工程で抽出液を得て、第二工程で該抽出液中でカルシウム塩とリン酸塩とを反応させてリン酸カルシウムを得ると共に、該リン酸カルシウムにフィコシアニンの夾雑物を吸着させ、吸着物を得る。第二工程でこのような操作を行うには、例えば、第一工程と第二工程を下記の通りそれぞれ行えば良い。

１．前記第一工程が藻類とカルシウム塩とを含有する水懸濁液を調製し、藻類中のフィコシアニンを水懸濁液中に抽出させた抽出液を得る工程で、第二工程が前記抽出液にリン酸塩を添加してリン酸カルシウムを得ると共に該リン酸カルシウムにフィコシアニンの夾雑物を吸着させ吸着物を得る工程。

２．前記第一工程が藻類とリン酸塩とを含有する水懸濁液を調製し、藻類中のフィコシアニンを水懸濁液中に抽出させた抽出液を得る工程で、第二工程が前記抽出液にカルシウム塩を添加してリン酸カルシウムを得ると共に該リン酸カルシウムにフィコシアニンの夾雑物を吸着させ吸着物を得る工程。

３．前記第一工程で藻類中のフィコシアニンを水懸濁液中に抽出させた抽出液を得て、第二工程で前記抽出液にリン酸塩とカルシウム塩を添加してリン酸カルシウムを得ると共に該リン酸カルシウムにフィコシアニンの夾雑物を吸着させ吸着物を得る工程。

[0020] なお、本発明では、前記第一工程が藻類とカルシウム塩とリン酸塩とを含有する水懸濁液を調製し、藻類中のフィコシアニンを水懸濁液中に抽出させた抽出液を得る工程で、そのまま第二工程へ進み、前記抽出液でリン酸カルシウムを得ると共に該リン酸カルシウムにフィコシアニンの夾雑物を吸着させ吸着物を得ることもできる。また、前記３．第一工程で、カルシウム塩および／またはリン酸塩を添加しても良い。本発明の藻類からのフィコシアニンの抽出方法では、前記１．の方法のように第一工程として藻類とカルシウム

ム塩とを含有する水懸濁液を調製し、藻類中のフィコシアニンを水懸濁液中に抽出させた抽出液を得る工程をとることにより、藻類中のフィコシアニンの抽出時間が短縮化でき、フィコシアニンの夾雑物、特にカロテノイドの溶出が少ない抽出液を得られることから好ましい。以下の第一工程と第二工程の説明は1.の方法を前提として行う。

[0021] 第一工程で抽出液を得る方法としては、例えば、藻類とカルシウム塩を含有する水懸濁液を調製し、この抽出液を0～40℃に保持して藻類中のフィコシアニンを抽出させる方法等が挙げられる。

[0022] 前記水懸濁液を得るには、例えば、
第1法、藻類を懸濁した水溶液にカルシウム塩を加える、
第2法、カルシウム塩の水溶液に藻類を加え懸濁する、等の方法が挙げられるが、第2法、が好ましい。

[0023] 本発明で用いるカルシウム塩の水溶液の調製に用いるカルシウム塩としては、例えば、塩化カルシウム、硝酸カルシウム、亜硝酸カルシウム等の水溶性のカルシウム塩が挙げられるが、中でも、塩化カルシウムが好ましい。

[0024] 水懸濁液中のカルシウム塩の濃度は0.1～10質量%が好ましく、0.1～5質量%がより好ましく、0.5～3質量%が更に好ましい。

[0025] 藻類をカルシウム塩の水溶液に懸濁し、水懸濁液を得る際は、藍藻分の濃度が、固形分換算で0.1～20質量%となる範囲でカルシウム塩の水溶液に懸濁するのが好ましく、2～8質量%となる範囲がより好ましい。

[0026] 懸濁液の調製は、水懸濁液の温度が0～40℃となる範囲で行うのが好ましく、0～35℃がより好ましい。

[0027] 藻類とカルシウム塩とを含有する水懸濁液を調製し、藻類中のフィコシアニンを水懸濁液中に抽出させて抽出液を得る。フィコシアニンは静置する事により藻類から抽出してくるが、必要に応じて攪拌しても良い。抽出にかかる時間は1～48時間が好ましく、1～20時間がより好ましい。

[0028] 抽出液を得る際に水懸濁液に対して塩基性化合物の添加や超音波照射処理を行う事により藻類中のフィコシアニンを効率よく水懸濁液中に抽出するこ

とができる。塩基性化合物の添加と超音波照射処理を両方行っても良いし、どちらか片方のみを行っても良い。両方行う際には超音波照射を行った後に塩基性化合物を添加しても良いし、塩基性化合物を添加した後に超音波照射処理を行っても良いが、塩基性化合物を添加した後に超音波照射処理を行うのが好ましい。

[0029] 超音波照射処理を行う際の照射方法は、藻類の細胞を破壊し、フィコシアニンの懸濁液中への移行を促進させることができれば制限はなく、バッチ式や連続式等が挙げられるが、なかでも、連続的に超音波を照射する連続式が好ましい。連続式の超音波照射処理装置としては、例えば、(株)日本精機製作所の生産用多連式超音波分散装置等が挙げられる。

[0030] 第一工程で得られたフィコシアニンの水抽出液に第二工程でリン酸塩を加える。リン酸塩は、固体のまま添加しても良いし、水溶液とした状態で添加しても良い。リン酸塩としては、例えば、リン酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム等のリン酸ナトリウム；リン酸カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム等のリン酸カリウム；リン酸マグネシウム；リン酸二水素アンモニウム等の水溶性無機塩が挙げられるが、中でも、リン酸ナトリウム、リン酸カリウムが好ましく、リン酸ナトリウムが特に好ましく、リン酸水素二ナトリウムが最も好ましい。

[0031] リン酸塩は、リン酸塩の濃度が抽出液中で1～5質量%の濃度になるよう抽出液に添加するのが好ましく、2～3質量%の濃度になるよう抽出液に添加するのがより好ましい。

[0032] 前記抽出液にリン酸塩を添加する。抽出液にリン酸塩を添加すると、リン酸塩が、水抽出液中のカルシウム塩と反応し、リン酸カルシウムの沈殿を生じると共にフィコシアニン色素と夾雑しているクロロフィル等の夾雑物がリン酸カルシウムに吸着し吸着物を形成する。これによりフィコシアニン色素の純度を高くすることができる。該リン酸塩を添加した後は静置しても良いし、必要に応じて攪拌しても良い。カルシウムイオンとリン酸イオンの反応（吸着）にかかる時間は2～10時間が好ましく、3～5時間がより好ましい。

。

[0033] リン酸塩と藻類とを吸着させて抽出液中で吸着物を得る際のpHは得られるフィコシアニンの量が多くなることから4～8が好ましく、5～6がより好ましい。pHの調製は例えば、抽出液に塩基性化合物または酸性化合物を添加する事によって行う事ができる。塩基性化合物としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等のアルカリ化合物；炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、炭酸リチウム等のアルカリ金属の炭酸塩；炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素リチウム等のアルカリ金属の炭酸水素塩；酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸リチウム等のアルカリ金属の酢酸塩等が挙げられる。酸性化合物としては、例えば、クエン酸、塩酸、乳酸、酢酸、等が挙げられる。また、抽出液のpHは、あらかじめ水懸濁液に塩基性化合物または酸性化合物を添加しておくことで調整する事もできる。このときの水懸濁液のpHは7～6に調整しておくこと、抽出液のpHが好ましい5～6となる。

[0034] 第三工程で第二工程終了後の抽出液から藻類の残渣及び前記吸着物を除去するが、第三工程より前に抽出液にキレート剤を含有させておくと、フィコシアニンの回収量を増やす事ができるので特に好ましい。これは、フィコシアニンにはフィコシアニンCとアロフィコシアニンがあり、アロフィコシアニンはリン酸カルシウムに吸着し、このリン酸カルシウムに吸着したアロフィコシアニンは次の第三工程でリン酸カルシウムと共に除去されてしまうが、第三工程より前にキレート剤を抽出液に含有させておくと、キレート剤がリン酸カルシウムに吸着し、それによりアロフィコシアニンがリン酸カルシウムから離れ、抽出液に残存するからであると発明者は考えている。

[0035] キレート剤を含有させるのは、第三工程より前に行えばよく、例えば、第一工程で藻類の水懸濁液に加えても良いし、調製した抽出液に加えても良いし、第二工程で吸着物を得る前に抽出液に加えても良いし、吸着物を得た後に加えても良い。本発明では、懸濁液調整時に加えるのが好ましい。

[0036] 前記キレート剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム、シュウ酸ナトリ

ウム、酒石酸ナトリウム、グルコン酸ナトリウム等の有機カルボン酸塩類；ニトリロ三酢酸（NTA）、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミノ五酢酸（DTPA）等のアミノカーボネート類；ジヒドロキシエチルグリシン（DFG）、トリエタノールアミン（TEA）、N-（2-ヒドロキシエチル）イミノ二酢酸（HEDTA），ヒドロキシエチレンジアミン四酢酸（HEDTA）等のヘドロキシアミノカーボネート類；カルボキシメチルタルトロン酸ナトリウム（CMT）、カルボキシメチルオキシコハク酸ナトリウム（CMOS）等のエーテルカルボン酸塩類等が挙げられる。中でもクエン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸ナトリウムがより好ましい。

[0037] キレート剤の添加量は、塩化カルシウムの使用量を基準として5～100質量%が好ましく、10～40質量%がより好ましい。

[0038] 第三工程で抽出液から藻類の残渣を得ることできる。これらを得る手段としては、種々の方法が挙げられ、例えば、ろ紙やろ布等のろ材を用いたろ過方法や、沈殿から上澄みを回収することにより行うデカンテーション法、遠心分離方法等が挙げられる。なかでも、遠心分離による分離が好ましい。

[0039] 遠心分離は、抽出液から藻類の残渣及び吸着物を除去できる条件であれば良いが、重力加速度が1,000～30,000Gで10秒～2時間の遠心分離条件が好ましく、重力加速度が3,000～10,000Gで1～30分間の遠心分離条件が、より好ましい。遠心分離機としては、ディスラッジ型遠心分離機、アルファ型遠心分離機、シャープレス型遠心分離機があるが、作業性が向上することから、ディスラッジ型遠心分離機とアルファ型遠心分離機の組み合わせによる連続遠心分離が好ましい。

また、得られた残渣については、含有するカロテノイド、特にゼアキサンチンの劣化を防ぐため、また、腐敗を防ぐために、スプレードライヤー法、凍結乾燥法等により乾燥させることが好ましい。

[0040] 次に、前記の操作で得られた残渣（A）から、カロテノイドを抽出する工程（I）を行う。

本発明においては、この抽出工程をアルカリ性物質の存在下に行うことに特徴を有する。用いられるアルカリ性物質としては、通常用いられるものを挙げることができるが、好ましいものとして、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ性物質を挙げることができる。

抽出法としては、エタノール、又は水 - エタノール混合溶液を用いた溶剤抽出法を行うことが好ましい。

さらに、水 - エタノール混合溶液を用いる場合には、99質量%～80質量%であることが好ましい。

抽出する際の温度は30～50℃の範囲を挙げることができる。好ましい抽出時間としては、30分～24時間を挙げることができる。

[0041] 次に、前記の操作で得られた抽出液をろ過する工程を行う。ろ過工程は公知慣用の方法で行うことができ、例えば、市販のろ紙を用いてろ過する事もできる。

[0042] ろ過後の抽出液の濃縮を行い、カロテノイド抽出物（B）を得る。

該抽出物（B）の固形成分質量は、抽出物（B）の2.0質量%～33質量%が好ましく、2.0質量%～6.6質量%がより好ましく、2.0質量%～3.3質量%とすることが特に好ましい。

ここで、固形成分質量は、得られた該抽出液の一部を40℃で加温しながら、真空度10kPa以下で溶媒を留去した後、105℃で乾燥後測定する。

[0043] 次に、得られたカロテノイド抽出物（B）に含まれるクロロフィルを分解するためのアルカリ性物質を用いたケン化工程（11）を行う。本工程は、当該抽出物（B）に含まれるクロロフィルを分解・除去することを目的とする。

本発明においては、アルカリ性物質を用いた抽出工程（1）及びケン化工程（11）を行うことに特徴を有し、更に抽出効率の向上と、クロロフィルの効率的な除去のために、アルカリ性物質の使用量が、特定の範囲内であることに特徴を有する。

より具体的には、本発明では、以下のアルカリ性物質の使用量が好ましい。
。

カロテノイドを抽出する工程（１）におけるアルカリ性物質の使用量を、フィコシアニンを抽出した残渣（Ａ）の固形分質量（１ｋｇ）に対して x モル相当量とし、

ケン化工程（１１）におけるアルカリ性物質の使用量を、カロテノイド抽出物（Ｂ）の固形分質量（１ｋｇ）に対して y モル相当量とした場合、

以下の条件を満たすことを特徴とするカロテノイドの精製物を得る方法。

（１） $1.0 \leq x < 3.0$ 、 $0 < y \leq 6.1$ 、且つ $2.0 \leq x + y \leq 8.0$ であるが、 x が２以上の場合には、 $y = 0$ であってもよい。

[0044] 前記 x 、及び y の値は、各々で特定の範囲であることが好ましいだけでなく、相互の数値が互いに影響し合う関係であることを見出したことに本発明の特徴がある。

例えば、 x の値が 1.0 未満であると、最終精製物中のクロロフィル含有率が高く、かつ、工程（１１）の後に行われる、カロテノイド回収のためのろ過工程において閉塞が起こり好ましくなく、 3.0 以上であると、工程（１）のゼアキサンチン回収率が低くなり、かつ、カロテノイド回収のためのろ過工程において閉塞が起こり好ましくない。

また、この x が、 $1.0 \leq x < 3.0$ 範囲内であっても、 $x + y$ が $2.0 \leq x + y \leq 8.0$ の範囲を外れる場合には、 $x + y$ が 2.0 未満であるとクロロフィルや脂質が十分にケン化されないため、精製物中のゼアキサンチン含有率が低くなり、クロロフィル含有率は高くなる。また、 8.0 を超えるとゼアキサンチン回収率が低くなり好ましくない。

或いは、 $2.0 \leq x < 3.0$ 、且つ $y = 0$ である場合も、本発明の範囲である。

x がこの範囲内にある場合には、ケン化工程（１１）を行わなくても本発明の課題を解決することができる。

[0045] 用いるアルカリ性物質の質量は、アルカリ性物質の実質量に換算した数値

の質量を用いる。例えば、アルカリ性物質として水酸化カリウムを用いる場合には、市販水酸化カリウムは、８５％程度の含量であるので、これを換算した数値の質量を用いる。

前記アルカリ性物質の添加量を用いた場合には、目的とするケン化は、３０℃以上において短時間で行うことができるが、クロロフィルを十分にケン化するには、溶液を均一になるよう攪拌しながら３０～５０℃で行うのが好ましい。

[0046] ケン化に要する時間は、通常、３０分～２４時間を挙げることができる。この時間より短いとクロロフィルのケン化が不十分であり、また、長いとカロテノイドの劣化が起こるため好ましくない。

[0047] 次に、カロテノイド精製物を得るための析出工程（１１１）を行う。本工程では、カロテノイド析出の際に溶媒濃度調整を行うことが好ましく、析出物の洗浄液の濃度調整のために水を添加することが好ましい。

[0048] 本発明では、さらに珪藻土ろ過、珪藻土洗浄、及び珪藻土溶出する工程を行ってもよい。

即ち、本工程では、例えば４５質量％のエタノール水でカロテノイドを析出させた溶液を珪藻土でろ過後、ろ過物を４５質量％のエタノール水で洗浄して不純物を溶出することにより、除去することができる。

次いで、９５質量％のエタノール水でろ過物を溶出して、カロテノイド溶出液を精製することができる。

本工程は、当該精製されたカロテノイド溶出液には、ゼアキサンチンが豊富に含まれる効果がある。

[0049] 本発明より得られる、カロテノイドは、機能性製品として、食品、飼料、化粧品、食用色素等に含有させて、各用途で用いることができる。

前記機能性製品としての食品、飼料、化粧品、食用色素等の製造方法は、公知慣用の方法を挙げることができる。

実施例

[0050] 以下、本発明に係る測定法に続き、実施例、比較例により本発明をより具

体的に説明する。

[0051] <ゼアキサンチン標準液の作製>

ゼアキサンチン標準粉末（EXTRASYNTHES社製）5mgをメチルtert-ブチルエーテル：アセトニトリル＝1：1（容量比）に溶解し、100mLに定容したものをゼアキサンチン標準液とする。

[0052] <ゼアキサンチン標準液の濃度測定>

ゼアキサンチン標準液1mLをメチルtert-ブチルエーテル：アセトニトリル＝1：1（容量比）で20mLに定容し、452nmの吸光度を測定し、下記計算式によりゼアキサンチン濃度を算出する。

具体的には、ゼアキサンチン標準液濃度（mg／100g）は吸光度×10000／2340で得られる。

[0053] <残渣（A）のゼアキサンチン含有率測定>

残渣（A）のゼアキサンチン濃度は、残渣（A）にノルマルヘキサン：アセトン：エタノール：トルエン＝10：7：6：7（容量比）混合溶媒を加え、還流させながら30分間抽出する。該抽出液を定容後、溶媒をメチルtert-ブチルエーテル：アセトニトリル＝1：1（容量比）に置換後、φ0.2μmのシリンジフィルターでろ過し、条件（あ）に設定したUPLCで測定し、ゼアキサンチン標準液の測定から得た検量線から算出した。

具体的には、条件（A）は、カラムにAcquity UPLC HSS T3（φ2.1mm×100mm，1.8μm）を用い、移動相に溶媒1としてアセトニトリル：メタノール：メチルtert-ブチルエーテル＝70：20：10（容量比）を溶媒2として10mM酢酸アンモニウム水溶液を用い、溶媒1の濃度勾配は60％－4min－75％－10min－100％－10min－98％－1min－60％（3min）、流量0.3～0.35mL、カラムオープン温度40℃である。

[0054] <残渣（A）中の残留フィコシアニン測定>

残渣（A）0.5gにリン酸緩衝液（pH＝6）25mLを加え、均一に懸濁した後、30℃で16時間静置し、15分間遠心分離する。上澄液をろ

紙でろ過する。620 nm、560 nm、650 nmの吸光度を測定し、下記計算式によりフィコシアニン濃度を算出する。

具体的には、Cフィコシアニン濃度 (g/L) は $0.198 \times 620 \text{ nm}$ の吸光度 $- 0.0019 \times 560 \text{ nm}$ の吸光度 $- 0.133 \times 560 \text{ nm}$ の吸光度で算出される。

また、アロフィコシアニン濃度 (g/L) は $0.204 \times 650 \text{ nm}$ の吸光度 $- 0.519 \times 620 \text{ nm}$ の吸光度 $- 0.019 \times 650 \text{ nm}$ の吸光度で算出され、総フィコシアニン濃度 (g/L) はCフィコシアニン+アロフィコシアニンで算出される。

[0055] <残渣 (A) 中の溶解性カルシウム、マグネシウム測定>

残渣 (A) 10 g に95質量%のエタノール水溶液30 gを加え、50℃で1時間攪拌した。20℃に冷却した後、4000 Gで15分遠心分離し、上澄み10 gを取り、0.45 μmシリンジフィルターに通し、残渣 (A) のエタノール抽出液を得た。本エタノール抽出液および、前述の水抽出液50 μLを蛍光X線分析用ろ紙に滴下乾燥させて、Rigaku社製蛍光X線分析装置ZSX100eを用い、全元素定量分析を行った。

[0056] <最終精製物中のゼアキサンチン含有率測定>

最終精製物のゼアキサンチン含有率は、最終精製物をメチルtertブチルエーテル：アセトニトリル=1：1（容量比）に溶解し、置換後、φ0.2 μmのシリンジフィルターでろ過し、条件 (a) に設定したUPLC (WACQUITY UPLC; Waters) で測定し、ゼアキサンチン標準液の測定から得た検量線から算出した。

[0057] <ゼアキサンチン回収率の算出>

残渣 (A) から最終精製物に至るまでのゼアキサンチン回収率は、最終精製物のゼアキサンチン濃度と残渣 (A) のゼアキサンチン濃度から算出することができる。すなわち、最終精製物のゼアキサンチン回収率=最終精製物のゼアキサンチン濃度/残渣 (A) のゼアキサンチン濃度×100%で算出することができ、各工程のゼアキサンチン回収率も同様に算出することがで

きる。

[0058] <最終精製物中のクロロフィルの含有率>

最終精製物を 85 質量%アセトン水溶液に溶媒置換する。アセトンを加え、3 G 2 ガラスフィルタでろ過し、ろ過残渣を 85 質量%アセトン水溶液で洗浄する。ろ液にジエチルエーテル（エーテル）と水を 1 : 1 の比率で加え、分配し、エーテル層を分取する。水層にエーテルを半分量さらに、水をエーテルと同量加え分配し、得られたエーテル層を初めに分配したエーテル層に加える。合わせたエーテル層に水を等量加え分配し、エーテル層を得る。水を加え、エーテル層を得る操作を 3 回繰り返す、最終的に得たエーテル層の 642.5 nm と 660 nm の吸光度を測定し、計算式 (C) で総クロロフィル含量を算出することが出来る。

具体的には、計算式 (C) は、クロロフィル含有率 (%) = エーテル容量 (L) × (16.8 × 642.5 nm の吸光度 + 7.12 × 660 nm の吸光度) / 試料の量 (mg) × 100% で得られる。

[0059] <カロテノイド析出物回収時のろ過速度の測定>

カロテノイド析出工程 (111) の後に行われる、析出カロテノイド回収のためのろ過のろ過速度を以下の様に測定した。残渣 (A) 40 g から生じたカロテノイド析出液を、濾過助剤 1 cm をプリコートした 1.8 cm² のろ剤に通じ、0.02 MPa で吸引濾過して、単位時間当たりの濾過量を測定した。その際、ろ過速度が 10 mL / cm² / 時間以下になった時点で閉塞と判断した。

[0060] (製造例 1) <残渣 (A) の製造>

人工光を使用し、7 日間連続光照射下の培養槽でスピルリナを培養生産し、収穫した。得られた生の藻体 1 kg (固形分量 18.0%) を 1% 塩化カルシウム溶液 6 L (0.09 モル / リットル) に加え、攪拌機により 20℃ で 45 分間攪拌を行いスピルリナ懸濁液を得た。炭酸ナトリウム 3 g と炭酸水素ナトリウム 3 g を 50 mL の水に溶解し、スピルリナ懸濁液に添加 (懸濁液中の塩基性化合物の濃度は、0.01 モル / リットル) した。この懸濁液

を2分間攪拌後、20℃で5時間、静置した。この懸濁液を連続式超音波破碎装置〔(株)日本精機製作所RUS-300TCVP型、周波数19.5kHz、超音波照射部の容積10mL、出力300W〕に導き、懸濁液を5mL/秒の速度で超音波照射部に送り超音波処理を行い、抽出液を得た。得られた抽出液にリン酸二水素ナトリウムが6.8g/リットル、リン酸水素二ナトリウムが2.2g/リットルの濃度になる様に加え、攪拌後、遠心分離機に導き、重力加速度が10,000Gで、15分間の遠心分離を行い、固形分とフィコシアニン溶液をろ別した。さらに、該固形分をスプレードライヤー法で乾燥させることで残渣(A)(ロットe、ロットf)を得た。

[0061] 残渣(A)ロットe中に残留する総フィコシアニンは2.4質量%、でカルシウム含有率は0.21質量%、マグネシウム含有率は0.01質量%であった。また、エタノール抽出液のカルシウム含有率は0.06質量%、マグネシウム含有率は0.03質量%であった。

残渣(A)ロットf中に残留する総フィコシアニンは0.9質量%、の水抽出液の620nm吸光度は4.88cm⁻¹でカルシウム含有率は0.10質量%、マグネシウムは検出されなかった。また、エタノール抽出液のカルシウムは検出されず、マグネシウム含有率は0.01質量%であった。

[0062] (実施例1)

630gの88質量%EtOH aq.中に25質量%KOH/EtOHを84g添加した後、残渣(A)ロットe210gを加え、30℃、1時間、150rpmで攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を88質量%EtOH aq.で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで630gに減圧濃縮し、抽出液(B)を得た。なお、この抽出液に含まれる固形分は21gだった。抽出液(B)に25質量%KOH/EtOHを4.2g添加した。30℃、1時間、100rpmで攪拌しながらケン化し、水溶化したケン化クロロフィルを有するケン化抽出液を得た。該ケン化抽出液に珪藻土を13.13g添加し、温度を50℃に昇温した。水を添加し、水エタノール濃度を45質量%に調整した。30分以

上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ 1 c m にプリコートした珪藻土に通液し、析出物と液体をろ別した後、45 質量% E t O H a q. で洗浄し、不純物を除去した。不純物を除去した該析出物を 88 質量% E t O H a q. で溶出し、溶媒を溜去して最終精製物を得た。

残渣（A）から最終精製物に至るまでのゼアキサンチン回収率と、最終精製物中のゼアキサンチン含有率とクロロフィル含有率を算出した。測定結果は、ゼアキサンチン回収率 79%、ゼアキサンチン含有率 10%、クロロフィル含有率 0.1% 以下であった。

[0063]（実施例 2）

120 g の 90 質量% E t O H a q. 中に 25 質量% K O H / E t O H を 16 g 添加した後、残渣（A）ロット e 40 g を加え、50℃、1 時間、150 r p m で攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を 90 質量% E t O H a q. で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで 60 g に減圧濃縮し、抽出液（B）を得た。抽出液（B）に 25 質量% K O H / E t O H を 0.8 g 添加した。50℃、1 時間、100 r p m で攪拌しながらケン化し、水溶化したケン化クロロフィルを有するケン化抽出液を得た。該ケン化抽出液に珪藻土を 2.5 g 添加した。水を添加し、水エタノール濃度を 45 質量% に調整した。30 分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ 1 c m にプリコートした珪藻土に通液し、析出物と液体をろ別した後、45 質量% E t O H a q. で洗浄し、不純物を除去した。不純物を除去した該析出物を 90 質量% E t O H a q. で溶出し、溶媒を溜去して最終精製物を得た。

最終精製物において、ゼアキサンチン回収率 58%、ゼアキサンチン含有率 4%、クロロフィル含有率 0.1% 以下であった。

[0064]（実施例 3）

120 g の 95 質量% E t O H a q. 中に 25 質量% K O H / E t O H を 16 g 添加した後、残渣（A）ロット e 40 g を加え、50℃、1 時間、1

50 rpmで攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を95質量% EtOH aq. で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで120 gに減圧濃縮し、抽出液（B）を得た。抽出液（B）に25質量% KOH / EtOHを0.8 g添加した。50℃、1時間、100 rpmで攪拌しながらケン化し、水溶化したケン化クロロフィルを有するケン化抽出液を得た。該ケン化抽出液に珪藻土を2.5 g添加した。水を添加し、水エタノール濃度を45質量%に調整した。30分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ1 cmにプリコートした珪藻土に通液し、析出物と液体をろ別した後、45質量% EtOH aq. で洗浄し、不純物を除去した。不純物を除去した該析出物を95質量% EtOH aq. で溶出し、溶媒を溜去して最終精製物を得た。

最終精製物において、ゼアキサンチン回収率83%、ゼアキサンチン含有率7.6%、クロロフィル含有率0.1%以下であった。

[0065] （実施例4）

120 gの88質量% EtOH aq. 中に25質量% KOH / EtOHを16 g添加した後、残渣（A）ロットe 40 gを加え、30℃、1時間、150 rpmで攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を88質量% EtOH aq. で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで120 gに減圧濃縮し、抽出液（B）を得た。抽出液（B）に25質量% KOH / EtOHを6.4 g添加した。30℃、1時間、100 rpmで攪拌しながらケン化し、水溶化したケン化クロロフィルを有するケン化抽出液を得た。

[0066] 該ケン化抽出液に珪藻土を2.5 g添加し、温度を50℃に昇温した。水を添加し、水エタノール濃度を45質量%に調整した。30分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ1 cmにプリコートした珪藻土に通液し、析出物と液体をろ別した後、45質量% EtOH aq. で洗浄し、不純物を除去した。不純物を除去した該析出物を88質量% EtOH aq. で溶出し、溶媒を溜去して最終精製物を得た。

最終精製物において、ゼアキサンチン回収率 79%、ゼアキサンチン含有率 33.5%、クロロフィル含有率 0.1%以下であった。

[0067] (実施例 5)

120g の 88 質量% EtOH aq. 中に 25 質量% KOH/EtOH を 28g 添加した後、残渣 (A) ロット e 40g を加え、30℃、1 時間、150rpm で攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を 88 質量% EtOH aq. で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで 120g に減圧濃縮し、抽出液 (B) を得た。抽出液 (B) に珪藻土を 2.5g 添加した。水を添加し、水エタノール濃度を 45 質量% に調整した。30 分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ 1cm にプリコートした珪藻土に通液し、析出物と液体をろ別した後、45 質量% EtOH aq. で洗浄し、不純物を除去した。不純物を除去した該析出物を 88 質量% EtOH aq. で溶出し、溶媒を溜去して最終精製物を得た。

最終精製物において、ゼアキサンチン回収率 72%、ゼアキサンチン含有率 13.8%、クロロフィル含有率 0.1%以下であった。

[0068] (実施例 6)

120g の 88 質量% EtOH aq. 中に 25 質量% KOH/EtOH を 16g 添加した後、残渣 (A) ロット e 40g を加え、30℃、1 時間、150rpm で攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を 88 質量% EtOH aq. で再度抽出し、ろ液に加えることで、抽出液 (B) を得た。抽出液 (B) に 25 質量% KOH/EtOH を 0.8g 添加し、30℃、1 時間、100rpm で攪拌しながらケン化し、水溶化したケン化クロロフィルを有するケン化抽出液を得た。該ケン化抽出液に珪藻土を 2.5g 添加し、温度を 50℃ に昇温した。水を添加し、水エタノール濃度を 45 質量% に調整した。30 分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ 1cm にプリコートした珪藻土に通液し、析出物と液体をろ別した後、45 質量% EtOH aq. で洗浄し、不

純物を除去した。不純物を除去した該析出物を 88 質量% EtOH aq. で溶出し、溶媒を溜去して最終精製物を得た。

最終精製物において、ゼアキサンチン回収率 75%、ゼアキサンチン含有率 8.0%、クロロフィル含有率 0.1% 以下であった。

[0069] (実施例 7)

120 g の 88 質量% EtOH aq. 中に 25 質量% KOH / EtOH を 16 g 添加した後、残渣 (A) ロット e 40 g を加え、30℃、1 時間、150 rpm で攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を 88 質量% EtOH aq. で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで 120 g に減圧濃縮し、抽出液 (B) を得た。抽出液 (B) に 25 質量% KOH / EtOH を 0.8 g 添加し、30℃、1 時間、100 rpm で攪拌しながらケン化し、水溶化したケン化クロロフィルを有するケン化抽出液を得た。該ケン化抽出液に珪藻土を 2.5 g 添加した。水を添加し、水エタノール濃度を 45 質量% に調整した。30 分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ 1 cm にブリコートした珪藻土に通液し、析出物と液体をろ別した後、45 質量% EtOH aq. で洗浄し、不純物を除去した。不純物を除去した該析出物を 88 質量% EtOH aq. で溶出し、溶媒を溜去して最終精製物を得た。

最終精製物において、ゼアキサンチン回収率 83%、ゼアキサンチン含有率 5.3%、クロロフィル含有率 0.1% 以下であった。

[0070] (実施例 8)

120 g の 88 質量% EtOH aq. 中に 25 質量% KOH / EtOH を 16 g 添加した後、残渣 (A) ロット e 40 g を加え、30℃、1 時間、150 rpm で攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を 88 質量% EtOH aq. で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで 120 g に減圧濃縮し、抽出液 (B) を得た。抽出液 (B) に 25 質量% KOH / EtOH を 3.2 g 添加し、30℃、1 時間、100 rpm で攪拌しながらケン化し、水溶化したケン化クロロフィルを有

するケン化抽出液を得た。該ケン化抽出液に珪藻土を2.5 g添加し、温度を50℃に昇温した。水を添加し、水エタノール濃度を55質量%に調整した。30分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ1 cmにプリコートした珪藻土に通液し、析出物と液体をろ別した後、55質量% EtOH aq. で洗浄し、不純物を除去した。不純物を除去した該析出物を88質量% EtOH aq. で溶出し、溶媒を溜去して最終精製物を得た。

最終精製物において、ゼアキサンチン回収率70%、ゼアキサンチン含有率43.5%、クロロフィル含有率0.1%以下であった。

[0071] (実施例9)

120 gの88質量% EtOH aq. 中に25質量% KOH/EtOHを16 g添加した後、残渣(A) ロットe 40 gを加え、30℃、1時間、150 rpmで攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を88質量% EtOH aq. で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで120 gに減圧濃縮し、抽出液(B)を得た。抽出液(B)に25質量% KOH/EtOHを3.2 g添加し、30℃、1時間、100 rpmで攪拌しながらケン化し、水溶化したケン化クロロフィルを有するケン化抽出液を得た。該ケン化抽出液に珪藻土を2.5 g添加し、温度を50℃に昇温した。水を添加し、水エタノール濃度を35質量%に調整した。30分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ1 cmにプリコートした珪藻土に通液し、析出物と液体をろ別した後、35質量% EtOH aq. で洗浄し、不純物を除去した。不純物を除去した該析出物を88質量% EtOH aq. で溶出し、溶媒を溜去して最終精製物を得た。

最終精製物において、ゼアキサンチン回収率74%、ゼアキサンチン含有率39.5%、クロロフィル含有率0.1%以下であった。

[0072] (実施例10)

120 gの88質量% EtOH aq. 中に25質量% KOH/EtOHを

16 g 添加した後、残渣 (A) ロット f 120 g を加え、30℃、1 時間、150 rpm で攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を 88 質量% EtOH aq. で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで 120 g に減圧濃縮し、抽出液 (B) を得た。抽出液 (B) に 25 質量% KOH / EtOH を 0.8 g 添加した。30℃、1 時間、100 rpm で攪拌しながらケン化し、水溶化したケン化クロロフィルを有するケン化抽出液を得た。該ケン化抽出液に珪藻土を 2.5 g 添加し、温度を 50℃ に昇温した。水を添加し、水エタノール濃度を 45 質量% に調整した。30 分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ 1 cm にプリコートした珪藻土に通液し、析出物と液体をろ別した後、45 質量% EtOH aq. で洗浄し、不純物を除去した。不純物を除去した該析出物を 88 質量% EtOH aq. で溶出し、溶媒を溜去して最終精製物を得た。

最終精製物において、ゼアキサンチン回収率 74%、ゼアキサンチン含有率 13.2%、クロロフィル含有率 0.1% 以下であった。

[0073] (比較例 1)

120 g の 88 質量% EtOH aq. 中に残渣 (A) ロット e 40 g を加え、30℃、1 時間、150 rpm で攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を 88 質量% EtOH aq. で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで 120 g に減圧濃縮し、抽出液 (B) を得た。抽出液 (B) に 25 質量% KOH / EtOH を 4 g 添加した。30℃、1 時間、100 rpm で攪拌しながらケン化し、水溶化したケン化クロロフィルを有するケン化抽出液を得た。該ケン化抽出液に珪藻土を 2.5 g 添加した。水を添加し、水エタノール濃度を 45 質量% に調整した。30 分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ 1 cm にプリコートした珪藻土に通液したところ、珪藻土が閉塞した。

[0074] (比較例 2)

120 gの88質量%EtOH aq. 中に25質量%KOH/EtOHを32 g添加した後、残渣(A)ロットe40 gを加え、30℃、1時間、150 rpmで攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を88質量%EtOH aq. で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで120 gに減圧濃縮し、抽出液(B)を得た。30℃、1時間、100 rpmで攪拌した後に珪藻土を2.5 g添加し、温度を50℃に昇温した。水を添加し、水エタノール濃度を45質量%に調整した。30分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ1 cmにプリコートした珪藻土に通液したところ、珪藻土が閉塞した。

[0075] (比較例3)

120 gの88質量%EtOH aq. 中に25質量%KOH/EtOHを8 g添加した後、残渣(A)ロットe40 gを加え、30℃、1時間、150 rpmで攪拌しながら、ゼアキサンチンを抽出した。ろ過で固液分離し、固形分を88質量%EtOH aq. で再度抽出し、ろ液に加えた。ロータリーエバポレーターで120 gに減圧濃縮し、抽出液(B)を得た。30℃、1時間、100 rpmで攪拌した後に珪藻土を2.5 g添加し、温度を50℃に昇温した。水を添加し、水エタノール濃度を45質量%に調整した。30分以上攪拌し、赤色の物質を析出させた。該析出物を有するケン化抽出液を厚さ1 cmにプリコートした珪藻土に通液し、析出物と液体をろ別した後、45質量%EtOH aq. で洗浄し、不純物を除去した。不純物を除去した該析出物を88質量%EtOH aq. で溶出し、溶媒を溜去して最終精製物を得た。

最終精製物において、ゼアキサンチン回収率68%、ゼアキサンチン含有率1.5%、クロロフィル含有率0.13%であった。

結果を下記の表に示した。

[0076]

[表1]

		実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5
試料	フィコシアニン残渣	lot_e	lot_e	lot_e	lot_e	lot_e
抽出	温度	30°C	50°C	50°C	30°C	30°C
	EtOH濃度	88wt%	90wt%	95wt%	88wt%	88wt%
	アルカリ性物質	種類	KOH	KOH	KOH	KOH
		濃度	1.5mol	1.5mol	1.5mol	2.7mol
			10wt%	10wt%	10wt%	17.5wt%
濃縮		3.3wt%	6.6wt%	3.3wt%	3.3wt%	3.3wt%
ケン化	温度	30°C	30°C	50°C	30°C	30°C
	アルカリ性物質	種類	KOH	KOH	KOH	KOH
		濃度	0.8mol	0.8mol	0.8mol	6.1mol
			0.5wt%	0.5wt%	0.5wt%	4.0wt%
析出	温度	50°C	50°C	50°C	50°C	50°C
	EtOH濃度	45wt%	45wt%	45wt%	45wt%	45wt%
洗浄	EtOH濃度	45wt%	45wt%	45wt%	45wt%	45wt%
溶出	EtOH濃度	88wt%	90wt%	95wt%	88wt%	88wt%
珪藻土ろ過性		+	+	+	+	+
ゼアキサンチン回収率		79%	58%	83%	79%	72%
ゼアキサンチン純度		10.0%	4.0%	7.6%	33.5%	13.8%
クロロフィル含有率		<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%
xの数値			1.5	1.5	1.5	1.5
yの数値			0.8	0.8	0.8	6.1
x+yの数値			2.3	2.3	2.3	7.6

[0077]

[表2]

		実施例6	実施例7	実施例8	実施例9	実施例10
試料	フィコシアニン残渣	lot_e	lot_e	lot_e	lot_e	lot_f
抽出	温度	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
	EtOH濃度	88wt%	88wt%	88wt%	88wt%	88wt%
	種類 アルカリ性物質 濃度	KOH	KOH	KOH	KOH	KOH
		1.5mol 10wt%	1.5mol 10wt%	1.5mol 10wt%	1.5mol 10wt%	1.5mol 10wt%
濃縮		2.0wt%	3.3wt%	3.3wt%	3.3wt%	3.3wt%
ケン化	温度	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
	種類 アルカリ性物質 濃度	KOH	KOH	KOH	KOH	KOH
		0.8mol 0.5wt%	0.8mol 0.5wt%	3.0mol 2wt%	3.0mol 2wt%	0.8mol 0.5wt%
析出	温度	50°C	30°C	50°C	50°C	50°C
	EtOH濃度	45wt%	45wt%	55wt%	35wt%	45wt%
洗浄	EtOH濃度	45wt%	45wt%	55wt%	35wt%	45wt%
溶出	EtOH濃度	88wt%	88wt%	88wt%	88wt%	88wt%
珪藻土ろ過性		+	+	+	+	+
ゼアキサンチン回収率		75%	83%	70%	74%	74%
ゼアキサンチン純度		8.0%	5.3%	43.5%	39.5%	13.2
クロロフィル含有率		<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%
xの数値		1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
yの数値		0.8	0.8	3.0	3.0	0.8
x+yの数値		2.3	2.3	4.5	4.5	2.3

[0078]

[表3]

		比較例1	比較例2	比較例3
試料	フィコシアニン残渣	lot_e	lot_e	lot_e
抽出	温度	30℃	30℃	30℃
	EtOH濃度	88wt%	88wt%	88wt%
	種類	—	KOH	KOH
	アルカリ性物質 濃度	—	3.0mol	0.75mol
		—	20wt%	5wt%
濃縮		3.3wt%	3.3wt%	3.3wt%
ケン化	温度	30℃	30℃	30℃
	種類	KOH	KOH	KOH
	アルカリ性物質 濃度	3.8mol	0mol	0mol
		2.5wt%	—	—
析出	温度	50℃	50℃	50℃
	EtOH濃度	45wt%	45wt%	45wt%
洗浄	EtOH濃度	—	—	45wt%
溶出	EtOH濃度	—	—	88wt%
珪藻土ろ過性		NG	NG	+
ゼアキサンチン回収率		—	—	68%
ゼアキサンチン純度		—	—	1.5%
クロロフィル含有率		—	—	0.13%
xの数値		0.0	3.0	0.75
yの数値		3.8	0.0	0.0
x+yの数値		3.8	3.0	0.75

[0079] 表中の記号の意味は以下の通りである。

・珪藻土ろ過性：＋（ろ過が可能）、NG（珪藻土を用いたろ過が閉塞）

[0080] 以上の実施例より、本発明を構成する要件を備えた方法で、ゼアキサンチンの回収率が高く、不純物の含有量の少ないカロテノイドの精製物を得ることができることが明らかである。

また、比較例1では、アルカリ性物質を用いなくて抽出を行ったが、ろ過工程で閉塞が発生し、目的とするカロテノイドの精製物を得ることができなかった。

比較例2では、本発明の範囲外のアルカリ性物質（抽出時使用量が過剰）を用いて抽出を行ったが、ろ過工程で閉塞が発生し、目的とするカロテノイドの精製物を得ることができなかった。

比較例 3 では、本発明の範囲外のアルカリ性物質（抽出時使用量が過少）を用いて抽出を行ったが、クロロフィルの含有率が高く、本発明の課題を解決することができなかった。

産業上の利用可能性

[0081] 本発明で得られるカロテノイド等の精製物は、例えば、食品、飼料、化粧品、食用色素等に含有させた機能性食品、飼料、化粧品、又は食用色素等として利用することができる。

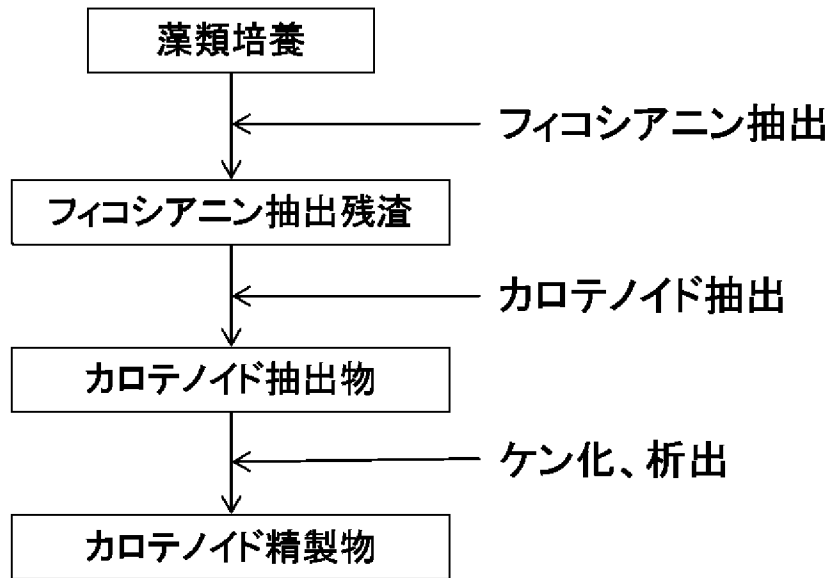
請求の範囲

- [請求項1] 藻類の培養によりフィコシアニンを産生させた後、該フィコシアニンを抽出した残渣（A）からカロテノイドの精製物を得る方法であって、
- 、
- 前記残渣（A）からアルカリ性物質の存在下にカロテノイドを抽出する工程（I）を行った後に、ろ過し、
- 得られたカロテノイド抽出物（B）に含まれるクロロフィルを分解するためのアルカリ性物質を用いたケン化工程（II）と、
- その後に行うカロテノイドの析出工程（III）を有し、
- カロテノイドを抽出する工程（I）におけるアルカリ性物質の使用量を、フィコシアニンを抽出した残渣（A）の固形分重量（1 kg）に対してxモル相当量とし、
- ケン化工程（II）におけるアルカリ性物質の使用量を、カロテノイド抽出物（B）の固形分重量（1 kg）に対してyモル相当量とした場合、
- 以下の条件を満たすことを特徴とするカロテノイドの精製物を得る方法。
- （1）x及びyが以下の何れかの条件を満たす。
- 1） $1.0 \leq x < 3.0$ 、 $0 < y \leq 6.1$ 、且つ $2.0 \leq x + y \leq 8.0$ である。
- 2） $2.0 \leq x < 3.0$ 、且つ $y = 0$ である。
- （2）カロテノイドを抽出する工程（I）及びケン化工程（II）を行う温度が30～50℃である。
- [請求項2] アルカリ性物質が水酸化カリウム、又は水酸化ナトリウムである、請求項1に記載のカロテノイドの精製物を得る方法。
- [請求項3] 藻類が、スピルリナ、又はフィコシアニンを含有する藍藻類である請求項1又は2に記載のカロテノイドの精製物を得る方法。
- [請求項4] カロテノイドが、ゼアキサンチン、 β -カロテン、又はミクソキサン

トフィルである請求項 1 ～ 3 の何れかに記載のカロテノイドの精製物を得る方法。

[請求項5] 請求項 1 ～ 4 の何れかに記載のカロテノイドの精製物を得る方法により得られたカロテノイドを含有する食品、飼料、化粧品、又は食用色素。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/017800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P23/00(2006.01)i, A23K10/37(2016.01)i, A23K20/105(2016.01)i, A23K20/179(2016.01)i, A23L5/44(2016.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K8/31(2006.01)i, A61K8/33(2006.01)i, A61Q1/02(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i,
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)

C12P23/00, A23K10/37, A23K20/105, A23K20/179, A23L5/44, A23L33/10, A61K8/31, A61K8/33, A61Q1/02, A61Q19/00, C07K14/405

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/FSTA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X/P, Y	WO 2016/181719 A1 (DIC Corp.), 17 November 2016 (17.11.2016), entire text (Family: none)	5/1-5
X/A	JP 2001-512030 A (Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem), 21 August 2001 (21.08.2001), paragraph [0001] & US 5935808 A column 1, lines 21 to 35 & EP 1005565 A1	5/1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
21 July 2017 (21.07.17)

Date of mailing of the international search report
01 August 2017 (01.08.17)

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/JP2017/017800

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2015-507642 A (Nutritional Therapeutics, Inc., D/B/ANTI Inc.), 12 March 2015 (12.03.2015), paragraph [0150] & US 2014/0134228 A1 paragraph [0177] & EP 2780032 A1 & KR 10-2014-0108281 A	5/1-4
X/A	JP 2016-69340 A (Fujifilm Corp.), 09 May 2016 (09.05.2016), paragraph [0156] & CN 105456045 A	5/1-4
X/Y	JP 55-144868 A (Institut Francais du Petrole), 12 November 1980 (12.11.1980), claims; examples & US 4320050 A claims; examples	5/1-5
X/Y	JP 55-157659 A (Bridgestone Tire Co., Ltd.), 08 December 1980 (08.12.1980), claims; examples; referential example 1 (Family: none)	5/1-5
X/Y	JP 2000-152778 A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 06 June 2000 (06.06.2000), paragraphs [0002], [0034]; examples (Family: none)	5/1-5
X/Y	HIYAMA T et al., Determination of carotenes by thin-layer chromatography, Analytical Chemistry, 1969, Vol.29, p.339-350, pages 339 to 340, paragraphs, fig. 1, 2, tables 1, 2	5/1-5
X/Y	JP 2008-303166 A (Kaneka Corp.), 18 December 2008 (18.12.2008), examples (Family: none)	5/1-5
X/Y	JP 2000-175696 A (Miho TANAKA), 27 June 2000 (27.06.2000), claims; examples (Family: none)	5/1-5
X/Y	Shinichi TAKAICHI, 5. Shikiso no Bunseki d. Carotenoid no Bunseki, Teion Kagaku, 2009, vol. 67, pages 347 to 353, 5.d.2 'Chushutsu', fig. 1, table 1	5/1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/017800

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-230272 A (Dainippon Ink and Chemicals, Inc.), 07 September 2006 (07.09.2006), claims; examples (Family: none)	1-5
X/Y	JP 2016-32430 A (Kaneka Corp.), 10 March 2016 (10.03.2016), claims; examples; paragraphs [0002], [0088] (Family: none)	5/1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/017800

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C07K14/405(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P23/00(2006.01)i, A23K10/37(2016.01)i, A23K20/105(2016.01)i, A23K20/179(2016.01)i, A23L5/44(2016.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K8/31(2006.01)i, A61K8/33(2006.01)i, A61Q1/02(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i, C07K14/405(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 (I P C))

Int.Cl. C12P23/00, A23K10/37, A23K20/105, A23K20/179, A23L5/44, A23L33/10, A61K8/31, A61K8/33, A61Q1/02, A61Q19/00, C07K14/405

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 7 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), Cplus/FSTA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (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
PX/PY	WO 2016/181719 A1 (D I C株式会社) 2016. 11. 17, 全文 (ファミリーなし)	5/1-5
X/A	JP 2001-512030 A (イッサム リサーチ ディベロップメント カンパニー オブ ザ ヘブライ ユニバーシティ オブ エルサレム) 2001. 08. 21, [0 0 0 1] & US 5935808 A, Column 1 Lines 21-35 & EP 1005565 A1	5/1-4

☑ 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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

2 1 . 0 7 . 2 0 1 7

国際調査報告の発送日

0 1 . 0 8 . 2 0 1 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

北田 祐介

4 B

4 8 6 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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
X/A	JP 2015-507642 A (ニュートリショナル セラピューティクス インコーポレイテッド ディー/ビー/エーエヌティーアイ インコーポレイテッド) 2015.03.12, [0150] & US 2014/0134228 A1, [0177] & EP 2780032 A1 & KR 10-2014-0108281 A	5/1-4
X/A	JP 2016-69340 A (富士フイルム株式会社) 2016.05.09, [0156] & CN 105456045 A	5/1-4
X/Y	JP 55-144868 A (アンステイテュ・フランセ・デュ・ペトロール) 1980.11.12, 特許請求の範囲、実施例 & US 4320050 A, Claims, Examples	5/1-5
X/Y	JP 55-157659 A (ブリヂストンタイヤ株式会社) 1980.12.08, 特許請求の範囲、実施例、参考例1 (ファミリーなし)	5/1-5
X/Y	JP 2000-152778 A (株式会社ヤクルト本社) 2000.06.06, [0002], [0034], 実施例 (ファミリーなし)	5/1-5
X/Y	HIYAMA T et al., Determination of carotenes by thin-layer chromatography, Analytical Chemistry, 1969, Vol.29, p.339-350, 339-340ページにかけての段落、図1、2、表1、2	5/1-5
X/Y	JP 2008-303166 A (株式会社カネカ) 2008.12.18, 実施例 (ファミリーなし)	5/1-5
X/Y	JP 2000-175696 A (田中 美穂) 2000.06.27, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	5/1-5
X/Y	高市 真一, 5. 色素の分析 d. カロテノイドの分析, 低温科学, 2009, Vol.67, p.347-353, 5. d. 2 「抽出」、図1、表1	5/1-5
Y	JP 2006-230272 A (大日本インキ化学工業株式会社) 2006.09.07, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-5
X/Y	JP 2016-32430 A (株式会社カネカ) 2016.03.10, 特許請求の範囲、実施例、[0002], [0088] (ファミリーなし)	5/1-5