

(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
2016年11月17日(17.11.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/181719 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 23/00 (2006.01) A61K 8/67 (2006.01)
A23L 5/44 (2016.01) C07C 35/21 (2006.01)
A23L 5/46 (2016.01) C12P 21/02 (2006.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 36/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/060666
- (22) 国際出願日: 2016年3月31日(31.03.2016)
- (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 2015-097417 2015年5月12日(12.05.2015) 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5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). 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). 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). 平橋 智裕 (HIRAHASHI Tomohiro); 〒

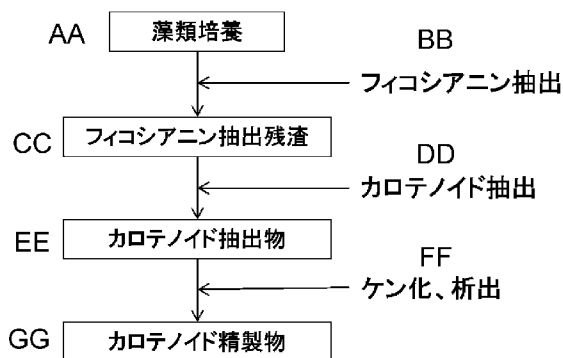
2858668 千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C 株式会社 総合研究所内 Chiba (JP). 小林 伸生 (KOBAYASHI Nobuo); 〒2908585 千葉県市原市八幡海岸通12番地 D I C 株式会社 千葉工場内 Chiba (JP).

- (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, 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, KN, KP, KR, 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,

[続葉有]

(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



- 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 present invention addresses the problem of providing an industrially useful method for contributing to the effective utilization of algal culture residual liquid and producing carotenoids free of hazardous substances. The above problem is solved by a method for obtaining a purified product of carotenoids from a residue from which phycocyanin has been extracted after having produced phycocyanin by culturing algae, the method for obtaining a purified product of carotenoids characterized by having a saponification step for using an alkaline substance to decompose the chlorophyll contained in a carotenoid extract (A) obtained after a step for extracting carotenoids from the residue and filtering, and a carotenoid precipitation step conducted thereafter, the conditions of the saponification step being as follows: (1) 1.9-7.6 molar equivalents of an alkaline substance are used in relation to the solid mass (1 kg) of the carotenoid extract (A); (2) the temperature at which saponification is conducted is 40-80°C.

(57) 要約: 藻類培養残液の有効利用に資し、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。上記課題は、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で

あつて、前記残渣からカロテノイドを抽出し、ろ過する工程の後に得られたカロテノイド抽出物 (A) 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と、その後に行うカロテノイドの析出工程を有し、ケン化工程の条件が以下であることを特徴とするカロテノイドの精製物を得る方法、(1) カロテノイド抽出物 (A) の固形分質量 (1 kg) に対して、アルカリ性物質を1.9~7.6モル相当量を用いる。(2) ケン化を行う温度が40~80°Cである。により解決される。

WO 2016/181719 A1

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 添付公開書類:
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, — 國際調查報告 (條約第 21 條(3))
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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、特に藻類培養物に含まれるクロロフィルを分解するためのケン化工程と、その後に行うカロテノイドの析出工程を有する方法に関する。

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(以下残液と記載)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、残液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、藻類培養残液の有効利用に資し、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、前記残渣からカロテノイドを抽出し、ろ過する工程の後に得られたカロテノイド抽出物（A）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と、その後に行うカロテノイドの析出工程を有し、ケン化工程の条件が以下であることを特徴とするカロテノイドの精製物を得る方法。

（1）カロテノイド抽出物（A）の固形分質量（1 kg）に対して、アルカリ性物質を1.9～7.6モル相当量を用いる。

（2）ケン化を行う温度が40～80℃である。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、藻類培養残液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生産させた後、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であって、前記残渣からカロテノイドを抽出し、ろ過する工程の後に得られたカロテノイド抽出物（A）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と、その後に行うカロテノイドの析出工程を有し、ケン化工程の条件が以下であることを特徴とするカロテノイドの精製物を得る方法。

（1）カロテノイド抽出物（A）の固形分質量（1 kg）に対して、アルカリ性物質を1.9～7.6モル相当量を用いる。

（2）ケン化を行う温度が40～80℃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. さらに、ケン化工程の前に、エタノール又は水-エタノール混合溶液でカロテノイドを抽出する工程を有する1.又は2.に記載のカロテノイドの精製物を得る方法。

4. 前記析出工程において、水/エタノールの質量比を45/55～55/45の範囲で調整してケン化工程により得られた液からカロテノイドの析出を行う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. 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.～4.の何れかに記載のカロテノイドの精製物を得る方法。

6. 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.～5.の何れかに記載のカロテノイドの精製物を得る方法。

7. 1.～6.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] 本発明の第一工程は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ある。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、アファニゾメノン（*Aphanizomenon*）属、フィッシ

エレラ (Fishereilla) 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 (Aphanothecae) 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含有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の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事から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、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（HEIDA）、ヒドロキシエチレンジアミン四酢酸（HEDTA）等のヒ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、特にゼアキサントンの劣化を防ぐため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から、カロテノイドを抽出する工程を行う。

この抽出法は公知慣用の方法で行うことができ、例えば、抽出溶媒として、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、ゼアキサントンの抽出選択性を上げるため、99wt%（質量%）～80wt%（質量%）であることが好ましい。当該範囲より高いとエタノールと脂質等がエステル交換を起こし、脂肪酸エチルエステル等の不精製物を発生し、低いとゼアキサントンの抽出効率が低下する。

抽出する際の温度は20～80℃の範囲を上げることができるが、短時間で抽出を行うためには、溶液を均一になるよう攪拌しながら、40～80℃で行うことが好ましく、更には50～80℃での温度範囲で抽出を行うこと

が好ましい。

[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。

この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] 次に、抽出液の濃縮を行い、カロテノイド抽出物（A）を得る。

該抽出物（A）の固形成分質量は、抽出物（A）の3.3wt%～33wt%が好ましく、3.3wt%～13wt%がより好ましく、5wt%～8.3wt%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（A）のケン化工程を行う。本工程は、当該抽出物（A）に含まれるクロロフィルを除去することを目的とする。

本発明のケン化工程では、カロテノイド抽出物（A）の固形成分質量（1kg）に対して、アルカリ性物質を1.9～7.6モル相当量で処理を行うことが好ましい。さらには、3.8モル相当量での処理が特に好ましい。

本発明で用いられるアルカリ性物質は、通常クロロフィルの除去が可能なアルカリ性物質であれば制限なく使用することが可能であるが、好ましくは、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。

[0044] 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40～80℃で行うのが好ましい。

[0045] 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。

[0046] 次に、カロテノイド精製物を得るための析出工程を行う。

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。

より具体的には、前記ケン化工程後に得られる溶液に水を添加し、水-エタノール濃度を調整する事で、カロテノイドを析出させる。水-エタノール濃度は、70wt%以下が好ましく、短時間で析出させる際は、45wt%～55wt%の範囲がより好ましい。

[0047] 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45wt%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45wt%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、99wt%～80wt%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、ゼアキサントニンが豊富に含まれる効果がある。

[0048] 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ることができる。

実施例

[0049] 以下、本発明に係る測定法続き、実施例、比較例により本発明をより具体的に説明する。

<ゼアキサントニン濃度測定>

抽出液、ケン化抽出液、最終精製物中のゼアキサントニン濃度は、溶液をメチルtert-ブチルエーテル：アセトニトリル=1：1（容量比）に置換

後、 $\phi 0.2 \mu\text{m}$ のシリンジフィルターでろ過し、UPLC (WACQUITY UPLC ; Waters) を用い、下記条件で定量することができる。

具体的には、カラムにAcquity UPLC HSS T3 ($\phi 2.1 \text{mm} \times 100 \text{mm}$, $1.8 \mu\text{m}$) 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°Cの条件を設定することで測定できる。

[0050] <各精製工程におけるゼアキサンチン量測定>

(1) フィコシアニン抽出残渣0.2g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) に置換し、UPLCで測定を行うことで、フィコシアニン抽出残渣中のゼアキサンチン量を測定することができる。この測定値をZ1とする。

(2) 抽出液からフィコシアニン抽出残渣0.2g相当量となるよう一部を分取した後、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) に置換し、UPLCで定量測定を行うことで抽出液のゼアキサンチン量を測定することができる。この測定値をZ2とする。ケン化液及び最終精製物も同様な操作でゼアキサンチン量を測定することができる。ケン化液のゼアキサンチン量をZ3、最終精製物のゼアキサンチン量をZ4とする。

[0051] <ゼアキサンチン回収率算出方法>

得られた各溶液のゼアキサンチン量を用いる事で、各工程のゼアキサンチン回収率を算出することができる。すなわち、抽出の工程回収率は、 $Z2 / Z1 \times 100\%$ 、ケン化の工程回収率は、 $Z3 / Z2 \times 100\%$ 、精製の工

程回収率は $Z4 / Z3 \times 100\%$ で算出することができる。

[0052] 2) 最終精製物中のゼアキサンチン含有率

最終精製物を 105°C の乾燥機で乾燥させ、固形分質量を測定する。ゼアキサンチン質量を固形分質量で割り得られた値を最終生成物のゼアキサンチン含有率とした。

[0053] 3) クロロフィルの含有率

サンプル溶液を 85% アセトン水溶液に溶媒置換する。3 G 2 ガラスフィルタでろ過し、ろ過残渣を 85% アセトンで洗浄する。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回繰り返し、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、サンプル溶液中の総クロロフィル含量を得ることができる。

[0054] (製造例1)

<フィコシアニン残渣の調整>

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 mol/l) に加え、攪拌機により 20°C 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 mol/l) した。この懸濁液を2分間攪拌後、 20°C 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 19.5 kHz 、超音波照射部の容積 10 mL 、出力 300 W] に導き、懸濁液を 5 mL/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 6.8 g/l 、リン酸水

素二ナトリウムが2.2 g／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10,000 Gで、15分間の遠心分離を行い、フィコシアニン残渣とフィコシアニン溶液をろ別した。さらに、該フィコシアニン残渣をスプレードライヤー法などで乾燥させることで乾燥フィコシアニン残渣（ブルー残渣）を得た。

[0055]（実施例1）

前記ブルー抽出残渣300 gを95 wt %エタノール水溶液900 g中で50℃、1時間、300 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、ろ液とろ過残渣を得た。ろ過残渣を95 wt %エタノール水溶液で再度抽出し、ろ液に加える事で、抽出溶液を得た。該抽出液をロータリーエバポレーターで450 gに減圧濃縮し、25% KOH / EtOH溶液を30 g（固形分質量（1 kg）に対し、アルカリ性物質を3.8モル相当量使用）添加した。50℃、1時間、200 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。

[0056] 該ケン化抽出液に水を添加し、水エタノール濃度を45 wt %に調整した。4℃で30分以上静置し、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10 mm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のち、45 wt %エタノール水溶液で洗浄し、不純物を除去した。不純物を除去した該析出物を95 wt %エタノール水溶液で溶解し、最終精製物を得た。

[0057] 原料である抽出残渣及び、上記で得られた抽出液、ケン化抽出液、最終精製物をUPLCで測定し、各々のゼアキサンチン回収率を算出した。また、ケン化抽出液では、クロロフィル含有率を算出した。さらに、最終精製物では、乾燥質量を測定し、固形分中のゼアキサンチン含有率を算出した。測定結果は、ゼアキサンチン回収率80%、ゼアキサンチン含有率13%、クロロフィル含有率0.1%以下であった。

[0058]（実施例2）

ブルー残渣50 gに95 wt %エタノール水溶液を150 g加え、78℃

、1時間攪拌しながら抽出した。ろ過で固液分離し、ろ液とろ過残渣を得た。ろ過残渣を95wt%エタノール水溶液で再度抽出し、ろ液に加えることで、抽出溶液を得た。該抽出液に95wt%エタノール水溶液を加え500gとした。50gを分取し、25%KOH/EtOHを0.25g加え（固形分質量（1kg）に対し、アルカリ性物質を1.9モル相当量使用）、78℃、1時間攪拌しながらケン化した。該ケン化抽出液のクロロフィル含有率は0.1%以下、ゼアキサンチン回収率85%であった。

[0059]（実施例3）

ブルー残渣50gに95wt%エタノール水溶液を150g加え、78℃、1時間攪拌しながら抽出した。ろ過で固液分離し、ろ液とろ過残渣を得た。ろ過残渣を95wt%エタノール水溶液で再度抽出し、ろ液に加えることで、抽出溶液を得た。該抽出液に95wt%エタノール水溶液を加え500gとした。50gを分取し、25%KOH/EtOHを1.0g加え（固形分質量（1kg）に対し、アルカリ性物質を7.6モル相当量使用）、78℃で1時間攪拌しながらケン化した。該ケン化抽出液のクロロフィル含有率は0.01%、ゼアキサンチン回収率77%であった。

[0060]（比較例1）

ブルー残渣20kgにアセトン/エタノール（2：1）混合溶媒47kgを加え、60℃、2時間、80rpmで攪拌しながら抽出した。ろ過で固液分離し、ろ液とろ過残渣を得た。ろ過残渣を該混合溶媒で再度抽出し、ろ液に加える事で、抽出溶液を得た。該抽出液のゼアキサンチン回収率は85%、ゼアキサンチン含有率0.8%、クロロフィル含有率は5.9%であった。

[0061]（比較例2）

ブルー残渣30gに95wt%エタノール水溶液を90g加え、78℃、1時間攪拌しながら抽出した。ろ過で固液分離し、ろ液とろ過残渣を得た。ろ過残渣を95wt%エタノール水溶液で再度抽出し、ろ液に加えることで、抽出溶液を得た。該抽出液を濃縮し、90gとした。15gを分取し、2

5% KOH/EtOHを0.5g加え（固形分質量（1kg）に対し、アルカリ性物質を3.8モル相当量使用）、30℃で1時間攪拌しながらケン化した。該ケン化抽出液のクロロフィル含有率は0.01%、ゼアキサントリン回収率80%であった。しかし、薄層クロマトグラフィーでクロロフィルの分解物と思われる物質の残留が多く確認された。

[0062] （比較例3）

ブルー残渣50gに95wt%エタノール水溶液を150g加え、78℃、1時間攪拌しながら抽出した。該抽出液に95wt%エタノール水溶液を加え500gとした。50gを分取し、25% KOH/EtOHを0.5g加え（固形分質量（1kg）に対し、アルカリ性物質を3.8モル相当量使用）、78℃で1時間攪拌しながらケン化した。該ケン化液をろ過で固液分離し、ろ液とろ過残渣を得た。ろ過残渣を95wt%エタノール水溶液で再度抽出し、ろ液に加えることで、抽出ケン化溶液を得た。該ケン化抽出液のクロロフィル含有率は0.83%でゼアキサントリン回収率は84%であった。

[0063] 以上の実施例・比較例より、本発明を構成する要件を備えた方法で、ゼアキサントリンの回収量が高く、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。

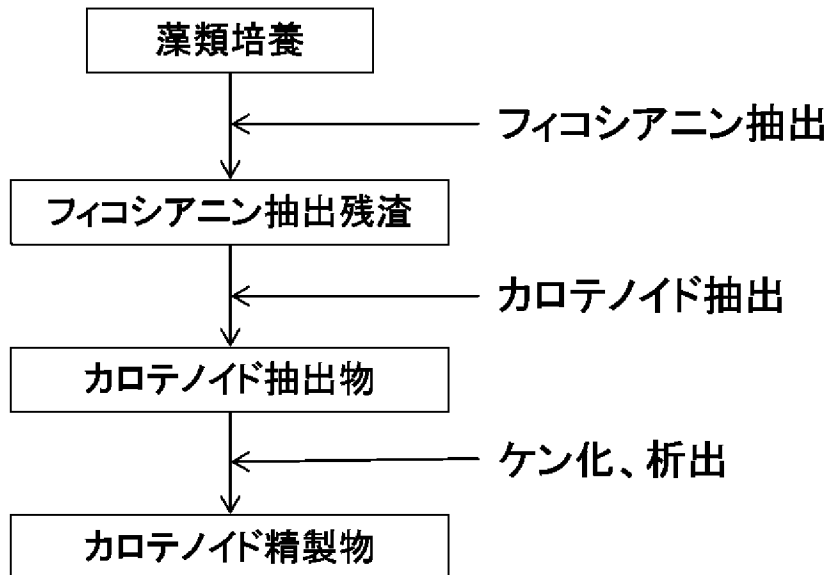
産業上の利用可能性

[0064] 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、前記残渣からカロテノイドを抽出し、ろ過する工程の後に得られたカロテノイド抽出物（A）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と、その後に行うカロテノイドの析出工程を有し、ケン化工程の条件が以下であることを特徴とするカロテノイドの精製物を得る方法。
- （1）カロテノイド抽出物（A）の固形分質量（1 kg）に対して、アルカリ性物質を1.9～7.6モル相当量を用いる。
- （2）ケン化を行う温度が40～80℃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] さらに、ケン化工程の前に、エタノール又は水-エタノール混合溶液でカロテノイドを抽出し、ろ過する工程を有する請求項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] 前記析出工程において、水/エタノールの質量比を45/55～55/45の範囲で調整してケン化工程により得られた液からカロテノイドの析出を行う請求項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] 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1～4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6] カロテノイドが、ゼアキサントシン、 β -カロテン、又はミクソキサントフィルである請求項1～5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7] 請求項1～6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/JP2016/060666

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P23/00(2006.01)i, A23L5/44(2016.01)i, A23L5/46(2016.01)i, A23L33/105 (2016.01)i, A61K8/67(2006.01)i, C07C35/21(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, A61K36/02(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) C12P23/00, A23L5/44, A23L5/46, A23L33/105, A61K8/67, C07C35/21, C12P21/02, A61K36/02 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 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 01-123865 A (Dainippon Ink and Chemicals, Inc.), 16 May 1989 (16.05.1989), page 1, right column; page 3, lower left column, 4th line from the bottom to lower right column, line 10 (Family: none)	1-7
Y	JP 06-16519 A (Dainippon Ink and Chemicals, Inc.), 25 January 1994 (25.01.1994), paragraph [0004] (Family: none)	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 10 June 2016 (10.06.16)		Date of mailing of the international search report 21 June 2016 (21.06.16)
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/JP2016/060666

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y X	JP 2000-175696 A (Miho TANAKA), 27 June 2000 (27.06.2000), example 1; page 3, Effects of the Invention (Family: none)	1-7 7
Y	US 4439629 A (Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, N. J.), 27 March 1984 (27.03.1984), column 1, lines 52 to 62 & JP 57-114567 A & EP 52777 A1	1-7
Y	Hiroyuki KAMOGAWA, "Carotenoid Contents in Chlorella pyrenoidosa and Concentration by Saponification", Bulletin of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 2012, vol.62, vol.3, pages 83 to 88, page 85, left column, 'Chlorella Yurai no Carotenoid no Ken-ka Noshuku'	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P23/00(2006.01)i, A23L5/44(2016.01)i, A23L5/46(2016.01)i, A23L33/105(2016.01)i, A61K8/67(2006.01)i, C07C35/21(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, A61K36/02(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. C12P23/00, A23L5/44, A23L5/46, A23L33/105, A61K8/67, C07C35/21, C12P21/02, A61K36/02

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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
Y	JP 01-123865 A (大日本インキ化学工業株式会社) 1989.05.16, 第1頁右欄、第3頁左下欄下から第4行-右下欄第10行 (ファミリーなし)	1-7
Y	JP 06-16519 A (大日本インキ化学工業株式会社) 1994.01.25, 【0004】 (ファミリーなし)	1-7
Y X	JP 2000-175696 A (田中美穂) 2000.06.27, 実施例1、第3頁【発明の効果】 (ファミリーなし)	1-7 7

☑ 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

10.06.2016

国際調査報告の発送日

21.06.2016

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)

池上 京子

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

4667

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
Y	US 4439629 A (Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, N. J.) 1984.03.27, 第1欄第52行—第62行 & JP 57-114567 A & EP 52777 A1	1-7
Y	加茂川寛之, クロレラに含まれるカロテノイドの定量とケン化反応 による濃縮, 北大水産彙報, 2012, vol.62, vol.3, p.83-88, p.85 左欄「クロレラ由来のカロテノイドのケン化濃縮」	1-7