

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-509207

(P2010-509207A)

(43) 公表日 平成22年3月25日(2010.3.25)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 0 7 D 487/22	(2006.01)	C 0 7 D 487/22	4 B 0 6 4
C 1 2 P 23/00	(2006.01)	C 1 2 P 23/00	4 C 0 5 0

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2009-535200 (P2009-535200) (86) (22) 出願日 平成19年5月3日 (2007.5.3) (85) 翻訳文提出日 平成21年6月8日 (2009.6.8) (86) 国際出願番号 PCT/KR2007/002177 (87) 国際公開番号 W02008/054050 (87) 国際公開日 平成20年5月8日 (2008.5.8) (31) 優先権主張番号 10-2006-0108058 (32) 優先日 平成18年11月3日 (2006.11.3) (33) 優先権主張国 韓国 (KR)	(71) 出願人 508032745 クワンジュ インスティテュート オブ サイエンス アンド テクノロジー 大韓民国 500-712 ガンジュ バ クーグ オリョンドン 1 (71) 出願人 509126346 エル エス ファーム カンパニー リミ テッド 大韓民国、 500-712 ガンジュ、 バクーグ、オリョンドン 1、ガンジュ インスティテュート オブ サイエンス アンド テクノロジー ピー ビー ア イ センター 319 (74) 代理人 100082418 弁理士 山口 朔生
---	---

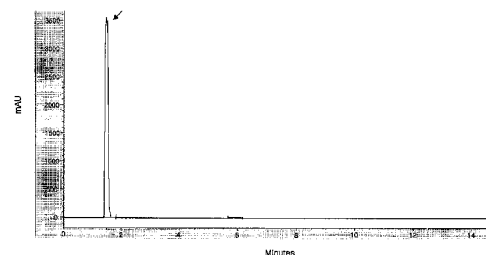
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クロロフィルa及びクロリンe6の製造方法

(57) 【要約】

本発明は、クロロフィルa及びクロリンe6の製造方法に関する。本発明は、破碎されていないインタクトクロレラ細胞そのものを利用してクロロフィルaを抽出し、これからクロリンe6を製造して、本発明で採択しているクロレラ細胞の前処理過程によって高い含量比率のクロロフィルaを得ることができ、これから高い収率でクロリンe6を製造することができる。また、本発明の方法は、比較的簡単な工程によって行われて、クロリンe6の大量生産に適している。

【選択図】 図3c



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

破碎されていないインタクト(intact)クロレラに有機溶媒を処理する段階を含むクロロフィル a の製造方法。

【請求項 2】

前記クロレラは、海水クロレラであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記有機溶媒は、エタノールであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

(a) クロレラに 30～80%エタノールを処理して、クロレラからクロロフィル a 以外の他の成分を除去する段階と、 10

(b) 前記クロレラに 90～100%エタノールを処理して、クロロフィル a を抽出しクロロフィル a 抽出液を得る段階と、
を含むクロロフィル a の製造方法。

【請求項 5】

(a) クロレラに 80～100%エタノールを処理し、クロロフィル a を抽出する段階と、

(b) 前記抽出液にジオキサンを添加し、クロロフィル a の沈殿を誘導する段階と、
を含むクロロフィル a の製造方法。

【請求項 6】

(a) 請求項 4 または 5 に記載の方法により得られたクロロフィル a に酸を処理し、クロロフィル a からマグネシウムイオンを除去することにより、フェオフィチン(pheophytin) a を得る段階と、

(b) 前記フェオフィチン a に塩基を処理してクロリン e 6 を得る段階と、
を含むクロリン e 6 の製造方法。 20

【請求項 7】

前記クロレラは、破碎されていないインタクト(intact)細胞であることを特徴とする、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記クロレラは、海水クロレラであることを特徴とする、請求項 4 または 5 に記載の方法。 30

【請求項 9】

前記段階 (a) におけるエタノールの濃度は、50～65%であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 10】

前記段階 (a) におけるエタノールの濃度は、58～62%であることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記段階 (a) は、3～6 回繰り返して行うことを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。 40

【請求項 12】

前記段階 (b) におけるエタノールの濃度は、98～100%であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 13】

前記段階 (a) におけるエタノールの濃度は、90～100%であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 14】

前記段階 (a) におけるエタノールの濃度は、98～100%であることを特徴とする、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記段階（b）は、ジオキサンを添加した後、追加的に水を抽出液に添加することを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 16】

前記方法は、段階（b）以後に、段階（b）の反応物を -10°C 以下で低温処理することを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 17】

前記方法のクロロフィル a に対する収率は、7～9%であり、精製度は、72～80%であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 18】

前記方法のクロロフィル a に対する収率は、4～6%であり、精製度は、80～90%であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記段階（a）は、前記クロロフィル a 抽出液に酸を処理し、クロロフィル a 抽出液の pH を 1～5 になるように調節して行うことを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 pH は、1～3であることを特徴とする、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記段階（b）は、フェオフィチン a に塩基性溶液を処理し、pH 11～16 になるように調節して行うことを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 22】

20

前記 pH は、13～14であることを特徴とする、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記段階（b）以後に、段階（b）の反応結果物を中和させる段階をさらに含むことを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 24】

前記段階（b）は、エタノール溶媒下で行うことを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 25】

前記段階（b）は、アセトン溶媒下で行うことを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 26】

30

前記方法は、

（a）請求項 4 または 5 に記載の方法により得られたクロロフィル a に酸を処理し、クロロフィル a からマグネシウムイオンを除去することにより、フェオフィチン a 沈殿物を得る段階と、

（b-1）フェオフィチン a 沈殿物にアセトン溶媒を添加し、フェオフィチン a 溶液を得る段階と、

（b-2）前記フェオフィチン a 溶液に塩基を処理し、クロリン e 6 を得る段階と、を含むことを特徴とする、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記方法のクロリン e 6 に対する精製度は、93～98%であり、クロリン e 6 に対する収率は、4～6%であることを特徴とする、請求項 24 に記載の方法。

40

【請求項 28】

前記方法のクロリン e 6 に対する精製度は、95～99.9%であり、クロリン e 6 に対する収率は、3～5%であることを特徴とする、請求項 25 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、クロロフィル a 及びクロリン e 6 の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

50

クロリン e 6 は、癌の光線力学的治療(photodynamic therapy)に利用される光感受性物質である。

【0003】

米国特許第 5, 330, 741 号は、クロリン e 6 を製造する方法を開示する。この特許の方法によると、バイオマスを、クロロフィル a を抽出するためにアセトンで 2 ~ 3 回処理する。次いで、バイオマスをろ過または遠心分離して、抽出物を蒸発させ、クロロフィル分子からマグネシウムイオンを除去してフィチルエステル基を加水分解するために酸を処理する。同時に、エステル化するためにメチルアルコールを添加して、反応マス(Reaction mass)を水で処理し、フェオホルビド α 誘導体をクロロメチレンで抽出して、抽出物を中和して、水で洗浄し、蒸発させて、アルミナ上でクロマトグラフィーする。次いで、メチルフェオホルビド α をクロロメチレンとメタノールとの混合物から結晶化して、得られたフェオホルビド α 誘導体を、酸素が存在するピリジーン-ジエチルエーテル-n-プロパノール内で強い無機塩基と反応させ、反応マスを水で処理する。水層を pH 4 となるまで酸性化して、不安定なクロリンをクロロメチレンで抽出し、抽出物を蒸発させて、不安定なクロリンをテトラヒドロフランに再び溶解し、溶液を蒸発させて、このような過程を、700 nm における吸光度増加が止まるまで繰り返す。得られた purpurine 18 をテトラヒドロフランに溶解して、ジアゾメタンでエステル化し、purpurine 18 メチルエステルをピリジン存在下でクロロメチレン中のリシン水溶液と混合して、混合物を室温で 12 時間攪拌する。溶媒を高真空状態で除去した後、得られた粗(crude)生成物を逆相高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製して、溶媒を凍結乾燥(lyophilisation)で除去する。PS を、PDT 用注射液(Injection solution)を得るためにホスフェート緩衝溶液に溶解して、0.1 N NaOH 溶液を添加し、0.1 N HCl を使用して pH を生理的値の pH 7.35 に調節して、溶液を微細気孔フィルターを通過させてろ過する。

【0004】

しかし、前記方法は、低い再現性、手間(高真空、結晶化、カラムクロマトグラフィー及び HPLC の使用、リシンとの長い反応時間)、及び毒性が高くて可燃性の試薬(ジアゾメタン、ピリジン、メタノール、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル)を使用する問題点があって、医薬または食品産業分野に不適である。

【0005】

大韓民国特許出願公開第 2004-0025911 号の方法によると、スピルリナバイオマスを、クロロフィル a が完全に抽出されるまでアセトンで処理し、バイオマスをろ過あるいは遠心分離する。抽出物を、クロロフィル分子からマグネシウムイオンを除去するために酸で処理し、抽出物を中和して、沈殿されたフェオフィチン a をろ過した後、粗フェオフィチン 1 g に対して 6 ~ 16 ml のアセトン、0.6 ~ 6 ml のヘキサン及び 5 ~ 10 ml の濃い塩酸から構成された塩酸-アセトン-ヘキサン混合物を使用して、フェオフィチン a を加水分解する。次いで、混合物を 40 ~ 60 °C に加熱しながら 20 分 ~ 1 時間攪拌した後、ヘキサン(6 ~ 16 ml)を加えて、有機層をアセトンと塩酸の混合物(2 ~ 10 : 1)で洗浄し、水層をヘキサンで洗浄した後、フェオホルビド a をろ過して、水で洗浄し、アセトン-水混合物で再結晶して、重量が一定になるまで空气中で乾燥する。その後、フェオホルビド a をアセトンに溶解させて、0.05 ~ 1.00 % 濃度の無機強塩基水溶液を加えて、30 ~ 60 °C で 5 ~ 30 分間攪拌し、1 ~ 50 % 濃度の無機強塩基水溶液をさらに加えた後、混合物を 40 ~ 60 °C で 20 ~ 90 分間加熱して、薄い塩酸で中和し、クロリン e 6 沈殿を遠心分離して、酸反応が消えるまで蒸留水で洗浄し、55 ~ 80 % クロリン e 6 を得る。

【0006】

上記の方法も同様に、過程が複雑で、食品及び医薬に適用できない試薬を使用する問題点がある。

【0007】

本明細書全体にかけて多数の特許文献及び論文が参照されて、その引用が表示されてい

る。引用された特許文献及び論文の開示内容は、その全体が本明細書に参照として取り込まれ、本発明の属する技術分野の水準及び本発明の内容がより明確に説明される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明者らは、緑藻類に属するクロレラから高い収率でクロリン(chlorin) e 6を製造し、且つ、比較的簡単な工程で大量生産に適した方式によりクロリン e 6が製造できる方法を開発するために鋭意研究した結果、クロレラの独特な前処理過程などの効率的な製造プロトコルを開発することにより、本発明を完成した。

【0009】

したがって、本発明の目的は、クロロフィル a の製造方法を提供することにある。

【0010】

また、本発明の他の目的は、クロリン e 6 の製造方法を提供することにある。

【0011】

本発明の他の目的及び利点は、発明の詳細な説明、請求の範囲及び図面により、さらに明確にされる。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の一樣態によると、本発明は、破碎されていないインタクト(intact)クロレラに有機溶媒を処理する段階を含むクロロフィル a の製造方法を提供する。

【0013】

本発明者らは、効率的にクロリン e 6を製造するために、まずクロロフィル a を効率的に製造できる方法を開発しようとし、このような目的のために、出発物質として適したクロレラを選別した。

【0014】

従来の通常的な方法によると、クロレラからクロロフィル a を抽出する場合、まずクロレラ細胞を破碎して、この破碎物(Cell lysate)からクロロフィル a を抽出した。しかし本発明者らは、従来のこのような通念から外れ、破碎されていないインタクトクロレラを利用して、非常に高い収率でクロロフィル a を製造することに成功した。このような成功的なクロロフィル a の抽出は、従来の技術からは想到できないもので、非常に驚くべき結果である。

【0015】

本明細書において、用語‘インタクトクロレラ’は、破碎しなかったクロレラを意味する。用語‘インタクトクロレラ’は、当業界で通常的に使用される用語‘生クロレラ(Live chlorella)’と同一な意味を有する。通常的に、細胞内にある物質を抽出または分離する場合、細胞破碎過程(例えば、超音波粉碎)が必ず伴われる。しかし、本発明では、破碎されていないクロレラそのものを利用する。

【0016】

このように破碎されていないクロレラ細胞そのものを利用すると、クロロフィル a の抽出効率が高いだけでなく、細胞破碎過程で発生するクロロフィル a の酸化などのような問題点も防ぐことができる。

【0017】

本発明の方法で利用できる有機溶媒は、当業界に公知の様々な有機溶媒を含む。例えば、(i)炭素数1～4の無水または含水低級アルコール(メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなど)、(ii)前記低級アルコールと水との混合溶媒、(iii)アセトン、(iv)エチルアセテート、(v)クロロホルム、(vi)ブチルアセテート、(vii)1, 3-ブチレンジリコール、(viii)ヘキサン、及び(ix)ジエチルエーテルが有機溶媒として利用できる。好ましくは、本発明に利用される有機溶媒は、メタノールまたはエタノールであり、より好ましくは、エタノールである。

【0018】

10

20

30

40

50

本発明で利用されるクロレラとしては、通常のいかなるクロレラでも可能であり、好ましくは、海水クロレラである。より好ましくは、本発明で利用されるクロレラは、*Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella fusca*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlorella stigmataphora*, *Chlorella vulgaris*または*Chlorella pyrenoidosa*であり、最も好ましくは、*Chlorella ellipsoidea*である。

【0019】

本発明の他の様態によると、本発明は、(a) クロレラに30～80%エタノールを処理して、クロレラからクロロフィルa以外の他の成分を除去する段階と、(b) 前記クロレラに90～100%エタノールを処理して、クロロフィルaを抽出しクロロフィルa抽出液を得る段階と、を含むクロロフィルaの製造方法を提供する。

10

【0020】

本発明のまた他の様態によると、本発明は、(a) クロレラに80～100%エタノールを処理し、クロロフィルaを抽出する段階と、(b) 前記抽出液にジオキサンを添加し、クロロフィルaの沈殿を誘導する段階と、を含むクロロフィルaの製造方法を提供する。

【0021】

本発明者らは、クロリンe6の前駆物質としてクロロフィルaをクロレラから効率的に製造できる方法を開発するために鋭意研究した結果、高い収率及び精製度でクロロフィルaが製造できる二つのプロトコルを開発した。

【0022】

20

クロロフィルa－プロトコルA

クロロフィルa－プロトコルAは、相対的低濃度のエタノールを利用して、クロレラからクロロフィルa以外の他の成分を除去して、相対的高濃度のエタノールを利用して、クロロフィルaを抽出する過程からなっている。

【0023】

本発明の好ましい具現例によると、本発明で利用されるクロレラは、破碎されていないクロレラ細胞である。本発明において、音波破碎(sonication)などによって破碎されていないものとして、クロレラ細胞そのものを利用して行うことが好ましい。一般に、細胞破碎物(Cell lysate)に有機溶媒を処理してクロロフィルaを抽出するが、本発明の好ましい具現例によると、破碎されていないクロレラ細胞そのものを利用する。このように破碎されていないクロレラ細胞そのものを利用すると、クロロフィルaの抽出効率が高いだけでなく、細胞破碎過程で発生するクロロフィルaの酸化などのような問題点も防ぐことができる。

30

【0024】

本発明の好ましい具現例によると、本発明で利用されるクロレラは、海水クロレラであり、より好ましくは、*Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella fusca*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlorella stigmataphora*, *Chlorella vulgaris*または*Chlorella pyrenoidosa*であり、最も好ましくは、*Chlorella ellipsoidea*である。

【0025】

40

本発明の最も大きい特徴の一つは、クロレラからクロロフィルaを抽出する前に、クロレラからクロロフィルa以外の他の成分を除去する前処理過程を行うことである。このような前処理過程は、高い純度(含量比率)でクロロフィルaを抽出できるようにする。

【0026】

前記不純物除去過程は、クロレラに30～80%エタノールを処理して行われる。エタノールを利用した理由は、第一、エタノールが、不純物を除去するに最も優れた効率を示すためであり、第二、最終的に製造されるクロリンe6が食品に利用されることを予想すると、人体に無害なエタノールを利用することが好ましいからである。前記過程で利用されるエタノールは、30～80%の濃度を有する。もし30%未満のエタノールを利用すると、不純物の除去効率が非常に低くなり、80%超過のエタノールを利用すると、不純

50

物以外にクロロフィル a も除去され、クロロフィル a の抽出効率が大きく減少される問題点がある。

【0027】

好ましくは、段階 (a) におけるエタノールの濃度は、30～68%、より好ましくは、50～65%、さらに好ましくは、58～62%、最も好ましくは約60%である。

【0028】

段階 (a) は、少なくとも1回行って、好ましくは2～7回、より好ましくは3～6回、最も好ましくは5～6回行う。段階 (a) を反復的に行う場合、例えば、クロレラをエタノールに懸濁させて、遠心分離してクロレラを沈殿させる方式でクロレラの不純物を除去する。

10

【0029】

前記不純物を除去するための前処理過程を経たクロレラに90～100%エタノールを処理してクロロフィル a を抽出し、クロロフィル a 抽出液を得る。この過程で、エタノールの濃度が90%未満であると、抽出効率が大きく減少される問題点がある。

【0030】

好ましくは、段階 (b) におけるエタノールの濃度は、95～100%、より好ましくは、98～100%、最も好ましくは約100%である。

【0031】

プロトコール A のクロロフィル a の製造方法のクロロフィル a に対する収率は、5～15%、好ましくは、6～12%、より好ましくは7～9%である。収率は、使用されたクロレラの乾燥重量1gに対する、得られたクロロフィル a の重量比の百分率で計算される。

20

【0032】

プロトコール A のクロロフィル a 精製度は、70～90%、好ましくは、70～85%、より好ましくは72～80%である。

【0033】

クロロフィル a - プロトコール B

クロロフィル a - プロトコール B は、高濃度のエタノール及びジオキサンを利用する方法であって、このプロトコールによると、上述のプロトコール A における不純物の除去過程が省かれて、簡単な工程によって高い収率でクロロフィル a を製造することができる。

30

【0034】

クロロフィル a - プロトコール B に利用されるクロレラに対する内容は、上述のプロトコール A と同様である。

【0035】

クロロフィル a - プロトコール B の第1の段階は、80～100%エタノールを利用して、クロレラからクロロフィル a を抽出する段階である。この過程で、エタノールの濃度が80%未満であると、抽出効率が大きく減少する問題点がある。好ましくは、段階 (a) におけるエタノールの濃度は、90～100%、より好ましくは、98～100%、最も好ましくは約100%である。

【0036】

クロロフィル a - プロトコール B の第2の段階は、ジオキサンを利用してクロロフィル a を沈殿させる段階である。この段階を通じて、クロロフィル a を沈殿させて固相のクロロフィル a を得ることができるだけではなく、クロロフィル a の精製度を高めることができる。使用されるジオキサンの量は、特に制限されないが、クロロフィル a 抽出液1Lに対して、好ましくは50～250ml、より好ましくは、100～200ml、最も好ましくは120～160mlを添加することが好ましい。この場合、使用されるジオキサンは、100%のジオキサンである。

40

【0037】

本発明の好ましい具現例によると、ジオキサンを添加した後、追加的に水を抽出液に添加する。水の使用量は、特に制限されないが、クロロフィル a 抽出液1Lに対して、好ま

50

しくは50～250ml、より好ましくは、100～200ml、最も好ましくは120～160mlを添加することが好ましい。

【0038】

本発明の好ましい具現例によると、段階(b)以後に、段階(b)の反応物を-10℃以下で低温処理し、クロロフィルaの沈殿がさらによくなされるようにする。より好ましくは、-15℃～-30℃、最も好ましくは、-18℃～-25℃で低温処理する。

【0039】

プロトコールBのクロロフィルaの製造方法のクロロフィルaに対する収率は、3～15%、好ましくは、4～10%、より好ましくは4～6%である。プロトコールBのクロロフィルa精製度は、70～98%、好ましくは、75～95%、より好ましくは80～90%である。

10

【0040】

本発明の他の様態によると、(a)上述の方法により得られたクロロフィルaに酸を処理し、クロロフィルaからマグネシウムイオンを除去することにより、フェオフィチン(pheophytin)aを得る段階と、(b)前記フェオフィチンaに塩基を処理してクロリンe6を得る段階とを含むクロリンe6の製造方法を提供する。

【0041】

本発明者らは、緑藻類に属するクロレラから高い収率でクロリンe6を製造し、且つ、比較的簡単な工程で大量生産に適した方式によってクロリンe6を製造できる方法を開発するために研究して、その結果、効率的な製造過程を開発した。

20

【0042】

本発明のクロリンe6の製造方法は、上述の二つのクロロフィルaの製造方法により得られたクロロフィルaを利用してクロリンe6を製造する過程である。

【0043】

より詳細には、クロロフィルa-プロトコールAにより製造されたクロロフィルaを出発物質とする場合、本発明の方法は、(a)クロレラに30～68%エタノールを処理して、クロレラからクロロフィルa以外の他の成分を除去する段階と、(b)前記クロレラに80～100%エタノールを処理してクロロフィルaを抽出し、クロロフィルa抽出液を得る段階と、(c)前記クロロフィルa抽出液に酸を処理し、クロロフィルaからマグネシウムイオンを除去することにより、フェオフィチンaを得る段階と、(d)前記フェオフィチンaに塩基を処理し、クロリンe6を得る段階とを含む。

30

【0044】

より詳細には、クロロフィルa-プロトコールBにより製造されたクロロフィルaを出発物質とする場合、本発明の方法は、(a)クロレラに80～100%エタノールを処理して、クロロフィルaを抽出段階と、(b)前記抽出液にジオキサンを添加してクロロフィルaの沈殿を誘導する段階、(c)前記クロロフィルaに酸を処理し、クロロフィルaからマグネシウムイオンを除去することにより、フェオフィチンaを得る段階と、(d)前記フェオフィチンaに塩基を処理し、クロリンe6を得る段階とを含む。

【0045】

一方、本発明のクロリンe6の製造方法は、基本的に酸を利用したフェオフィチンaの製造段階、及び塩基を利用したクロリンe6の製造段階を含むが、より具体的には、大きく二つのプロトコールに分けられる。

40

【0046】

クロリンe6-プロトコールA

クロリンe6-プロトコールAは、フェオフィチンaからクロリンe6を製造するにおいて、エタノール溶媒下で行うことを特徴とする。

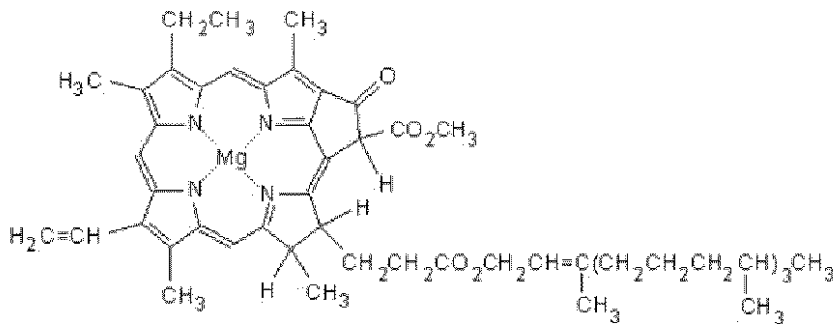
【0047】

クロリンe6-プロトコールAによると、クロロフィルa抽出液に酸を処理して、クロロフィルaからマグネシウムイオンを除去することにより、フェオフィチンaを得る。クロロフィルa及びフェオフィチンaの化学式は、下記化学式1及び2のようである。

50

【0048】

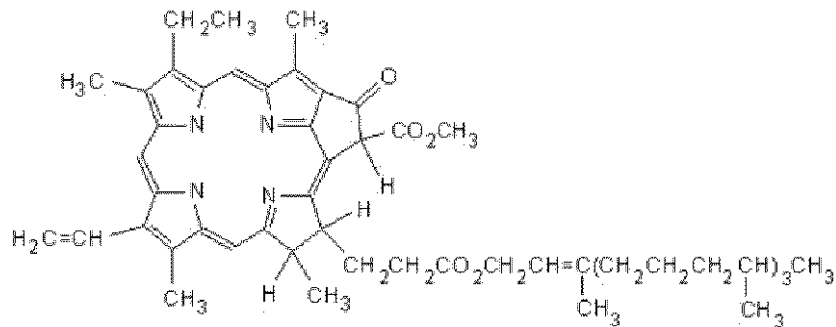
【化1】



10

【0049】

【化2】



20

【0050】

クロロフィルaに酸を処理すると、化学式1からマグネシウムイオンが除去されて、フェオフィチンaが製造される。好ましくは、段階(a)は、クロロフィルa抽出物に酸を処理して、クロロフィルa抽出液のpHを1～5となるように調節して行う。この場合、pH5を超過すると、マグネシウムイオン除去率が大きく減少する問題点がある。より好ましくは、段階(a)における反応物のpHは、1～3であり、最も好ましくは、2～3である。

【0051】

30

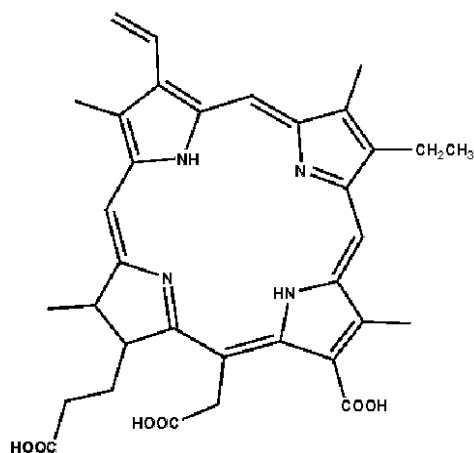
段階(a)で利用される酸としては、当業界に公知の多様な酸を利用することができるが、好ましくは、無機酸、より好ましくは、硫酸及び塩酸であり、最も好ましくは、塩酸である。

【0052】

前記過程で製造された前記フェオフィチンaに塩基を処理して、最終的に化学式3のクロリンe6を得る。

【0053】

【化3】



40

50

【0054】

本発明の好ましい具現例によると、段階（b）は、フェオフィチンaに塩基性溶液を処理して、pH11～16、より好ましくは、pH13～14になるように調節して行う。段階（b）で利用される塩基としては、当業界に公知の多様な塩基を利用することができるが、好ましくは、無機塩基であり、最も好ましくはNaOHである。

【0055】

本発明の好ましい具現例によると、前記段階（b）、即ちクロリンe6を得る段階は、エタノール溶媒下で行われる。

【0056】

本発明の好ましい具現例によると、段階（a）の反応結果物を冷凍室に保管して沈殿を誘導する。

10

【0057】

フェオフィチンaは、通常的に沈殿物形態に得られる。エタノール溶媒を利用してクロリンe6を製造する場合、フェオフィチンa沈殿物は、エタノール溶媒に直接的によく溶解されない。したがって、フェオフィチンa沈殿物をエタノール溶媒に溶解する前に、フェオフィチンa沈殿物をアセトンで溶解することが好ましい。次いで、アセトン溶解物からアセトン除去（例えば、蒸発により）した後、フェオフィチンaにエタノールを添加してフェオフィチンaを溶解し、次いで塩基と反応してクロリンe6を製造する。

【0058】

本発明の好ましい具現例によると、クロリンe6－プロトコールAは、（a）上述の方法により得られたクロロフィルaに酸を処理し、クロロフィルaからマグネシウムイオンを除去することにより、フェオフィチンa沈殿物を得る段階と、（b－1）フェオフィチンa沈殿物にアセトン溶媒を添加しフェオフィチンa溶液を得て、次いでアセトン溶媒を除去する段階と、（b－2）残存のフェオフィチンaにエタノールを添加して、フェオフィチンa溶液を得る段階と、（b－3）前記フェオフィチンa溶液に塩基を処理し、クロリンe6を得る段階とを含む。

20

【0059】

本発明の好ましい具現例によると、前記段階（b）以後に、段階（b）の反応結果物を中和させる段階をさらに含む。この場合、多様な塩基を利用して中和させることができ、例えば、HClを利用して中和することができる。

30

【0060】

クロリンe6を製造した後、適した塩形態を有するように、クロリンe6を塩で処理することができる。例えば、NaHCO₃またはNH₄CO₃のような塩を処理し、クロリンe6の－COOHグループにナトリウムまたはアンモニウムが結合されたクロリンe6の塩を得ることができる。

【0061】

クロリンe6－プロトコールAのクロリンe6に対する精製度は、80～99%、好ましくは、85～99%、より好ましくは、93～98%である。クロリンe6に対する収率は、クロレラを出発物質とする場合、3～10%、好ましくは3～8%、より好ましくは4～6%である。収率は、使用されたクロレラの乾燥重量1gに対する、得られたクロリンe6の重量比の百分率で計算される。

40

【0062】

クロリンe6－プロトコールB

クロリンe6－プロトコールBは、フェオフィチンaからクロリンe6を製造するにおいて、アセトン溶媒下で行うことを特徴とする。

【0063】

クロリンe6－プロトコールBにおいて、段階（a）に対する説明は、クロリンe6－プロトコールAと同様である。また、クロリンe6－プロトコールBにおいて、段階（b）も、アセトン溶媒下でフェオフィチンaに塩基を処理することを除いては、基本的にクロリンe6－プロトコールAと同一である。

50

【0064】

クロリン e 6-プロトコール B によると、段階 (a) で形成されたフェオフィチン a 沈殿物をアセトン溶媒に溶解した後、このフェオフィチン a 溶液に直接塩基を処理してクロリン e 6 を製造する。

【0065】

本発明の好ましい具現例によると、クロリン e 6-プロトコール B は、(a) 上述の方法により得られたクロロフィル a に酸を処理し、クロロフィル a からマグネシウムイオンを除去することにより、フェオフィチン a 沈殿物を得る段階と、(b-1) フェオフィチン a 沈殿物にアセトン溶媒を添加し、フェオフィチン a 溶液を得る段階と、(b-2) 前記フェオフィチン a 溶液に塩基を処理し、クロリン e 6 を得る段階とを含む。

10

【0066】

クロリン e 6-プロトコール B によると、塩基として NaOH を利用すると、最終的に製造されるクロリン e 6 がナトリウム塩形態を有するようになる。クロリン e 6-プロトコール A によると、クロリン e 6 の塩を得るために別途の処理をしなければならないが、プロトコール B は、このような過程が省かれる。

【0067】

クロリン e 6-プロトコール B は、プロトコール A より短縮された工程を通じて効率的にクロリン e 6 を製造する。また、クロリン e 6-プロトコール B は、プロトコール A より短縮された工程からなっているが、最終的に製造されたクロリン e 6 の精製度は、プロトコール A より大きい。

20

【0068】

クロリン e 6-プロトコール B のクロリン e 6 に対する精製度は、90~99.99%、好ましくは 92~99.95%、より好ましくは 95~99.90%、最も好ましくは 99.0~99.90% である。クロリン e 6 に対する収率は、クロレラを出発物質とする場合、2~8%、好ましくは、3~8%、より好ましくは、3~5% である。

【発明の効果】

【0069】

本発明の特徴及び利点(advantages)を要約すると以下のようなものである。

(i) 本発明は、破碎されていないクロレラ細胞そのものを利用してクロロフィル a を抽出し、これからクロリン e 6 を製造する。

30

(i i) 本発明で採択しているクロレラ細胞の前処理過程によって高い含量比率のクロロフィル a を得ることができ、これから高い収率でクロリン e 6 を製造することができる。

(i i i) 本発明の方法は、比較的簡単な工程によって行われて、クロリン e 6 の大量生産に適している。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図 1 a】粉砕クロレラを利用し、クロロフィル a に対してエタノール抽出した結果を示す HPLC (High pressure liquid chromatography) クロマトグラムであり、図 1 a は 30 分間抽出した結果である。矢印は、クロロフィル a に該当するピークである。

40

【図 1 b】粉砕クロレラを利用し、クロロフィル a に対してエタノール抽出した結果を示す HPLC (High pressure liquid chromatography) クロマトグラムである。図 1 b は 1 時間 30 分間抽出した結果である。矢印は、クロロフィル a に該当するピークである。

【図 1 c】粉砕クロレラを利用し、クロロフィル a に対してエタノール抽出した結果を示す HPLC (High pressure liquid chromatography) クロマトグラムである。図 1 c は 3 時間抽出した結果である。矢印は、クロロフィル a に該当するピークである。

【図 1 d】粉砕されていないインタクトクロレラを利用し、クロロフィル a に対してエタノール抽出した結果を示す HPLC クロマトグラムである。図 1 d は 30 分間抽出した結果である。矢印は、クロロフィル a に該当するピークである。

【図 1 e】粉砕されていないインタクトクロレラを利用し、クロロフィル a に対してエタ

50

ノール抽出した結果を示すH P L Cクロマトグラムである。図 1 e は、1 時間 3 0 分間抽出した結果である。矢印は、クロロフィル a に該当するピークである

【図 1 f】図 1 f は、粉碎されていないインタクトクロレラを利用し、クロロフィル a に対してエタノール抽出した結果を示すH P L Cクロマトグラムである。図 1 f は 3 時間抽出した結果である。矢印は、クロロフィル a に該当するピークである

【図 2 a】粉碎されていないインタクトクロレラに含まれている成分を分析したH P L Cクロマトグラムである。矢印は、クロロフィル a に該当するピークである。

【図 2 b】クロレラを 6 0 %エタノールで洗浄し、クロロフィル a 以外の他の成分を除去した結果を示すH P L C分析結果である。図 2 b は、6 0 %エタノールによる反復的な洗浄において、1 回目の分析結果である。H P L C分析は、洗浄結果形成された上澄み液に

10

対するものである。
【図 2 c】クロレラを 6 0 %エタノールで洗浄し、クロロフィル a 以外の他の成分を除去した結果を示すH P L C分析結果である。図 2 c は、6 0 %エタノールによる反復的な洗浄において、2 回目の分析結果である。H P L C分析は、洗浄結果形成された上澄み液に

対するものである。
【図 2 d】クロレラを 6 0 %エタノールで洗浄し、クロロフィル a 以外の他の成分を除去した結果を示すH P L C分析結果である。図 2 d は、6 0 %エタノールによる反復的な洗浄において、3 回目の分析結果である。H P L C分析は、洗浄結果形成された上澄み液に

対するものである。
【図 2 e】クロレラを 6 0 %エタノールで洗浄し、クロロフィル a 以外の他の成分を除去した結果を示すH P L C分析結果である。図 2 e は、6 0 %エタノールによる反復的な洗浄において、4 回目の分析結果である。H P L C分析は、洗浄結果形成された上澄み液に

20

対するものである。
【図 2 f】クロレラを 6 0 %エタノールで洗浄し、クロロフィル a 以外の他の成分を除去した結果を示すH P L C分析結果である。図 2 f は、6 0 %エタノールによる反復的な洗浄において、5 回目の分析結果である。H P L C分析は、洗浄結果形成された上澄み液に

対するものである。
【図 2 g】クロレラを 6 0 %エタノールで洗浄し、クロロフィル a 以外の他の成分を除去した結果を示すH P L C分析結果である。図 2 g は、6 0 %エタノールによる反復的な洗浄において、6 回目の分析結果である。H P L C分析は、洗浄結果形成された上澄み液に

30

対するものである。
【図 2 h】1 0 0 %エタノールでクロロフィル a を抽出した結果を示すH P L C分析結果である。矢印は、クロロフィル a に該当するピークである。

【図 2 i】ジオキサンを利用するクロロフィル a の製造方法によって製造されたクロロフィル a に対するH P L Cクロマトグラムである。矢印は、クロロフィル a に該当するピークである。

【図 3 a】本発明によって形成されたフェオフィチン(pheophytin) a に対するH P L Cクロマトグラムである。矢印は、フェオフィチン a に該当するピークである。

【図 3 b】本発明のプロトコール A によって製造されたクロリン e 6 に対するH P L Cクロマトグラムである。矢印は、クロリン e 6 に該当するピークである。

40

【図 3 c】本発明のプロトコール B によって製造されたクロリン e 6 に対するH P L Cクロマトグラムである。矢印は、クロリン e 6 に該当するピークである。

【発明を実施するための形態】

【0 0 7 1】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は、本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の範囲がこれら実施例に限定されないことは、本発明の属する技術分野で通常の知識を有する者にとっては自明なことであろう。

【実施例】

【0 0 7 2】

実施例 1：出発物質として適したクロレラの選択

50

最終的にクロリン e 6 を得るための出発物質として、超音波粉碎クロレラ及び超音波粉碎しなかったインタクト(intact)クロレラ[海水クロレラ、chlorella ellipsoidea、Chlorland co, Ltd]の 2 種の試料を用意した。次いで、超音波粉碎クロレラ及びインタクトクロレラのクロロフィル a 及び他の成分がどのくらい含有されているか確認した。超音波粉碎クロレラ及び海水クロレラをそれぞれ 10 g ずつ取って、エタノールを 100 ml 添加して 30 分間、1 時間 30 分間、3 時間及び 12 時間攪拌した後、ろ過して、抽出溶液を得た。抽出溶液に対して HPLC 分析を行って、HPLC は、SPD-M10AVP カラム付き HPLC システム(Dong-il Shimadzu Corp.)を利用して実施し、注入量は 20 µl、流速は、1 ml/min とした。reference としては、Fluka 会社のクロロフィル a を使用した。図 1 a ~ 1 f において、滞留時間(retention time)約 19.5 分に該当するピークがクロロフィル a に該当するものである。 10

【0073】

図 1 a ~ 1 f から分かるように、インタクトクロレラを利用する場合、超音波粉碎されたクロレラを利用する場合に比べ、約 20 倍程度のクロロフィル a を得ることができる。したがって、超音波粉碎されたクロレラよりはインタクトクロレラを利用することが、クロロフィル a 収率を高めて、結果としてより多いクロリン e 6 が得られることが分かる。クロレラを超音波粉碎して得た粉碎物を利用したエタノール抽出よりは、クロレラそのものを利用したエタノール抽出が、クロロフィル a の抽出効率にさらに優れるという驚くべき事実を見出した。このような新規発見は、クロロフィル精製過程を短縮できる利点を提供するだけでなく、超音波破碎過程でクロロフィル a が酸化される問題点を回避することができるため、非常に重要なことである。 20

【0074】

実施例 2：クロレラからクロロフィル a の取得

プロトコール A

A-1：クロレラからクロロフィル a 以外の他の不純物の除去

まず海水クロレラ(Chlorella ellipsoidea、Chlorland co, Ltd)から塩分を除去するために、蒸留水で洗浄した後、5000 rpm で遠心分離して、クロレラを沈殿させた。次いで、沈殿物を蒸留水で再懸濁し、再び遠心分離を行った。蒸留水による洗浄過程を 5 回行った後、沈殿物を少量取って、HPLC でクロロフィル a 及び他の成分がどのくらい含有されているか確認した。HPLC は、SPD-M10AVP カラム付き HPLC システム(Dong-il Shimadzu Corp.)を利用して実施し、注入量は 20 µl、流速は、1 ml/min とした。reference としては、Fluka 会社のクロロフィル a を使用した。HPLC 結果は、図 2 a に示されている。 30

【0075】

図 2 a から確認できるように、滞留時間(retention time)約 9.7 分でクロロフィル a に該当するピークが観察されて、滞留時間 2.5 ~ 7.5 分で他の各種成分に該当するピークが観察された。

【0076】

海水の除去されたクロレラ(破碎されていないクロレラ細胞そのもの)100 g に 60 % エタノール 300 ml を添加して洗浄し、5000 rpm で遠心分離してクロレラを沈殿させ、滞留時間 2.5 ~ 7.5 分にある不純物を除去した。このようなエタノール洗浄過程を 6 回繰り返して行った。図 2 b ~ 図 2 g は、エタノール洗浄過程において、遠心分離した後、形成された上澄み液に対する HPLC 結果である。 40

【0077】

図 2 b ~ 図 2 g から確認できるように、滞留時間 2.5 ~ 7.5 分で表れる不純物が、60 % エタノール洗浄過程で多量除去されていることが分かる。

【0078】

一方、80 % 以上の濃度のエタノールを利用して洗浄過程を行うと、クロロフィル a が抽出されて、洗浄、即ち不純物の除去ができなかった。また、20 %、40 % 及び 50 % 濃度のエタノールを利用して洗浄過程を行ったが、不純物の除去率が 60 % エタノールに 50

は及ばなかった。

【0079】

したがって、60%エタノールが最も好ましい洗浄溶液であることが分かる。即ち、60%エタノールは、クロレラからクロロフィルaを抽出することなく、クロレラ細胞に含まれているクロロフィルa以外の他の成分を効果的に抽出し、洗浄されたクロレラにクロロフィルaが相対的に高い含量で含まれるようにする。

【0080】

A-2：不純物の除去されたクロレラからクロロフィルaの抽出I

前記不純物の除去されたクロレラ100gに100%エタノール1Lを添加して、3時間攪拌しクロロフィルaを抽出した。抽出過程で利用されたクロレラは、音波破碎などにより破碎されなかったもので、クロレラ細胞そのものを利用して抽出を行った。一般に、細胞破碎物に有機溶媒を処理してクロロフィルaを抽出するが、本実施例では、破碎されていないクロレラ細胞そのものを利用した。抽出結果は、図2hに示されている。

【0081】

図2hから分かるように、滞留時間約8.4分でクロロフィルaに該当するピークが観察されて、図2aで観察された滞留時間2.5~7.5分の不純物が相当量除去されていることが分かった。また、HPLCクロマトグラムによりクロロフィルaの含量(即ち、精製度)が76.92%であることを確認することができた。一方、プロトコールAのクロロフィルaに対する収率は、7.89%であった。

【0082】

プロトコールB

まず海水クロレラ(*Chlorella ellipsoidea*, Chlorland co, Ltd)から塩分を除去するために、蒸留水で洗浄した後、5000rpmで遠心分離して、クロレラを沈殿させた。次いで、沈殿物を蒸留水で再懸濁し、再び遠心分離を行った。蒸留水による洗浄過程を5回行った後、沈殿物を少量取って、HPLCによりクロロフィルa及び他の成分がどのくらい含有されているか確認した。HPLCは、SPD-M10AVPカラム付きHPLCシステム(Dong-il Shimadzu Corp.)を利用して実施し、注入量は20 μ l、流速は、1ml/minとした。referenceとしては、Fluka会社のクロロフィルaを使用した。海水の除去されたクロレラ(破碎されていないクロレラ細胞そのもの)100gに100%エタノール500mlを添加して、5000rpmで遠心分離してクロレラを沈殿させ、上澄み液クロロフィル抽出溶液のみをろ過した。前記クロロフィル抽出物にジオキササン70ml及び蒸留水70mlを添加した後、5時間以上-20℃冷凍室に保管して沈殿を誘導した。次いで、沈殿物をろ過して水で洗浄し、クロロフィルaを得た。次いで、下記のクロリン6製造のために、100%エタノールに前記沈殿物を溶解した。

【0083】

図2iから確認できるように、滞留時間約4.3分でクロロフィルaに該当する主ピークが観察されて、他のピークはほとんど生成されなかった。また、HPLCクロマトグラムでクロロフィルaの含量(即ち、精製度)が84.93%であることを確認することができた。一方、プロトコールBのクロロフィルaに対する収率は、4.26%であった。

【0084】

実験結果、ジオキササンを利用する場合は、より短縮された工程を通じて、高い収率でクロロフィルaを得ることができることが分かる。

【0085】

実施例3：クロロフィルaからクロリン6の製造

実施例3-1：フェオフィチン(pheophytin)aの生成

実施例2のプロトコールAから得られたクロロフィルaを含むエタノール抽出物1L当たり5~10mlの1N HClを処理して、抽出物のpHを2~3になるように調節し、3時間攪拌してクロロフィルaからマグネシウムイオンを除去することにより、フェオフィチンaを得た(図3a)。次いで、黒色のフェオフィチンa溶液を-23℃冷凍室に3~6時間保管して沈殿を形成し、ろ過した。

【0086】

実施例3-2：クロリンe6の生成

プロトコールA

前記実施例3-1のフェオフィチンa沈殿物をアセトンで溶かした後、アセトンを蒸発(evaporation)で除去した。次いで、100%エタノール1Lにフェオフィチンaを溶解して、これに1N NaOH 5~10mlを添加し、フェオフィチンa溶液を含むろ過液のpHを13~14に調節して、12時間攪拌して、フェオフィチンaからクロリンe6を形成させた。その後、反応結果物に1N HClを添加して中和し、ろ過した後、エタノールを完全に除去した(図3b)。図3bのグラフから確認できるように、滞留時間約4.987分でクロリンe6に該当するピークが観察されて、クロリンe6の含量(精製度)は、97.66%であった。

10

【0087】

最終的にクロレラ1000gから48.6gのクロリンe6が得られた(収率：4.86%)。

【0088】

また、クロリンe6の塩形態を製造するために、NaHCO₃またはNH₄HCO₃ 3当量を氷水に溶解した後、クロリンe6に添加して、水をろ過した後、凍結乾燥して、塩形態のクロリンe6を製造した。

【0089】

プロトコールB

前記実施例3-1のフェオフィチンa沈殿物を1Lのアセトンに溶かした後、1N NaOH水溶液5~10mlを加えpHを13~14に調節して、12時間攪拌し、フェオフィチンaからクロリンe6を形成させた。生成されたクロリンe6のNa塩の沈殿物をろ過した後、アセトン及びヘキサンで順に洗浄した後、少量の水に溶解させて、水溶性膜フィルターを利用してクロリンe6溶液をろ過した後、凍結乾燥し、最終クロリンe6 Na塩を得た(図3c)。最終クロリンe6 Na塩は、粉末形態を示した。最終Na塩クロリンe6の収率は、クロレラ10L処理時(遠心分離後1~1.5kg)、25~30gであって、2.5~3.0%である。また、クロリンe6に対する精製度は、99.83%であった。

20

【0090】

プロトコールBによると、NaOH処理によるクロリンe6の生成過程により、クロリンe6のNa塩が直接形成される。このような側面でもプロトコールAと大きい差がある。

30

【産業上の利用可能性】

【0091】

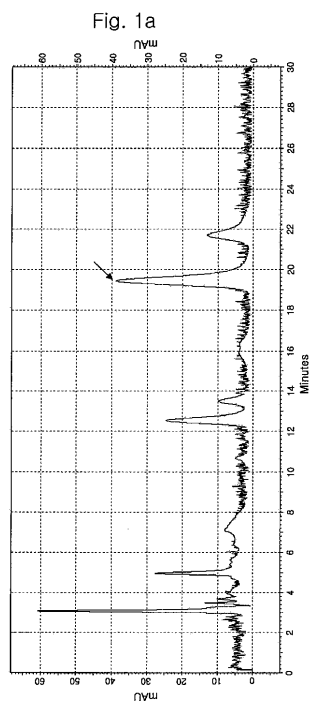
以上詳細に説明したように、本発明は、破碎されていないインタクトクロレラ細胞そのものを利用してクロロフィルaを抽出し、これからクロリンe6を製造して、本発明で採択しているクロレラ細胞の前処理過程によって高い含量比率のクロロフィルaを得ることができ、これから高い収率でクロリンe6を製造することができる。また、本発明の方法は、比較的簡単な工程によって行われて、クロリンe6の大量生産に適している。

40

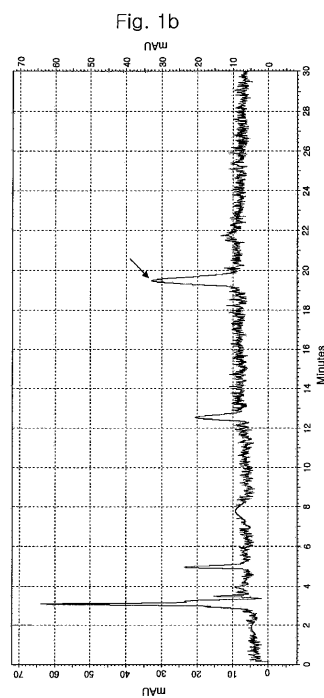
【0092】

以上、本発明の特定な部分を詳細に記述したが、当業界の通常の知識を有する者にとっては、このような具体的な記述はただ望ましい具現例に過ぎなく、これに本発明の範囲が限定されないことは明らかである。従って、本発明の実質的な範囲は、添付の請求項とその等価物により定義されると言える。

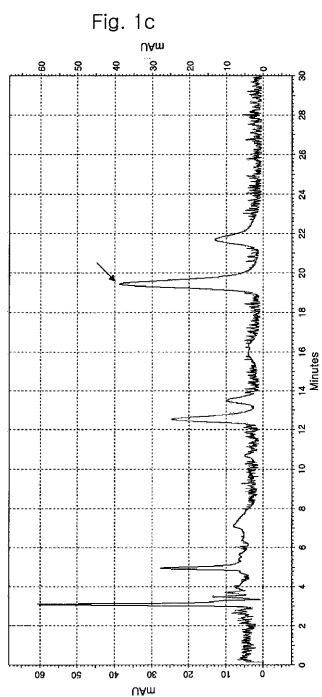
【図 1 a】



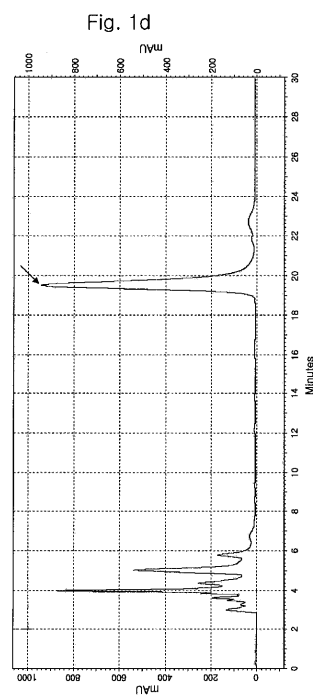
【図 1 b】



【図 1 c】

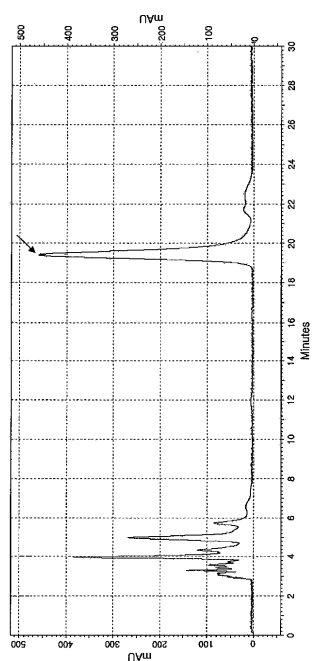


【図 1 d】



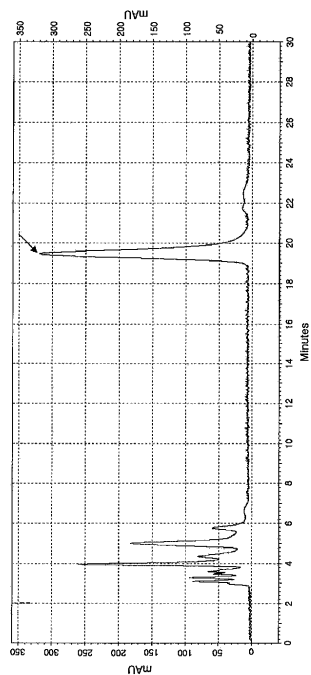
【図 1 e】

Fig. 1e



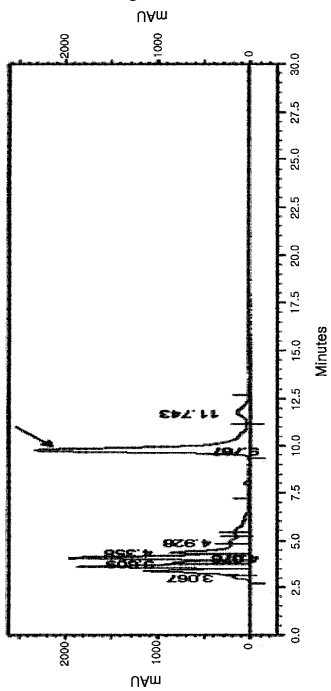
【図 1 f】

Fig. 1f



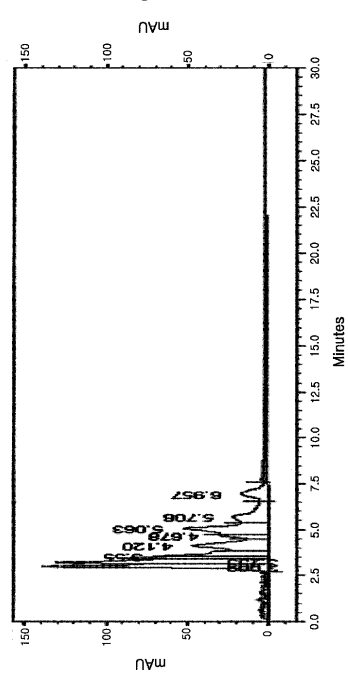
【図 2 a】

Fig. 2a

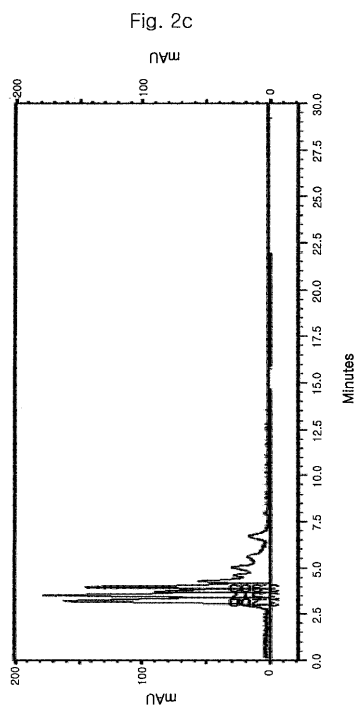


【図 2 b】

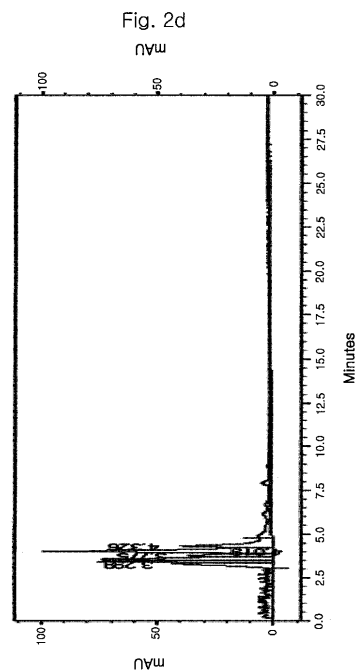
Fig. 2b



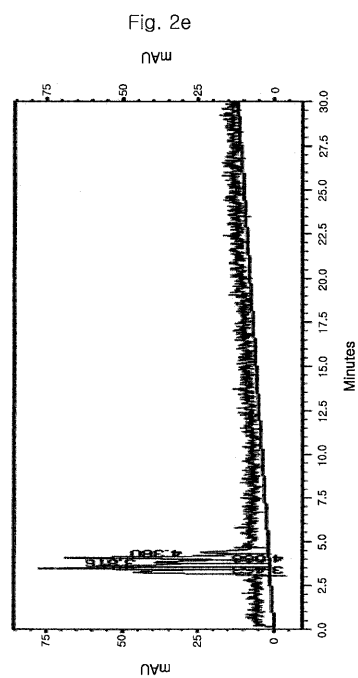
【図 2 c】



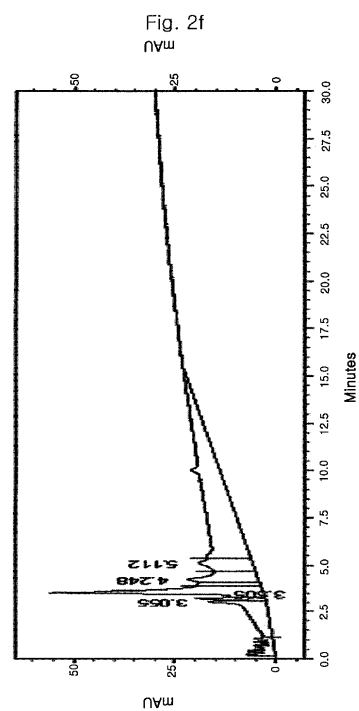
【図 2 d】



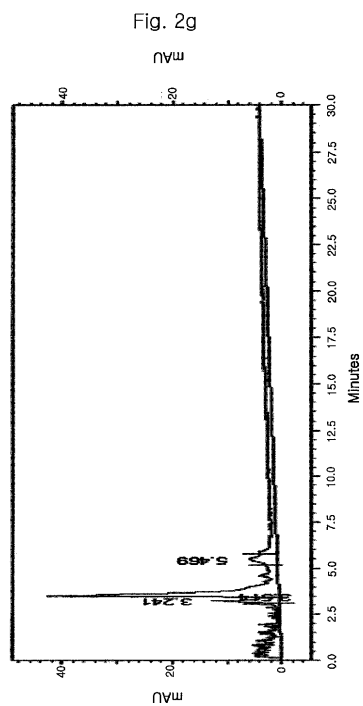
【図 2 e】



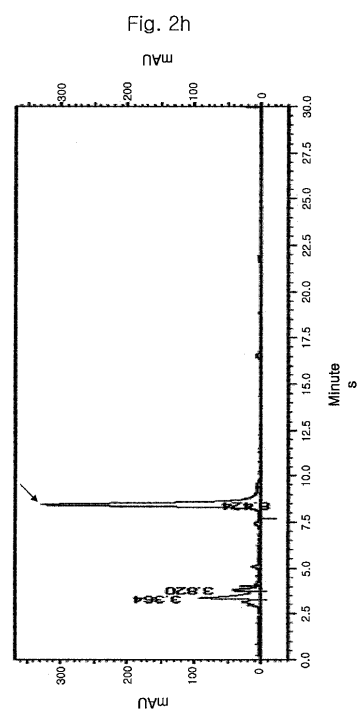
【図 2 f】



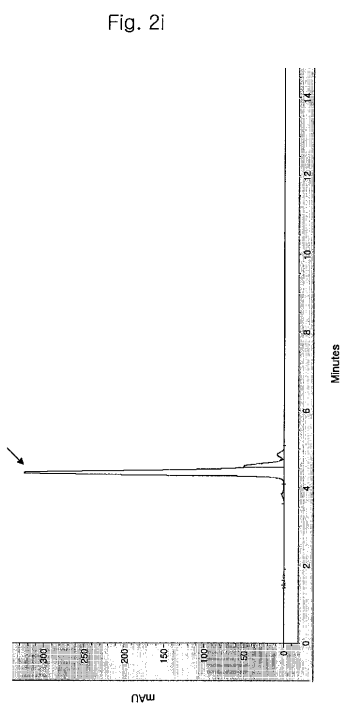
【図 2 g】



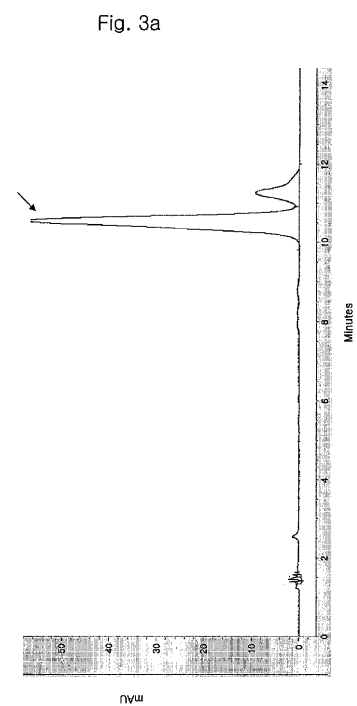
【図 2 h】



【図 2 i】

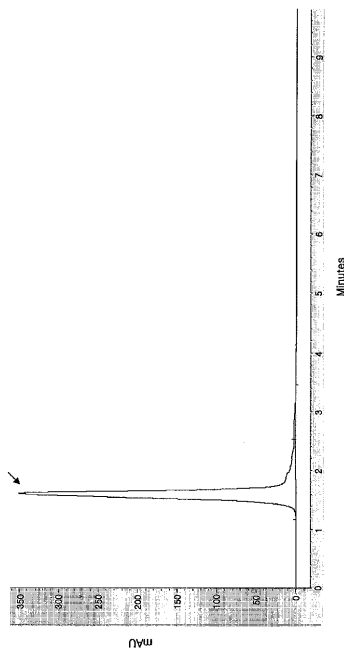


【図 3 a】



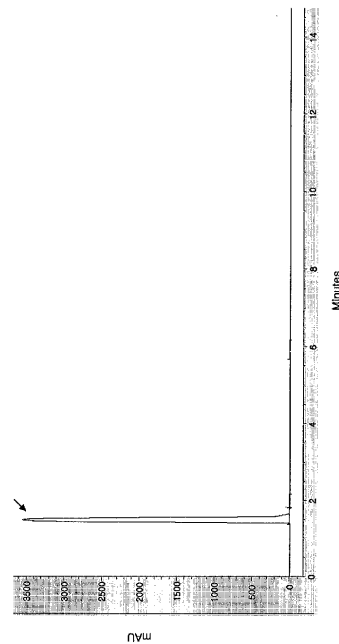
【図 3 b】

Fig. 3b



【図 3 c】

Fig. 3c



【手続補正書】

【提出日】平成21年6月9日(2009.6.9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

破碎されていないインタクト(intact)クロレラに有機溶媒を処理する段階を含むクロロフィル a の製造方法。

【請求項 2】

前記クロレラは、海水クロレラであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記有機溶媒は、エタノールであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

(a) クロレラに 30～80%エタノールを処理して、クロレラからクロロフィル a 以外の他の成分を除去する段階と、

(b) 前記クロレラに 90～100%エタノールを処理して、クロロフィル a を抽出しクロロフィル a 抽出液を得る段階と、

を含むクロロフィル a の製造方法。

【請求項 5】

(a) クロレラに 80～100%エタノールを処理し、クロロフィル a を抽出する段階と、

(b) 前記抽出液にジオキサンを添加し、クロロフィル a の沈殿を誘導する段階と、

を含むクロロフィル a の製造方法。

【請求項 6】

前記クロレラは、破碎されていないインタクト(intact)細胞であることを特徴とする、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記クロレラは、海水クロレラであることを特徴とする、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記段階 (a) におけるエタノールの濃度は、50～65%であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記段階 (a) におけるエタノールの濃度は、58～62%であることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記段階 (a) は、3～6 回繰り返して行うことを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 11】

前記段階 (b) におけるエタノールの濃度は、98～100%であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 12】

前記段階 (a) におけるエタノールの濃度は、90～100%であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 13】

前記段階 (a) におけるエタノールの濃度は、98～100%であることを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記段階 (b) は、ジオキサンを添加した後、追加的に水を抽出液に添加することを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 15】

前記方法は、段階 (b) 以後に、段階 (b) の反応物を -10℃以下で低温処理することを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 16】

前記方法のクロロフィル a に対する収率は、7～9%であり、精製度は、72～80%であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 17】

前記方法のクロロフィル a に対する収率は、4～6%であり、精製度は、80～90%であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2007/002177
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 1/12(2006.01)i</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) C12N 1/12		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN(CAPLUS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHUMANN et. al. 'Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae' In: International Biodeterioration & Biodegradation, 2005, 55(3), pp.213-222	1 - 5, 7 - 18
A	ISHII et. al. 'Water-soluble chlorophyll production from Chlorella vulgaris E-25' In: PasKen Journal, 2000, 11-12, pp.77-85	1 - 28
A	YOUSSEF et. al. 'Studies on pigment extraction and identification of Chlorella and Scenedesmus' In: Egyptian Journal of Botany, 1987, 27(1-3), pp.127-138	1 - 5, 7 - 18
A	WUN et. al. 'A solvent partitioning procedure for the separation of chlorophylls from their degradation products and carotenoid pigments' In: Hydrobiologia, 1980, 71(3), pp.289-293	6, 19 - 28
A	JP 11322753 A (KAMATA et. al.) 24 NOV. 2005, see the entire document.	6, 19 - 28
☐ 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 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 17 AUGUST 2007 (17.08.2007)		Date of mailing of the international search report 17 AUGUST 2007 (17.08.2007)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer LEE, Jae Jeong Telephone No. 82-42-481-5893 

Information on patent family members

PCT/KR2007/002177

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ヨン チョル、キム

大韓民国、 500-712 ガンジュ、バクーグ、オリョンドン 1、ガンジュ インスティ
チュート オブ サイエンス アパートメント C-304

(72)発明者 チ ヨン、パーク

大韓民国、 500-712 ガンジュ、バクーグ、オリョンドン 1、ガンジュ インスティ
チュート オブ サイエンス アパートメント E-601

(72)発明者 ヒョ ジュン、キム

大韓民国、 614-080 プサン、プサンジンギ、チョウップードン 51-91、50/
4

Fターム(参考) 4B064 AE01 CE08 CE10 CE20 DA01 DA20

4C050 PA06 PA07