

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2006年12月14日 (14.12.2006)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/132348 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07C 46/10 (2006.01) C07C 50/06 (2006.01)  
B01J 20/26 (2006.01) C12P 7/66 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/311595
- (22) 国際出願日: 2006年6月9日 (09.06.2006)
- (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2005-170939 2005年6月10日 (10.06.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和▲醗  
▼酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,  
LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁  
目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長野 宏  
(NAGANO, Hiroshi). 山梨 洋人 (YAMANASHI,  
Hiroto). 村田 英城 (MURATA, Hideki).
- (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, 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, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,  
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD,  
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PURIFYING UBIQUINONE-10

(54) 発明の名称: ユビキノーン10の精製方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of purifying ubiquinone-10 characterized by separating and removing a structural analog of ubiquinone-10 contained in a raw material liquid containing ubiquinone-10 by using an acrylic porous cross-linked polymer, more preferably a method of purifying ubiquinone-10 characterized by separating and removing a structural analog of ubiquinone-10 contained in a raw material liquid by feeding the raw material liquid containing ubiquinone-10 to a simulated moving-bed type chromatography apparatus capable of circulating a solution in one direction in a bed packed with an acrylic porous cross-linked polymer and flowing an eluate in the packed bed in one direction.

(57) 要約: 本発明により、アクリル系多孔質架橋重合体を用いて、ユビキノーン10を含有する原料液中に含まれるユビキノーン10構造類似物を分離し、除去することを特徴とするユビキノーン10の精製方法、より好ましくはアクリル系多孔質架橋重合体が充填されている充填床内を溶液が一方向に循環しえる擬似移動床形式のクロマトグラフィー装置に、ユビキノーン10を含有する原料液を供給し、充填床内の溶離液を一方向に移動させることにより、原料液中に含まれるユビキノーン10構造類似物を分離し、除去することを特徴とするユビキノーン10の精製方法が提供される。

WO 2006/132348 A1

## 明 細 書

## ユビキノン-10の精製方法

## 技術分野

[0001] 本発明は、ユビキノン-10の精製方法に関する。

## 背景技術

[0002] ユビキノン-10は広く動植物の組織、微生物の細胞内に存在し、末端電子伝達系の必須成分として重要な働きをしている。またその薬理作用はうつ血性心不全及び冠不全、栄養障害による筋ジストロフィーなどに有効であり、医薬品としても価値の高い物質である。

ユビキノン-10の製造法としては、ユビキノン-10の含有率が高い微生物を培養して得られる培養物から抽出する方法、および合成法が知られている。

[0003] 該培養物から抽出したユビキノン-10を含有する溶液からユビキノン-10を精製する方法としては、シリカゲルまたは活性アルミナを用いる方法(特許文献1および2参照)が知られている。

しかしながら、上記抽出法で得られる抽出液は、ユビキノン-10以外にユビキノン-10構造類似物質を多く含み、該抽出液から晶析法により直接、高純度のユビキノン-10を精製することは困難である。

[0004] ユビキノン-10を含有する培養物から高純度のユビキノン-10を分離、精製する方法としては、メタノールを用いて抽出した溶液から直接ユビキノン-10を晶析させる方法が知られている(特許文献3参照)。

しかしながら、シリカゲルまたは活性アルミナを用いた方法では、ユビキノン-10構造類似物質を多く含む該抽出液を用いた場合、ユビキノン-10を効率よく分離精製することはできない。さらに、シリカゲルおよび活性アルミナは高価であり、工業規模での製造においては、コスト高につながるという問題がある。またメタノールに対するユビキノン-10の溶解度は、5g/L以下と低いため、大量のメタノールを必要とする上記のメタノール抽出法は、環境の面から望ましい方法ではない。

[0005] メタクリル酸メチルとエチレングルコールジメタクルレートの共重合体を用いて、ユビ

キノン-10、ビタミンK1およびビタミンK2からなる脂溶性物質含有試料から、ユビキノ-10を分離精製することが可能であることは知られている(非特許文献1)が、該重合体を用いてユビキノ-10とユビキノ-10構造類似物質を分離し、ユビキノ-10を精製できることは知られていない。

[0006] 擬似移動床式分離法は2つ以上の成分を含む溶液から各成分の移動速度の差に応じて2つの画分に分離する方法として知られている(非特許文献2)が、擬似移動床分離法によりユビキノ-10とユビキノ-10構造類似物質が分離できることは知られていない。

特許文献1:特開昭63-91360号

特許文献2:特開平1-160953号

特許文献3:国際公開第2004/011660号パンフレット

非特許文献1:ダイヤイオン資料 日本錬水株式会社、三菱化学株式会社

非特許文献2:高純度化技術、第2巻 分離技術、フジ・テクノシステム

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、ユビキノ-10の精製法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明は以下の(1)~(6)に関する。

(1)アクリル系多孔質架橋重合体を用いて、ユビキノ-10を含有する原料液中に含まれるユビキノ-10構造類似物を分離し、除去することを特徴とするユビキノ-10の精製方法。

(2)アクリル系多孔質架橋重合体が充填されている充填床内を溶液が一方向に循環しえる擬似移動床形式のクロマトグラフィー装置に、ユビキノ-10を含有する原料液を供給し、充填床内の溶離液を一方向に移動させることにより、該原料液中に含まれるユビキノ-10構造類似物を分離し、除去することを特徴とするユビキノ-10の精製方法。

(3)アクリル系多孔質架橋重合体が平均粒径10~500  $\mu$  mの球状重合粒子である、上記(1)または(2)の方法。

(4) アクリル系多孔質架橋重合体がメタクリル酸エステルとエチレングリコールジメタクリレートとの重合体である、上記(1)～(3)のいずれか1つの方法。

(5) ユビキノン-10を含有する原料液がユビキノン-10を生産する能力を有する微生物の培養物の抽出物、またはユビキノン-10の粗精製物である、上記(1)～(4)のいずれか1つの方法。

(6) ユビキノン-10構造類似物質が5-デメトキシユビキノン-10である、上記(1)～(5)のいずれか1つの方法。

### 発明の効果

[0009] 本発明により、ユビキノン-10を効率よく精製することができる。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は擬似移動床方式の分離装置を示す図である。

### 符号の説明

[0011] W:溶離液の供給管

F:原料液の供給管

L:5-デメトキシユビキノン-10溶液の抜出管

A:ユビキノン-10溶液の抜出管

$W_1 \sim W_4$ :バルブ

$F_1 \sim F_4$ :バルブ

$L_1 \sim L_4$ :バルブ

$A_1 \sim A_4$ :バルブ

$R_1 \sim R_4$ :逆止弁

### 発明を実施するための最良の形態

[0012] 1. 本発明で用いられるアクリル系多孔質架橋重合体

本発明の方法で用いられるアクリル系多孔質架橋重合体としては、ユビキノン-10とユビキノン-10構造類似物に対して親和性が異なるアクリル系多孔質架橋重合体であれば特に制限はないが、好ましくは平均粒径が10～500 $\mu$ m、好ましくは10～200 $\mu$ m、より好ましくは10～100 $\mu$ mの重合体をあげることができる。

[0013] また、本発明の方法で用いられるアクリル系多孔質架橋重合体としては、メタクリル酸メチルなどのメタクリル酸エステルとエチレングリコールジメタクリレートとの架橋重合体などがあげられ、例えばメタクリル酸メチルとエチレングリコールジメタクリレートとの架橋重合体であるダイヤイオン HP2MG (三菱化学社製)などをあげることができる。

## 2. ユビキノン-10を含有する原料液

ユビキノン-10を含有する原料液としては、ユビキノン-10とユビキノン-10構造類似物とを含む溶液であれば特に制限されないが、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析したとき、ユビキノン-10に対するユビキノン-10構造類似物の重量比が10%以下、好ましくは5%以下、より好ましくは3%以下、さらに好ましくは2%以下であるユビキノン-10を含有する原料液をあげることができる。HPLCの分析条件としては、以下の4に記載の条件をあげることができる。

[0014] 該ユビキノン-10を含有する原料液としては、ユビキノン-10を生産する能力を有する微生物の培養物の抽出物およびユビキノン-10の粗精製物などをあげることができる。

ユビキノン-10を生産する能力を有する微生物の培養物は、ユビキノン-10を生産する能力を有する微生物を常法により培養することによって取得することができる。

[0015] ユビキノン-10を生産する能力を有する微生物としては、該能力を有する微生物であれば、いずれの微生物でもよいが、例えば、ユビキノン-10を生産する微生物として知られている担子菌、真菌、酵母、および細菌をあげることができる。より具体的には、担子菌としては Ustilago 属、真菌としては Aspergillus 属、Exobasidium 属、Geotrichum 属、Monascus 属、Paecilomyces 属、Sporotrichum 属および Tilletiopsis 属、酵母としては Aureobasidium 属、Brettanomyces 属、Bullera 属、Candida 属、Cryptococcus 属、Leucosporidium 属、Oosporidium 属、Rhodotorula 属、Rhodosporium 属、Schizosaccharomyces 属、Sporobolomyces 属、Torulopsis 属、Tremella 属、Trichosporon 属および Sporidiobolus 属、細菌としては、Acetobacter 属、Agrobacterium 属、Corynebacterium 属、Erythrobacter 属、Flavobacterium 属、Methylobacter 属、Microcycclus 属、Paracoccus 属、Phyllobacterium 属、Protaminobacter 属、Pseudomonas 属、Rhizobium 属、Rhod

obacter属およびXantomonas属に属する微生物等をあげることができ、好ましくはRhodobacter属に属する微生物、より好ましくはRhodobacter sphaeroidesをあげることができる。

- [0016] また、遺伝子組換え等の手法により、ユビキノン合成酵素が強化されたEscherichia属に属する微生物、および該酵素が強化された上記のユビキノナー10を生産する能力を有する微生物も本発明の方法に用いることができる。

上記の微生物を培養するための培地としては、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該微生物の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

- [0017] 炭素源としては、該微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

- [0018] 無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常 16時間～ 14日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

- [0019] 培養終了後、培養物、または該培養物を遠心分離して得られる菌体、または該菌体をスプレードライヤー等で乾燥菌体としたものに、溶媒を添加し、ユビキノナー10を抽出するのに十分な時間、好ましくは1～3時間攪拌した後、ユビキノナー10を含む

画分を溶媒層、または菌体等の不溶物を除去した溶液層として分離することにより、本発明に用いられるユビキノン-10を生産する能力を有する微生物の培養物の抽出物を取得することができる。

- [0020] 上記の溶媒としては、ユビキノン-10を生産する能力を有する微生物の培養物からユビキノン-10を抽出することができる溶媒であれば、親油性溶媒、親水性溶媒、またはそれらの混合物のいずれの溶媒であってもよく、親油性溶媒としては、ヘキサン、ヘプタンなど、より好ましくはヘキサンをあげることができ、親水性溶媒としてはメタノール、エタノール、アセトンなど、より好ましくはエタノールをあげることができ、親油性溶媒と親水性溶媒の混合物としては、上記した親油性溶媒と親水性溶媒の任意の組み合わせをあげることができる。
- [0021] 親油性溶媒と親水性溶媒の混合物における両者の混合比は、ユビキノン-10を生産する能力を有する微生物の培養物からユビキノン-10を抽出することができる混合比であれば、いかなる比率であってもよいが、親油性溶媒と親水性溶媒の混合体積比としては、好ましくは1000:1~1:1、より好ましくは500:1~1:1、さらに好ましくは200:1~2:1、特に好ましくは100:1~3:1、最も好ましくは50:1~4:1の比率をあげることができる。
- [0022] ユビキノン-10の粗精製物としては、例えば、ユビキノン-10を生産する能力を有する微生物を培養して得られる培養物から溶媒等を用いてユビキノン-10を抽出して得られる抽出液を乾燥または凍結乾燥して得られる乾燥物、または該抽出方法により得られる抽出液を晶析して得られる結晶を、溶媒に溶解して得られる溶液あげることができる。溶解に用いる溶媒としてはユビキノン-10を溶解することができる溶媒であれば、いずれでもよいが、好ましくは上記したユビキノン-10を生産する能力を有する微生物の培養物からユビキノン-10を抽出する際に用いることができる溶媒、より好ましくは、下記の分離液と同じ組成の溶媒をあげることができる。
- [0023] ユビキノン-10を含有する原料液中に含まれるユビキノン-10構造類似物としては、5-デメトキシユビキノン-10、6-メトキシ-2-ポリプレニル1, 4-ベンゾキノ、6-メトキシ-2-ポリプレニルフェノールなどをあげることができ、好ましくは5-デメトキシユビキノン-10をあげることができる。

### 3. 本発明のユビキノン-10の精製方法

#### (1) 単塔式分離法

分離剤としてアクリル系多孔質架橋重合体を充填した充填床の上端からユビキノン-10を含有する原料液を供給し、次いで同じく上端から溶離液を供給して、原料液の各成分を相互に分離させると、充填床下部より、まず、分離剤に対して親和力の弱いユビキノン-10画分を取得でき、次に、ユビキノン-10よりも分離剤に対して親和力の強い5-デメキシユビキノン-10等のユビキノン-10構造類似物の画分を取得することができる。

[0024] 単塔式分離法を実施するために必要な条件(溶離液の組成、温度など)としては、以下の擬似移動床式分離法に記載の条件をあげることができる。

#### (2) 擬似移動床式分離法

擬似移動床式分離法には、市販の擬似移動床式分離装置、および充填床の前端と後端とが溶液流路で連結されていて、装置内を溶液が循環し得るようになっている擬似移動床式分離装置であれば、いずれも用いることができる。

[0025] 具体的な擬似移動床式装置としては、充填床には溶液の流れに沿って、原料液の供給口、分離剤に対して親和力の弱い成分が濃縮された溶液を抽出す抜出口、溶離液の供給口、および分離剤に対して親和力の強い成分が濃縮された溶液の抜出口の4種の供給口および抜出口が、この順序で設けられていて、充填床内に形成されている各成分の濃度分布の移動につれて、作動する供給口および抜出口がその相対的位置関係を保ったままで、定期的の下流の供給口及び抜出口に切り替えられる装置をあげることができる。

[0026] 擬似移動床の充填床は、分離剤としてはアクリル系多孔質架橋重合体が充填されており、その機能により、原料液の供給口と親和力の弱い成分が濃縮された溶液の抜出口との間を占める吸着帯域、この抜出口と溶離液の供給口との間を占める精製帯域、溶離液の供給口と親和力の強い成分が濃縮された溶液の抜出口との間を占める脱着帯域、この抜出口と原料液の供給口との間を占める濃縮帯域という4つの帯域に分かれており、この4つの帯域が、作動する供給口及び抜出口の切り替えと共に順次下流方向に移動する。

- [0027] 本発明で用いられる擬似移動床方式としては、充填床内に常に溶液を循環させることにより各成分を相互に分離させ、かつこの循環流にユビキノーン-10を含有する原料液(以下、単に原料液ともいう)および溶離液を供給し、同時に各抜出口では、この循環流からその一部を抜き出す方式、および溶液の循環による成分の相互分離と、原料液および溶離液の供給、ならびにユビキノーン-10溶液およびユビキノーン-10構造類似物溶液の抽出しとを別個に行う方式(特開平2-49159号公報)などをあげることができるが、好ましくは後者の方式をあげることができる。
- [0028] 具体的には、ユビキノーン-10を含有する原料液と溶離液とをそれぞれの供給口から充填床に供給し、かつユビキノーン-10溶液の抜出口の位置に到達した溶液はその一部を充填床から抽出し、ユビキノーン-10構造類似物溶液の抜出口の位置に到達した溶液はその全量を充填床から抽出し供給-抽出ステップと、充填床への原料液および溶離液の供給、ならびに充填床からの溶液の抽出しを行わずに、充填床内の溶液を下流方向に移動させる循環ステップとから成る工程を行い、次いで作動する供給口および抜出口を、その相対的位置関係を維持しながら、下流の供給口および抜出口に切替えて再び上記の工程を行う方式をあげることができる。
- [0029] このように供給-抽出ステップと循環ステップとから成る工程と、作動する供給口および抜出口の切替えとを反復することにより、原料液をユビキノーン-10溶液と、ユビキノーン-10構造類似物溶液とに分離することができる。この方法では、4個の単位充填床から成る擬似移動床のような簡単な装置を用いても、良好な分離成績を達成することができる。
- [0030] いずれの方式による場合でも原料液としてはユビキノーン-10の濃度が10~300g/L、好ましくは20~200g/L、より好ましくは30~100g/L、さらに好ましくは40~80g/Lの原料液をあげることができる。また、原料液および溶離液の温度としては、ユビキノーン-10を効率よく精製できる温度であれば特に制限はないが、好ましくは充填床内の溶液の粘度が低く、ユビキノーン-10の結晶が析出しない温度をあげることができる。例えば20~50℃、好ましくは23~28℃、より好ましくは25℃前後をあげることができる。
- [0031] 原料液は、必要に応じてプレカラム処理を行い、アクリル系多孔質架橋重合体に不

可逆吸着する物質を除去した溶液として装置に供給するのが好ましい。プレカラム処理に用いるアクリル系多孔質架橋重合体としては、ユビキノーン-10に対する吸着力が弱い重合体であれば、いかなる重合体であってもよいが、好ましくは、後の工程の単塔式分離法または擬似移動床式分離法に用いられるアクリル系多孔質架橋重合体と同一の重合体をあげることができる。

[0032] 溶離液は、原料液に対し通常2~10倍、好ましくは3~5倍の量が用いられる。

溶離液としては、ユビキノーン-10とユビキノーン-10構造類似物とを分離できる溶離液であればいかなるものであってもよく、親油性溶媒、親水性溶媒またはそれらの混合物をあげることができる。親油性溶媒としては、ヘキサン、ヘプタンなど、親水性溶媒としては、メタノール、エタノール、アセトンなど、親油性溶媒と親水性溶媒の混合物としては、上記した親油性溶媒と親水性溶媒の任意の組み合わせからなる混合物をあげることができる。

[0033] ユビキノーン-10構造類似物が5-デメトキシユビキノーン-10である場合、親油性溶媒としては、好ましくはヘキサン、親水性溶媒としては、好ましくはエタノール、親油性溶媒と親水性溶媒の混合物としては、好ましくはヘキサンとエタノールの混合物をあげることができる。

親油性溶媒と親水性溶媒の混合物における両者の混合比は、ユビキノーン-10とユビキノーン-10構造類似物を効率よく分離できる混合比であれば、いかなる比率であってもよいが、親油性溶媒と親水性溶媒の混合体積比としては、好ましくは1000:1~1:1、より好ましくは500:1~1:1、さらに好ましくは200:1~2:1、特に好ましくは100:1~2:1、最も好ましくは50:1~10:1の比率をあげることができる。

[0034] 親油性溶媒と親水性溶媒の混合物がヘキサンとエタノールの混合物である場合、ヘキサンとエタノールの混合体積比としては、特に好ましくは40:1~20:1をあげることができる。

溶離液の線速度としては、上記分離液を用いてユビキノーン-10とユビキノーン-10構造類似物を効率よく分離できる線速度であれば、いかなる速度であってもよいが、好ましくは0.5~10.0m/h、より好ましくは0.7~5.0m/h、さらに好ましくは1.0~2.0m/hの速度をあげることができる。

## 4. 本発明の方法で得られるユビキノン-10

本発明の方法で得られるユビキノン-10としては、以下のHPLC条件でユビキノン-10含有試料を分析したとき、該試料中に含まれる不純物としてのユビキノン-10構造類似物の重量%が、0.05%以下、好ましくは0.03%以下、より好ましくは0.02%以下であるユビキノン-10をあげることができる。

HPLC分析条件:

カラム: ZORBAX SIL 4.6mm I.D. × 250mm (GL Science社製)

溶離液組成: シクロヘキサン: ジエチルエーテル = 4:1

流速: 0.5ml/min

温度: 25°C

検出: UV275nm

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

## 実施例 1

## [0035] ユビキノン-10を含有する原料液の調製

以下の表1記載の組成を有する培地をpH9.0に調整し、炭酸カルシウムを1%添加した後、121°Cで10分間滅菌した1.8Lの培地を入れた3Lの発酵槽にユビキノン-10生産菌であるRhodobacter sphaeroides ATCC21286を植菌し、8日間、28°C、攪拌回転数450rpmで培養した。表中、トレースエレメントとは、88mg/lのテトラホウ酸ナトリウム(ホウ砂、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )、37mg/lのモリブデン酸アンモニウム[( $\text{NH}_4$ ) $_6$  $\text{Mo}_7$  $\text{O}_{24}$ ·4 $\text{H}_2\text{O}$ ]、8.8mg/lの硫酸亜鉛( $\text{ZnSO}_4$ )、270mg/lの硫酸銅( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )、7.2mg/lの塩化マンガン( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )および970mg/lの塩化第2鉄( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )からなる溶液を示す。

## [0036] [表1]

表1

組成物	濃度
廃糖蜜	4.0 %
グルコース	2.7 %
コーンステープリカー	4.0 %
硫酸アンモニウム	0.8 %
リン酸第1カリウム	0.05 %
リン酸第2カリウム	0.05 %
硫酸マグネシウム・7水和物	0.025%
硫酸第一鉄・7水和物	3.0mg/L
チアミン	8.0mg/L
ニコチン酸	8.0mg/L
トレースエレメント	1.0mL/L

[0037] 培養終了後、遠心分離により回収した菌体をスプレードライヤーで乾燥し、ユビキノ-10を含有する乾燥菌体を取得した。該乾燥菌体に、エタノールを10倍量添加して、60℃で3時間攪拌し、ユビキノ-10を含有するエタノール溶液を取得した。取得したエタノール溶液を濃縮した後、15℃まで冷却することでユビキノ-10の結晶を析出させ、ユビキノ-10含有粗精製物を取得した。

[0038] 該粗精製物をヘキサン:エタノール=25:1の溶液に溶解後、メタクリル酸メチルとエチレングリコールジメタクリレート多孔質架橋重合体(ダイヤイオン HP2MG)が充填されたプレカラム(三菱化学社製)に通塔して、不可逆的吸着成分を除去して得られた溶液をユビキノ-10を含有する原料液とした。該原料液を以下の条件でHPLC分析したところ、原料液中には、48g/Lのユビキノ-10および0.4g/Lの5-デメトキシユビキノ-10が含まれていることがわかった。

HPLC分析条件:

カラム:ZORBAX SIL 4. 6mm I.D. ×250mm (GL Science)

溶離液組成:シクロヘキサン:ジエチルエーテル =4:1

流速:0.5ml/min

温度:25℃

検出:UV275nm

## 実施例 2

### [0039] 擬似移動床分離装置を用いたユビキノーン-10の精製

擬似移動床分離装置には、内径20mm、充填層高250mmの4個の単位充填床から成っており、図1に示す配置に原料液の供給管F、溶離液の供給管W、ユビキノーン-10溶液の抽出し管A、およびユビキノーン-10構造類似物である5-デメトキシユビキノーン-10溶液の抽出管Lを備えている小型クロマト分離装置Labo fine(日本錬水社製)を用いた。

### [0040] 各単位充填床にはメタクリル酸メチルとエチレングリコールジメタクリレートの多孔質架橋重合体(ダイヤイオン HP2MG、平均粒径75 $\mu$ m、三菱化学社製)を充填した。

上記した擬似移動床分離装置に、実施例1で得られたユビキノーン-10を含有する原料液、およびヘキサン:エタノール=25:1の混合液である溶離液を25 $^{\circ}$ Cで供給し、ユビキノーン-10溶液と5-デメトキシユビキノーン-10溶液を抽出す11分間の供給-抽出ステップと、供給-抽出を行わずに内部の溶液を循環的に移動させる15分間の循環ステップとからなる工程を、供給口及び抜出口を順次直下の単位充填床の対応する供給口及び抜出口に切替つつ反復することにより行った。従って、工程を4回反復すると、元の状態に復帰する。供給-抽出ステップにおける原料液および溶離液の供給速度、並びに溶液の抽出し速度と、循環ステップにおける循環液の流速(循環ポンプの送液流速)はいずれも360ml/h(線速度1.15m/h)で行った。

### [0041] 4回の工程の反復により、装置が最初の状態に復帰するまでの間における弁(バルブ)の開閉は、次の表2に示す通りに行った。○は弁の開いた状態を×は閉じた状態を表す。原料液、ならびに30サイクル運転後のユビキノーン-10溶液および5-デメトキシユビキノーン-10溶液に含まれていたユビキノーン-10および5-デメトキシユビキノーン-10の濃度を表3に示す。なお、ユビキノーン-10および5-デメトキシユビキノーン-10の濃度測定は、実施例1記載のHPLC分析と同一の方法で行った。

### [0042] [表2]

表 2

工程 step	原料液供給弁				溶離液供給弁				ユビキノーン-10 抽出弁				5-デメトキシユビキノーン-10 抽出弁			
	F1	F2	F3	F4	W1	W2	W3	W4	A1	A2	A3	A4	L1	L2	L3	L4
1	供給抽出	○	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×
	供給抽出	×	×	×	×	×	×	○	×	○	×	×	×	×	×	×
	供給抽出	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	○	×
	循環	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
2	供給抽出	×	○	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×
	供給抽出	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×
	供給抽出	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	○
	循環	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
3	供給抽出	×	×	○	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×
	供給抽出	×	×	×	×	○	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×
	供給抽出	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×
	循環	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
4	供給抽出	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×
	供給抽出	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	○	×	×	×	×
	供給抽出	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	○	×	×
	循環	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

[0043] [表3]

表 3

	ユビキノーン-10		5-デメトキシユビキノーン-10	
	濃度 (g/L)	収率 (%)	濃度 (g/L)	収率 (%)
原料液	48.2	100.0	0.40	100.0
ユビキノーン-10 溶液	7.8	99.8	0.0	0.0
5-デメトキシユビキノーン-10 溶液	0.0	0.2	0.04	100.0

[0044] 表3に示す通り、本発明の方法により、ユビキノーン-10構造類似物である5-デメトキシユビキノーン-10を含まないユビキノーン-10が収率99.8%で得られることが明らかとなった。すなわち、本発明の方法は、ユビキノーン-10構造類似物である5-デメトキシユビキノンの除去率が100%であり、かつユビキノーン-10を効率よく精製できる方法である。

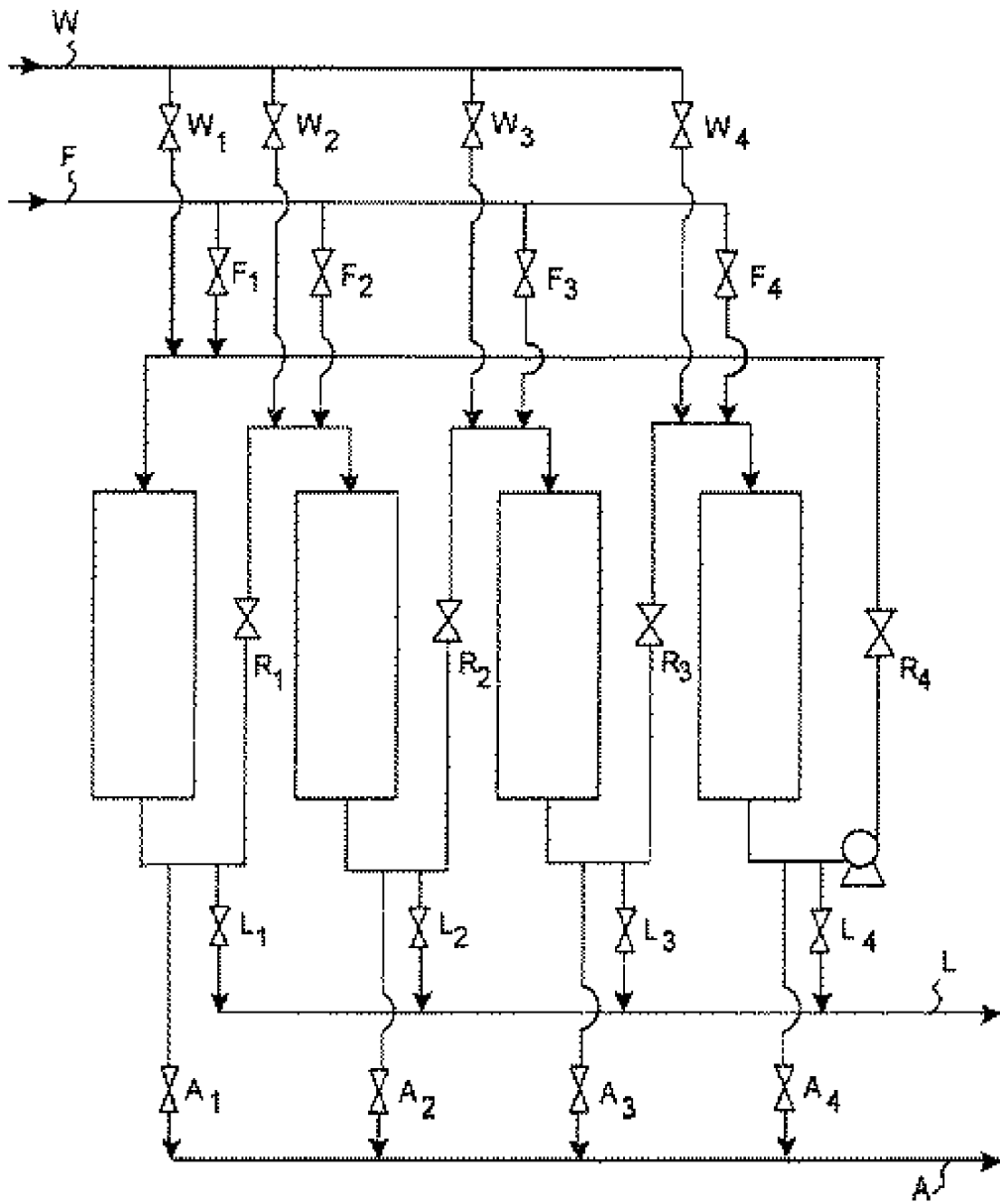
#### 産業上の利用可能性

[0045] 本発明は、ユビキノーン-10を含有する原料液中に含まれるユビキノーン-10構造類似物を高い効率で分離し、除去するために用いることができる。

## 請求の範囲

- [1] アクリル系多孔質架橋重合体を用いて、ユビキノン-10を含有する原料液中に含まれるユビキノン-10構造類似物を分離し、除去することを特徴とするユビキノン-10の精製方法。
- [2] アクリル系多孔質架橋重合体が充填されている充填床内を溶液が一方向に循環しえる擬似移動床形式のクロマトグラフィー装置に、ユビキノン-10を含有する原料液を供給し、充填床内の溶離液を一方向に移動させることにより、該原料液中に含まれるユビキノン-10構造類似物を分離し、除去することを特徴とするユビキノン-10の精製方法。
- [3] アクリル系多孔質架橋重合体が平均粒径10~500  $\mu$  mの球状重合粒子である、請求項1または2記載の方法。
- [4] アクリル系多孔質架橋重合体がメタクリル酸エステルとエチレングリコールジメタクリレートとの重合体である、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。
- [5] ユビキノン-10を含有する原料液がユビキノン-10を生産する能力を有する微生物の培養物の抽出物、またはユビキノン-10の粗精製物である、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。
- [6] ユビキノン-10構造類似物質が5-デメトキシユビキノン-10である、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

[図1]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/311595

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <i>C07C46/10(2006.01) i, B01J20/26(2006.01) i, C07C50/06(2006.01) i, C12P7/66(2006.01) i</i>  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C07C46/10, B01J20/26, C07C50/06, C12P7/66</i>  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table border="0"> <tr> <td><i>Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1922-1996</i></td> <td><i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i></td> <td><i>1996-2006</i></td> </tr> <tr> <td><i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1971-2006</i></td> <td><i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1994-2006</i></td> </tr> </table> Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)			<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2006</i>	<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2006</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2006</i>		
<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2006</i>									
<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2006</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2006</i>									
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X Y A	JP 52-51305 A (Nisshin Flour Milling Co., Ltd.), 25 April, 1977 (25.04.77), Claims; page 2, upper left column, line 18 to upper right column, line 5, lower right column, lines 2 to 11; page 3, upper left column, lines 15 to 18; examples (Family: none)	1, 3, 5, 6 2, 5 4										
Y	JP 62-240643 A (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 21 October, 1987 (21.10.87), Claims; page 2, lower right column, line 18 to page 3, upper left column, line 1; page 5, upper left column, lines 10 to 14 (Family: none)	2, 5										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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)</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>“&amp;” document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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	“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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	“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)	“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	“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family	“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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											
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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											
“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)	“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											
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family											
“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 August, 2006 (21.08.06)		Date of mailing of the international search report 29 August, 2006 (29.08.06)										
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer										
Facsimile No.		Telephone No.										

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07C46/10(2006.01)i, B01J20/26(2006.01)i, C07C50/06(2006.01)i, C12P7/66(2006.01)i										
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. C07C46/10, B01J20/26, C07C50/06, C12P7/66										
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2006年									
日本国実用新案登録公報	1996-2006年									
日本国登録実用新案公報	1994-2006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)										
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 請求の範囲の番号								
X Y A	JP 52-51305 A (日清製粉株式会社) 1977.04.25, 特許請求の範囲, 第2頁左上欄第18行-同右上欄第5行, 同右下欄第2-11行, 第3頁左上欄第15-18行, 実施例 (ファミリーなし)	1,3,5,6 2,5 4								
Y	JP 62-240643 A (三菱瓦斯化学株式会社) 1987.10.21, 特許請求の範囲, 第2頁右下欄第18行-第3頁左上欄第1行, 第5頁左上欄第10-14行 (ファミリーなし)	2,5								
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 21.08.2006	国際調査報告の発送日 29.08.2006									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 松本 直子 電話番号 03-3581-1101 内線 3443	4H 9546								