



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109415744 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201780040685.4

(22)申请日 2017.06.30

(30)优先权数据

2016-131817 2016.07.01 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/024154 2017.06.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/003974 JA 2018.01.04

(71)申请人 株式会社钟化

地址 日本大阪府

(72)发明人 W.Y.李 铃木康之 神田彰久

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 沈雪

(51)Int.Cl.

C12P 7/66(2006.01)

B01D 15/00(2006.01)

B01J 20/16(2006.01)

B01J 20/18(2006.01)

B01J 20/20(2006.01)

B01J 20/22(2006.01)

B01J 20/26(2006.01)

权利要求书1页 说明书18页

(54)发明名称

辅酶Q10的制造方法

(57)摘要

本发明的课题在于提供一种从产辅酶Q10微生物的提取液中高效地除去来自微生物的杂质、用于简洁且稳定地操作运行辅酶Q10的制造工序的辅酶Q10制造方法。本发明的特征在于,使产辅酶Q10微生物的提取液与以硅酸铝作为主成分的吸附剂(A)接触的辅酶Q10的制造方法。另外,优选为将上述吸附剂(A)和与其不同的吸附剂(B)组合使用的上述制造方法。

1. 一种辅酶Q10的制造方法,该方法包括:

使产辅酶Q10微生物的提取液与以硅酸铝作为主成分的吸附剂(A)接触。

2. 根据权利要求1所述的制造方法,其中,

所述吸附剂(A)含有50%以上的硅酸铝。

3. 根据权利要求1或2所述的制造方法,其中,

将所述吸附剂(A)和与其不同的吸附剂(B)组合使用。

4. 根据权利要求3所述的制造方法,其中,

所述吸附剂(B)为选自以下吸附剂中的1种以上:活性炭、以活性炭作为主成分的吸附剂、使苯乙烯与二乙烯基苯共聚而成的合成吸附剂、苯酚-甲醛类吸附树脂、醛类吸附剂、硅酸镁、氢氧化铝、氧化铝、氧化镁、硅藻土、活性氧化铝、硅胶、二氧化硅氧化镁凝胶、使烷基或烯丙基化学键合于无机单体而成的吸附剂、芳香族类吸附剂、甲基丙烯酸酯吸附剂、合成沸石、以及珍珠岩类过滤剂。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的制造方法,其具有如下工序:

将和所述吸附剂(A)接触后的产辅酶Q10微生物的提取液与该吸附剂(A)分离,并对分离后的提取液进行进一步处理。

6. 根据权利要求5所述的制造方法,其中,

所述处理工序是选自浓缩、溶剂置换、氧化、还原、柱色谱及晶析中的1种以上的工序。

辅酶Q10的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及辅酶Q10的制造方法。更具体而言,本发明涉及使用吸附剂从产辅酶Q10微生物的提取液中除去杂质的辅酶Q10的制造方法。

背景技术

[0002] 辅酶Q是从细菌至哺乳动物广泛分布于生物体中的必需成分,作为生物体内的细胞中的线粒体的电子传递链构成成分而广为人知。已知辅酶Q通过在线粒体内反复进行氧化和还原而起到电子传递链中作为传递成分的功能,而且还还原型辅酶Q还具有抗氧化作用。对于人的辅酶Q而言,在辅酶Q的侧链具有10个重复结构的辅酶Q10是主要成分,在生物体内,通常40~90%左右以还原型的形式存在。作为辅酶Q的生理作用,可以列举:由线粒体激活作用带来的能量产生的活化、心功能的活性化、细胞膜的稳定化效果、由抗氧化作用带来的细胞的保护效果等。

[0003] 目前制造、销售的辅酶Q10中多数为氧化型,近年来,显示出比氧化型辅酶Q10更高的口服吸收性的还原型辅酶Q10也已上市,逐渐被广泛使用。

[0004] 已知一些方法来制造辅酶Q10。例如,专利文献1中记载了一种还原型辅酶Q10的制造方法,该方法包括,利用含有还原型辅酶Q10的溶液,通过冷却晶析、不良溶剂晶析、或冷却晶析与其它晶析方法组合而成的方法使还原型辅酶Q10结晶。

[0005] 另外,专利文献2中记载了一种反复进行提取处理及吸附处理的辅酶Q的制造方法,其中,所述提取处理是在水的存在下使亲水性溶剂与含辅酶Q的物质接触,所述吸附处理是使该提取处理中得到的辅酶Q提取液中的辅酶Q吸附于疏水性吸附剂。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本特开2015-131766号公报

[0009] 专利文献2:日本特开昭59-173088号公报

发明内容

[0010] 发明要解决的课题

[0011] 对于上述现有的方法而言,在稳定且廉价、简便地大量生产辅酶Q10方面,仍存在改进的余地。

[0012] 例如,对于专利文献1的方法而言,在由产辅酶Q10微生物得到的提取液等杂质大量共存的情况下,仅通过晶析难以得到高纯度的辅酶Q10,即使在能够得到的情况下,也存在需要严格控制晶析的操作温度等操作条件、结晶化的工序需要的时间长等问题。另外,对于专利文献2的吸附方法而言,以将辅酶Q10自身吸附于吸附剂为目的,为了得到辅酶Q10,在吸附处理后,需要进一步使用解吸用溶剂使辅酶Q从吸附剂中解吸溶出的工序。

[0013] 本发明提供一种用于解决上述这样的课题、从产辅酶Q10微生物的提取液中高效地除去来自微生物的杂质、简洁且稳定地操作运行辅酶Q10的制造工序的辅酶Q10制造方

法。

[0014] 解决课题的方法

[0015] 本发明人等为了解决上述的课题而进行了深入研究,结果发现,特定的吸附剂选择性地吸附产辅酶Q10微生物中除辅酶Q10以外的来自细胞的成分而基本上不吸附辅酶Q10本身,因此,可以用于高效率地纯化辅酶Q10,从而完成了本发明。即,本发明涉及使产辅酶Q10微生物的提取液与以硅酸铝作为主成分的吸附剂(A)接触的辅酶Q10的制造方法。优选为涉及上述吸附剂(A)含有50%以上的硅酸铝的上述制造方法。另外,优选为涉及将上述吸附剂(A)和与其不同的吸附剂(B)组合使用的上述制造方法。进一步优选为涉及上述吸附剂(B)为选自以下吸附剂中的1种以上的上述制造方法:活性炭、以活性炭作为主成分的吸附剂、使苯乙烯与二乙烯基苯共聚而成的合成吸附剂、苯酚-甲醛类吸附树脂、醛类吸附剂、硅酸镁、氢氧化铝、氧化铝、氧化镁、硅胶、二氧化硅氧化镁凝胶、使烷基或烯丙基化学键合于无机单体而成的吸附剂、硅藻土、活性氧化铝、芳香族类吸附剂、甲基丙烯酸酯吸附剂、合成沸石、以及珍珠岩类过滤剂。另外,更优选为涉及具有以下工序的上述制造方法,所述工序包括,将与上述吸附剂(A)接触的产辅酶Q10微生物的提取液和该吸附剂(A)分离,并进一步对分离后的提取液进行处理。进一步优选为涉及上述处理工序是选自浓缩、溶剂置换、氧化、还原、柱色谱及晶析中的1种以上的工序的上述制造方法。

[0016] 发明的效果

[0017] 根据本发明,仅通过使含有辅酶Q10的溶液与以硅酸铝作为主成分的吸附剂(A)接触,可避免辅酶Q10的吸附,另一方面,可简便地吸附除去杂质,能够在操作性及经济性方面良好地得到高品质的辅酶Q10。

[0018] 另外,通过将上述吸附剂(A)和与其不同的吸附剂(B)组合使用,可以进一步提高杂质的除去效率。

具体实施方式

[0019] 以下,对本发明的辅酶Q10的制造方法的一个方式进行说明,但本发明并不限于此。

[0020] 本发明的制造方法的特征在于使产辅酶Q10微生物的提取液与以硅酸铝作为主成分的吸附剂(A)接触。

[0021] 辅酶Q10中存在氧化型和还原型。在本发明中,作为辅酶Q10,以氧化型辅酶Q10、还原型辅酶Q10中的任一种作为对象,作为还原型辅酶Q10与氧化型辅酶Q10的混合物的辅酶Q10也是其对象。在辅酶Q10为还原型辅酶Q10与氧化型辅酶Q10的混合物的情况下,还原型辅酶Q10含有比率没有特别限定。

[0022] 需要说明的是,在本说明书中,在仅记载为辅酶Q10的情况下,在不论氧化型辅酶Q10、还原型辅酶Q10而使两者混合存在时,也表示混合物整体。

[0023] 作为本发明中使用的产辅酶Q10微生物,只要是在菌体内产生辅酶Q10的微生物即可,可以没有限制地使用细菌、酵母、霉菌中的任一种。作为上述微生物,具体可以列举例如:土壤杆菌(Agrobacterium)属、曲霉菌(Aspergillus)属、醋杆菌(Acetobacter)属、胺杆菌(Aminobacter)属、农单胞菌(Agromonas)属、嗜酸菌(Acidiphilium)属、布勒担孢酵母(Bulleromyces)属、布勒掷孢酵母(Bullera)属、短波单胞菌(Brevundimonas)属、隐球菌

(Cryptococcus) 属、雪球酵母 (Chionosphaera) 属、假丝酵母 (Candida) 属、Cerinosterus 属、外瓶霉 (Exisophiala) 属、外担菌 (Exobasidium) 属、Fellomyces 属、线黑粉菌 (Filobasidiella) 属、线黑粉酵母 (Filobasidium) 属、地丝菌 (Geotrichum) 属、果黑粉菌 (Graphiola) 属、葡糖杆菌 (Gluconobacter) 属、考克娃酵母 (Kockovaella) 属、克氏担孢酵母 (Kurtzmanomyces) 属、Lalaria 属、白冬孢酵母 (Leucosporidium) 属、军团菌 (Legionella) 属、甲基杆菌 (Methylobacterium) 属、枝面菌 (Mycoplana) 属、卵孢酵母 (Oosporidium) 属、假单胞菌 (Pseudomonas) 属、Pseudozyma 属、副球菌 (Paracoccus) 属、石座菌 (Petromyc) 属、红酵母 (Rhodotorula) 属、红冬孢酵母 (Rhodosporidium) 属、根单胞菌 (Rhizomonas) 属、红菌 (Rhodobium) 属、红游动菌 (Rhodoplanes) 属、红假单胞菌 (Rhodopseudomonas) 属、红细菌 (Rhodobacter) 属、掷孢酵母 (Sporobolomyces) 属、锁掷酵母 (Sporidiobolus) 属、Saitoella 属、裂殖酵母 (Schizosaccharomyces) 属、鞘氨醇单胞菌 (Sphingomonas) 属、侧孢霉 (Sporotrichum) 属、Sympodiomyces 属、Sterigmatosporidium 属、外囊菌 (Tapharina) 属、银耳 (Tremella) 属、毛孢子菌 (Trichosporon) 属、Tilletiaria 属、腥黑粉菌 (Tilletia) 属、褶孢黑粉菌 (Tolyposporium) 属、Tilletiopsis 属、黑粉菌 (Ustilago) 属、Udeniomyces 属、Xanthophyllomyces 属、黄色杆菌 (Xanthobacter) 属、拟青霉 (Paecilomyces) 属、支顶孢 (Acremonium) 属、Hyhomonus 属、根瘤菌 (Rhizobium) 属、红发夫酵母 (Phaffia) 属、雨生红球藻 (Haematococcus) 属等微生物。从培养容易度、生产性的观点考虑,优选为细菌或酵母,在细菌中更优选为非光合作用细菌,另外,可以列举土壤杆菌 (Agrobacterium) 属、葡糖杆菌 (Gluconobacter) 属等作为特别优选的例子,在酵母中可以列举裂殖酵母 (Schizosaccharomyces) 属、Saitoella 属、红发夫酵母 (Phaffia) 属等作为特别优选的例子。需要说明的是,作为辅酶Q10,为了制造还原型辅酶Q10,优选使用生产的辅酶Q10中还原型辅酶Q10含有比率高的微生物,例如,更优选使用培养后的还原型辅酶Q10含有比率(重量%基准)优选为70%以上、更优选为80%以上的微生物。

[0024] 作为产辅酶Q10微生物,不仅可以使使用上述微生物的野生株,也可以使用例如对与作为上述微生物的目的的辅酶Q10的生物合成相关的基因的转录及翻译活性、或表达蛋白质的酶活性进行了改变或改良而得到的突变体、重组体。

[0025] 通过培养上述微生物,可以得到含有辅酶Q10的微生物细胞。培养方法没有特别限定,可以适当选择适于对象微生物、或适于作为目标辅酶Q10的生产的培养方法。培养期间没有特别限定,只要是在微生物细胞中积累希望的量的目标辅酶Q10的期间即可。

[0026] 在本发明的制造方法中,作为从上述微生物细胞中提取辅酶Q10的方法,可以从微生物细胞中直接提取,也可以将上述微生物细胞破碎,制成微生物细胞破碎物或微生物细胞破碎物的水性悬浮液,从该破碎物或微生物细胞破碎物的水性悬浮液中提取。或者,也可以使微生物细胞干燥,从该干燥微生物细胞中提取。需要说明的是,在本发明的“破碎”中,只要细胞壁等的表面结构受损至能够提取目标辅酶Q10的程度即可。

[0027] 作为破碎方法,可以列举例如物理处理、化学处理等。

[0028] 作为上述物理处理,可以列举例如:高压均化器、旋叶式均化器、超声波均化器、弗氏压碎器、球磨机等的使用、或者它们的组合。

[0029] 作为上述化学处理,可以列举例如:适于盐酸、硫酸等酸(优选为强酸)的处理、适

于氢氧化钠、氢氧化钾等碱(优选为强碱)的处理等、它们的组合。

[0030] 在本发明中,作为辅酶Q10的提取/回收的前处理的细胞破碎方法,在上述破碎方法中,从破碎效率的观点考虑,更优选为物理处理。

[0031] 用于上述细胞破碎的微生物细胞的形态可以是培养液、将培养液浓缩后的形态、从培养液中以湿菌体的形式采集微生物细胞的形态、将它们清洗后的形态、将湿菌体悬浮于溶剂(也包含例如水、生理盐水、缓冲液等)中的形态等,优选为微生物细胞的水性悬浮液,从操作性等的方面考虑,更优选为培养液、将培养液浓缩后的形态、将它们清洗后的形态。

[0032] 微生物细胞破碎物的水性悬浮液中的菌体浓度没有特别限制,以换算为菌体的干燥重量计,通常为1~25重量%的范围,从经济性考虑,优选以10~20重量%的范围实施。

[0033] 另一方面,作为在使微生物细胞干燥而从该干燥微生物细胞中提取辅酶Q10时使微生物细胞干燥的干燥机,可以列举使用例如流化床干燥器、喷雾干燥机、箱型干燥机、圆锥型干燥机、圆筒振动式干燥机、圆筒搅拌式干燥机、倒圆锥型干燥机、过滤干燥机、冷冻干燥机等、或它们的组合。

[0034] 干燥后的微生物细胞内的水分浓度优选为0~50重量%的范围。另外,可以进一步利用上述这样的破碎方法对干燥微生物细胞进行破碎处理、或者使用将上述微生物细胞破碎物干燥而得到的干燥微生物细胞破碎物。

[0035] 在本发明的制造方法中,作为提取所用的有机溶剂,没有特别限定,可以列举:烃类、脂肪酸酯类、醚类、醇类、脂肪酸类、酮类、氮化合物类(包含腈类、酰胺类)、硫化合物类等。

[0036] 作为烃类,没有特别限制,可以列举例如:脂肪烃、芳香烃、卤代烃等。其中,优选为脂肪烃、芳香烃,更优选为脂肪烃。

[0037] 作为脂肪烃,无论是环状、非环状的,或者是饱和、不饱和的,均没有特别限制,通常优选使用饱和的脂肪烃。通常可以使用碳原子数3~20、优选为碳原子数5~12、更优选为碳原子数5~8的脂肪烃。作为具体例子,可以列举例如:丙烷、丁烷、异丁烷、戊烷、2-甲基丁烷、己烷、2-甲基戊烷、2,2-二甲基丁烷、2,3-二甲基丁烷、庚烷、庚烷异构体(例如,2-甲基己烷、3-甲基己烷、2,3-二甲基戊烷、2,4-二甲基戊烷)、辛烷、2,2,3-三甲基戊烷、异辛烷、壬烷、2,2,5-三甲基己烷、癸烷、十二烷、2-戊烯、1-己烯、1-庚烯、1-辛烯、1-壬烯、1-癸烯、环戊烷、甲基环戊烷、环己烷、甲基环己烷、乙基环己烷、对~~莰~~烷、环己烯等。优选为戊烷、2-甲基丁烷、己烷、2-甲基戊烷、2,2-二甲基丁烷、2,3-二甲基丁烷、庚烷、2-甲基己烷、3-甲基己烷、2,3-二甲基戊烷、2,4-二甲基戊烷、辛烷、2,2,3-三甲基戊烷、异辛烷、壬烷、2,2,5-三甲基己烷、癸烷、十二烷、环戊烷、甲基环戊烷、环己烷、甲基环己烷、乙基环己烷、对~~莰~~烷等。更优选为戊烷、2-甲基丁烷、己烷、2-甲基戊烷、2,2-二甲基丁烷、2,3-二甲基丁烷、庚烷、2-甲基己烷、3-甲基己烷、2,3-二甲基戊烷、2,4-二甲基戊烷、辛烷、2,2,3-三甲基戊烷、异辛烷、环戊烷、甲基环戊烷、环己烷、甲基环己烷、乙基环己烷等。进一步优选为戊烷、己烷、环己烷、甲基环己烷等。从防护氧化的效果特别高的观点考虑,特别优选为戊烷、甲基环己烷,最优选为戊烷。

[0038] 作为芳香烃,没有特别限制,通常可以使用碳原子数6~20、优选为碳原子数6~12、更优选为碳原子数7~10的芳香烃。作为具体例子,可以列举例如:苯、甲苯、二甲苯、邻

二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、乙苯、异丙基苯、均三甲苯、四氢化萘、丁基苯、对甲基异丙基苯、环己基苯、二乙基苯、戊基苯、二戊基苯、十二烷基苯、苯乙烯等。优选为甲苯、二甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、乙苯、异丙基苯、均三甲苯、四氢化萘、丁基苯、对甲基异丙基苯、环己基苯、二乙基苯、戊基苯等。更优选为甲苯、二甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、异丙基苯、四氢化萘等。最优选为异丙基苯。

[0039] 作为卤代烃,无论是环状、非环状的,或者是饱和、不饱和的,均没有特别限制,通常优选使用非环状的卤代烃。更优选为氯代烃、氟代烃,进一步优选为氯代烃。另外,可以优选使用碳原子数1~6、碳原子数优选为1~4、碳原子数更优选为1~2的卤代烃。作为具体例子,可以列举例如:二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、1,1-二氯乙烷、1,2-二氯乙烷、1,1,1-三氯乙烷、1,1,2-三氯乙烷、1,1,1,2-四氯乙烷、1,1,2,2-四氯乙烷、五氯乙烷、六氯乙烷、1,1-二氯乙烯、1,2-二氯乙烯、三氯乙烯、四氯乙烯、1,2-二氯丙烷、1,2,3-三氯丙烷、氯苯、1,1,1,2-四氟乙烷等。优选为二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、1,1-二氯乙烷、1,2-二氯乙烷、1,1,1-三氯乙烷、1,1,2-三氯乙烷、1,1-二氯乙烯、1,2-二氯乙烯、三氯乙烯、氯苯、1,1,1,2-四氟乙烷等。更优选为二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烯、三氯乙烯、氯苯、1,1,1,2-四氟乙烷等。

[0040] 作为脂肪酸酯类,没有特别限制,可以列举例如:丙酸酯、乙酸酯、甲酸酯等。优选为乙酸酯、甲酸酯,更优选为乙酸酯。作为酯基,没有特别限制,通常可以使用碳原子数1~8的烷基酯、碳原子数7~12的芳烷基酯,优选使用碳原子数1~6的烷基酯,更优选使用碳原子数1~4的烷基酯。

[0041] 作为丙酸酯的具体例子,可以列举例如:丙酸甲酯、丙酸乙酯、丙酸丁酯、丙酸异戊酯等。优选为丙酸乙酯等。

[0042] 作为乙酸酯的具体例子,可以列举例如:乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、乙酸仲丁酯、乙酸戊酯、乙酸异戊酯、乙酸仲己酯、乙酸环己酯、乙酸苄酯等。优选为乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、乙酸仲丁酯、乙酸戊酯、乙酸异戊酯、乙酸仲己酯、乙酸环己酯等。更优选为乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯等,最优选为乙酸乙酯。

[0043] 作为甲酸酯的具体例子,可以列举例如:甲酸甲酯、甲酸乙酯、甲酸丙酯、甲酸异丙酯、甲酸丁酯、甲酸异丁酯、甲酸仲丁酯、甲酸戊酯等。优选为甲酸甲酯、甲酸乙酯、甲酸丙酯、甲酸丁酯、甲酸异丁酯、甲酸戊酯等。最优选为甲酸乙酯。

[0044] 作为醚类,无论是环状、非环状的,或者是饱和、不饱和的,均没有特别限制,通常优选使用饱和的醚类。通常可以使用碳原子数3~20、优选为碳原子数4~12、更优选为碳原子数4~8的醚类。作为具体例子,可以列举例如:二乙基醚、甲基叔丁基醚、二丙基醚、二异丙基醚、二丁基醚、二己基醚、乙基乙烯基醚、丁基乙烯基醚、苯甲醚、苯乙醚、丁基苯基醚、甲氧基甲苯、二噁烷、呋喃、2-甲基呋喃、四氢呋喃、四氢吡喃、乙二醇二甲醚、乙二醇二乙醚、乙二醇二丁醚、乙二醇单甲醚、乙二醇单乙醚、乙二醇单丁醚等。优选为二乙基醚、甲基叔丁基醚、二丙基醚、二异丙基醚、二丁基醚、二己基醚、苯甲醚、苯乙醚、丁基苯基醚、甲氧基甲苯、二噁烷、2-甲基呋喃、四氢呋喃、四氢吡喃、乙二醇二甲醚、乙二醇二乙醚、乙二醇二丁醚、乙二醇单甲醚、乙二醇单乙醚等。更优选为二乙基醚、甲基叔丁基醚、苯甲醚、二噁烷、四氢呋喃、乙二醇单甲醚、乙二醇单乙醚等。进一步优选为二乙基醚、甲基叔丁基醚、苯

甲醚等,最优选为甲基叔丁基醚。

[0045] 作为醇类,无论是环状、非环状的,或者是饱和、不饱和的,均没有特别限制,通常优选使用饱和的醇类。通常碳原子数为1~20,优选碳原子数为1~12,更优选碳原子数为1~6。其中,优选为碳原子数1~5的一元醇、碳原子数2~5的二元醇、碳原子数3的三元醇。

[0046] 作为这些醇类的具体例子,可以列举例如:甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、2-甲基-1-丁醇、异戊醇、叔戊醇、3-甲基-2-丁醇、新戊醇、1-己醇、2-甲基-1-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-乙基-1-丁醇、1-庚醇、2-庚醇、3-庚醇、1-辛醇、2-辛醇、2-乙基-1-己醇、1-壬醇、1-癸醇、1-十一烷醇、1-十二烷醇、烯丙醇、炔丙醇、苄醇、环己醇、1-甲基环己醇、2-甲基环己醇、3-甲基环己醇、4-甲基环己醇等一元醇;1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、2,3-丁二醇、1,5-戊二醇等二元醇;甘油等三元醇。

[0047] 作为一元醇,优选为甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、2-甲基-1-丁醇、异戊醇、叔戊醇、3-甲基-2-丁醇、新戊醇、1-己醇、2-甲基-1-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-乙基-1-丁醇、1-庚醇、2-庚醇、3-庚醇、1-辛醇、2-辛醇、2-乙基-1-己醇、1-壬醇、1-癸醇、1-十一烷醇、1-十二烷醇、苄醇、环己醇、1-甲基环己醇、2-甲基环己醇、3-甲基环己醇、4-甲基环己醇等。更优选为甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、2-甲基-1-丁醇、异戊醇、叔戊醇、3-甲基-2-丁醇、新戊醇、1-己醇、2-甲基-1-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-乙基-1-丁醇、环己醇等。进一步优选为甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、2-甲基-1-丁醇、异戊醇、叔戊醇、3-甲基-2-丁醇、新戊醇等。特别优选为甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、2-甲基-1-丁醇、异戊醇等,最优选为2-丙醇。

[0048] 作为二元醇,优选为1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇等,最优选为1,2-乙二醇。作为三元醇,优选为甘油。

[0049] 作为脂肪酸类,可以列举例如:甲酸、乙酸、丙酸等。优选为甲酸、乙酸,最优选为乙酸。

[0050] 作为酮类,没有特别限制,可以优选使用碳原子数3~6的酮类。作为具体例子,可以列举例如:丙酮、甲基乙基酮、甲基丁基酮、甲基异丁基酮等。优选为丙酮、甲基乙基酮,最优选为丙酮。

[0051] 作为腈类,无论是环状、非环状的,或者是饱和、不饱和的,没有特别限制,通常优选使用饱和的腈类。通常可以使用碳原子数2~20、优选为碳原子数2~12、更优选为碳原子数2~8的腈类。

[0052] 作为具体例子,可以列举例如:乙腈、丙腈、丙二腈、丁腈、异丁腈、丁二腈、戊腈、戊二腈、己腈、辛腈、壬腈、十一腈、十二腈、十三腈、十五腈、硬脂腈、氯乙腈、溴乙腈、氯丙腈、溴丙腈、甲氧基乙腈、氰基乙酸甲酯、氰基乙酸乙酯、甲基苯腈、苯甲腈、氯苯甲腈、溴苯甲腈、氰基苯甲酸、硝基苯甲腈、茴香腈、萘甲腈、溴甲基苯腈、氰基苯甲酸甲酯、甲氧基苯甲腈、乙酰基苯甲腈、萘甲腈、氰基联苯、苯基丙腈、苯基丁腈、甲基苯乙腈、二苯基乙腈、萘基乙腈、硝基苯乙腈、氯苯乙腈、环丙甲腈、环己甲腈、环庚甲腈、苯基环己甲腈、甲苯基环己甲腈等。

[0053] 优选为乙腈、丙腈、丁二腈、丁腈、异丁腈、戊腈、氰基乙酸甲酯、氰基乙酸乙酯、苯

甲腈、甲基苯腈、氯丙腈,更优选为乙腈、丙腈、丁腈、异丁腈,最优选为乙腈。

[0054] 作为除腈类以外的氮化合物类,可以列举例如:甲酰胺、N-甲基甲酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮等酰胺类、硝基甲烷、三乙胺、吡啶等。

[0055] 作为硫化合物类,可以列举例如:二甲基亚砷、环丁砷等。

[0056] 在上述有机溶剂当中,优选考虑沸点、熔点、粘性等性质进行选择。例如,作为沸点,从能够为了提高溶解度而适度升温、且易于进行从湿体中干燥除去溶剂、从晶析滤液等中回收溶剂的观点考虑,优选为1个大气压下、约30~150℃的范围,作为熔点,从在室温下操作时及冷却至室温以下时也不容易固化的观点考虑,为约0℃以上,优选为约10℃以上,更优选为约20℃以上,粘性优选低至在20℃约为10cp以下。

[0057] 在本发明的制造方法中,在从微生物细胞或微生物细胞破碎物的水性悬浮液中提取辅酶Q10的情况下,在上述有机溶剂当中,优选使用疏水性有机溶剂或含有疏水性有机溶剂的溶剂作为提取溶剂。另外,通过在疏水性有机溶剂中混合少量的亲水性有机溶剂(例如,异丙醇等醇类)、表面活性剂来使用,也可以提高提取效率。

[0058] 作为在该情况下使用的疏水性有机溶剂,没有特别限制,在上述的有机溶剂中,可以使用疏水性的溶剂,优选可以使用烃类、脂肪酸酯类、醚类等疏水性有机溶剂,进一步优选使用脂肪酸酯类或烃类,更优选使用脂肪族的烃类。在脂肪烃类中,可以优选使用碳原子数5~8的烃类。作为上述碳原子数5~8的脂肪烃类的具体例子,可以列举例如:戊烷、2-甲基丁烷、己烷、2-甲基戊烷、2,2-二甲基丁烷、2,3-二甲基丁烷、庚烷、2-甲基己烷、3-甲基己烷、2,3-二甲基戊烷、2,4-二甲基戊烷、辛烷、2,2,3-三甲基戊烷、异辛烷、环戊烷、甲基环戊烷、环己烷、甲基环己烷、乙基环己烷等。特别优选为己烷、庚烷、甲基环己烷,最优选为己烷。另外,作为脂肪酸酯类,可以优选使用乙酸乙酯。

[0059] 另一方面,作为从干燥微生物细胞中提取辅酶Q10时的提取溶剂,可以优选使用上述疏水性有机溶剂或含有疏水性有机溶剂的溶剂,也可以使用亲水性的有机溶剂。作为亲水性的有机溶剂,没有特别限定,更优选为上述那样的醇类、酮类。作为醇类,没有特别限定,优选为甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、甘油等,作为酮类,优选为丙酮,其中,最优选为乙醇。

[0060] 在本发明的制造方法中,作为提取溶剂的用量,没有特别限制,作为提取时的浓度,相对于全部溶液的容量,优选以25~80容量%的范围使用,更优选以50~75容量%的范围使用。在本发明的制造方法中,提取时的温度没有特别限制,通常可以以0~60℃、优选以20~50℃的范围实施。

[0061] 作为提取方法,可以用分批提取、连续提取中的任意方法来进行,在工业上,从生产性方面考虑,优选连续提取,在连续提取中,特别优选逆流多级提取。分批提取时的搅拌时间没有特别限制,通常为5分钟以上,连续提取时的平均滞留时间没有特别限制,通常为10分钟以上。

[0062] 在本发明的制造方法中,将如上所述得到的产辅酶Q10微生物的提取液直接、或适当浓缩、稀释、或置换成其它溶剂等而制成辅酶Q10溶液,使其与作为基本上不吸附辅酶Q10而能够吸附杂质的特定吸附剂的以硅酸铝为主成分的吸附剂(A)接触,从而选择性地吸附除去杂质。

[0063] 作为在本发明的制造方法中可以使用的吸附剂(A),只要是以硅酸铝作为主成分的吸附剂即可,没有特别限定,可以是天然硅酸铝、合成硅酸铝中的任一种,也可以是仅由

硅酸铝构成的吸附剂,还可以使以硅酸铝作为主成分且含有其它成分的吸附剂。在该情况下,作为吸附剂(A),以重量基准计,优选含有50%以上的硅酸铝,更优选含有60%以上的硅酸铝,进一步优选含有65%以上的硅酸铝。另外,可以将多种上述硅酸铝混合使用。作为在本发明的制造方法中可使用的吸附剂(A),在上述硅酸铝当中,优选为非晶质的合成硅酸铝,作为其化学组成,硅酸铝中的二氧化硅比例更优选为50~70%,进一步更优选为55~65%的硅酸铝。另外,优选为硅酸铝中存在一些结晶水的硅酸铝,例如,以干燥失重计优选为5%以上且20%以下的硅酸铝,更优选为8%以上的硅酸铝。另外,优选为其结构中具有固体酸(H⁺)的硅酸铝。作为上述吸附剂(A)的具体例子,可以列举:协和化学工业株式会社制造的“KYOWAAD(注册商标)700”、东新化成株式会社制造的“Nikka Gel S”。

[0064] 上述吸附剂(A)的形状没有特别限定,可以是粉末状、粒状、片状、纤维状中的任一种。另外,吸附剂(A)的用量可以根据待吸附的杂质的量及溶液中的辅酶Q10的含量与吸附剂的吸附容量的关系、处理方法来确定,因此不能笼统地进行限制,相对于待使用的含有辅酶Q10的溶液的容量,以重量基准计通常可以以0.01~70%的范围使用,优选可以以0.1~10%的范围使用,或者,相对于处理对象的辅酶Q10重量,通常可以以1~200%的范围使用,优选可以以3~100%的范围使用,更优选可以以5~75%的范围使用。另外,在分批式的情况下,相对于处理对象的辅酶Q10重量,吸附剂(A)的用量推荐为例如10~200%的范围,优选为20~100%的范围,更优选为30~75%的范围。另一方面,在柱等连续处理的情况下,即使吸附剂(A)的用量更少,也能够获得同样的效果,相对于处理对象的辅酶Q10重量,例如可以为1~100%的范围,优选为1~75%的范围,更优选为3~50%的范围。

[0065] 在本发明中,仅使用上述吸附剂(A)也能够获得足够的效果,但优选可以通过将吸附剂(A)和与该吸附剂(A)不同的吸附剂(B)组合使用来高效率地进行辅酶Q10的纯化。作为可以在该情况下使用的除了以硅酸铝作为主成分的吸附剂以外的吸附剂(B),没有特别限定,可以适当选择通常的吸附剂。另外,无论有无吸附性能,也可以将过滤剂作为本发明的吸附剂(B)而组合使用。作为本发明的吸附剂(B),可以优选列举:活性炭或以活性炭作为主成分的吸附剂、使苯乙烯与二乙烯基苯共聚而成的合成吸附剂、苯酚-甲醛类树脂等吸附树脂、醛类吸附剂、硅酸镁、氢氧化铝、氧化铝、氧化镁、氧化铝与氧化镁的固溶体、硅藻土、活性氧化铝、硅胶、二氧化硅氧化镁凝胶、或硅胶等使烷基或烯丙基化学键合于无机单体而成的吸附剂、芳香族类吸附剂、甲基丙烯酸酯吸附剂、合成沸石、珍珠岩类过滤剂等。另外,可以将多种这些吸附剂混合使用。其中,优选为硅胶、二氧化硅氧化镁凝胶、氢氧化铝、硅酸镁、氧化铝、氧化镁、氧化铝与氧化镁的固溶体、珍珠岩类过滤剂、他们的组合,更优选为氢氧化铝、氧化铝与氧化镁的固溶体、或珍珠岩类过滤剂。

[0066] 上述吸附剂(B)的形状没有特别限定,可以是粉末状、粒状、片状、纤维状、凝胶状中的任一种。另外,吸附剂(B)的用量可以根据待吸附的杂质的量及溶液中的辅酶Q10的含量与吸附剂的吸附容量来确定,因此不能笼统地进行限制,相对于待使用的含有辅酶Q10的溶液的容量,以重量基准计,通常可以以0.01~70%的范围使用,优选可以以0.1~10%的范围使用,或者,相对于处理对象的辅酶Q10重量,通常可以以1~200%的范围使用,优选可以以2~100%的范围使用,更优选可以以3~75%的范围使用。

[0067] 例如以吸附剂(A):吸附剂(B)(重量基准)计,吸附剂(A)与吸附剂(B)的用量的比率例如为5:95~100:0,优选为10:90~90:10,更优选为30:70~70:30,进一步优选为40:60

~60:40。通过将吸附剂(A)与吸附剂(B)的用量的比率调整为上述范围,杂质的除去率高,可以得到收率及纯度优异的辅酶Q10。

[0068] 在本发明的制造方法中,作为吸附处理的方法,可以通过分批式、半分批式、连续式、流化床式、固定床式中的任意方法来进行。例如,可以通过以下方法进行吸附处理:通过将吸附剂(A)、或吸附剂(A)与吸附剂(B)的混合物添加于辅酶Q10溶液中进行搅拌而使其接触的方法;将以上述吸附剂(A)、或吸附剂(A)与吸附剂(B)的混合物作为原料的片浸渍于辅酶Q10溶液而使其接触的方法;将上述吸附剂(A)、或吸附剂(A)与吸附剂(B)的混合物填充于筒状的柱中,使含有辅酶Q10的提取溶液通过并与该柱接触的方法等。另外,在组合使用吸附剂(A)和吸附剂(B)的情况下,可以在将吸附剂(A)或吸附剂(B)的任一者添加于辅酶Q10溶液中进行吸附处理后,添加另一吸附剂(B)或吸附剂(A)进行吸附处理;也可以通过将吸附剂(A)及吸附剂(B)分为2层填充于筒状的柱中、或者分别填充至各自的柱中,使含有辅酶Q10的提取溶液通过该柱并使其接触,从而进行吸附处理。在工业上,从随后易于与吸附剂分离的观点、可以减少吸附剂相对于处理对象的辅酶Q10的用量的观点等考虑,优选如上所述在柱中填充吸附剂(A)或吸附剂(A)与吸附剂(B)的混合物、将含有辅酶Q10的提取溶液连续通过该柱并使其接触的方法。在任意方法中,吸附剂与辅酶Q10溶液的接触时间没有特别限制,通常为5分钟以上,优选为10分钟以上,更优选为15分钟以上,上限没有特别限定,例如如果为12小时,则是足够的。

[0069] 在本发明的制造方法中,作为吸附处理时的温度,没有特别限制,通常以-20℃~80℃的范围实施,优选以-10~60℃的范围实施,更优选以0~30℃的范围实施。

[0070] 在本发明的制造方法中,作为吸附处理时的辅酶Q10溶液的溶剂,只要是能够溶解辅酶Q10的有机溶剂即可,没有特别限定,在直接对产辅酶Q10微生物的提取液或其浓缩物进行吸附处理的情况下,可以从提取所使用的有机溶剂中选择。当然,可以在产辅酶Q10微生物的提取液中添加混合其它有机溶剂,也可以用其它有机溶剂进行溶剂置换,制备辅酶Q10溶液,对其进行吸附处理。或者,也可以使用利用其它方法从产辅酶Q10微生物的提取液中某种程度除去杂质的溶剂。作为吸附处理时的辅酶Q10溶液的溶剂,具体可以列举:烃类、脂肪酸酯类、醚类、醇类、脂肪酸类、酮类、氮化合物类(包含腈类、酰胺类)、含硫化合物类等。

[0071] 作为烃类,没有特别限制,可以列举例如:脂肪烃、芳香烃、卤代烃等。其中,优选为脂肪烃、芳香烃,更优选为脂肪烃。

[0072] 作为脂肪烃,无论是环状、非环状的,或者是饱和、不饱和的,均没有特别限制,通常优选使用饱和的脂肪烃。通常可以使用碳原子数3~20、优选为碳原子数5~12、更优选为碳原子数5~8的脂肪烃。作为具体例子,可以列举例如:丙烷、丁烷、异丁烷、戊烷、2-甲基丁烷、己烷、2-甲基戊烷、2,2-二甲基丁烷、2,3-二甲基丁烷、庚烷、庚烷异构体(例如,2-甲基己烷、3-甲基己烷、2,3-二甲基戊烷、2,4-二甲基戊烷)、辛烷、2,2,3-三甲基戊烷、异辛烷、壬烷、2,2,5-三甲基己烷、癸烷、十二烷、2-戊烯、1-己烯、1-庚烯、1-辛烯、1-壬烯、1-癸烯、环戊烷、甲基环戊烷、环己烷、甲基环己烷、乙基环己烷、对₁₀烷、环己烯等。优选为戊烷、2-甲基丁烷、己烷、2-甲基戊烷、2,2-二甲基丁烷、2,3-二甲基丁烷、庚烷、2-甲基己烷、3-甲基己烷、2,3-二甲基戊烷、2,4-二甲基戊烷、辛烷、2,2,3-三甲基戊烷、异辛烷、壬烷、2,2,5-三甲基己烷、癸烷、十二烷、环戊烷、甲基环戊烷、环己烷、甲基环己烷、乙基环己烷、对₁₀烷等。

更优选为戊烷、2-甲基丁烷、己烷、2-甲基戊烷、2,2-二甲基丁烷、2,3-二甲基丁烷、庚烷、2-甲基己烷、3-甲基己烷、2,3-二甲基戊烷、2,4-二甲基戊烷、辛烷、2,2,3-三甲基戊烷、异辛烷、环戊烷、甲基环戊烷、环己烷、甲基环己烷、乙基环己烷等,进一步优选为戊烷、己烷、环己烷、甲基环己烷等,特别优选为己烷、庚烷、或甲基环己烷。

[0073] 作为芳香烃,没有特别限制,通常可以使用碳原子数6~20、优选为碳原子数6~12、更优选为碳原子数7~10的芳香烃。作为具体例子,可以列举例如:苯、甲苯、二甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、乙苯、异丙基苯、均三甲苯、四氢化萘、丁基苯、对甲基异丙基苯、环己基苯、二乙基苯、戊基苯、二戊基苯、十二烷基苯、苯乙烯等。优选为甲苯、二甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、乙苯、异丙基苯、均三甲苯、四氢化萘、丁基苯、对甲基异丙基苯、环己基苯、二乙基苯、戊基苯等。更优选为甲苯、二甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、异丙基苯、四氢化萘等。最优选为异丙基苯。

[0074] 作为卤代烃,无论是环状、非环状的,或者是饱和、不饱和的,均没有特别限制,通常优选使用非环状的卤代烃。更优选为氯代烃、氟代烃,进一步优选为氯代烃。另外,可以优选使用碳原子数1~6、碳原子数优选为1~4、碳原子数更优选为1~2的卤代烃。作为具体例子,可以列举例如:二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、1,1-二氯乙烷、1,2-二氯乙烷、1,1,1-三氯乙烷、1,1,2-三氯乙烷、1,1,1,2-四氯乙烷、1,1,2,2-四氯乙烷、五氯乙烷、六氯乙烷、1,1-二氯乙烯、1,2-二氯乙烯、三氯乙烯、四氯乙烯、1,2-二氯丙烷、1,2,3-三氯丙烷、氯苯、1,1,1,2-四氟乙烷等。优选为二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、1,1-二氯乙烷、1,2-二氯乙烷、1,1,1-三氯乙烷、1,1,2-三氯乙烷、1,1-二氯乙烯、1,2-二氯乙烯、三氯乙烯、氯苯、1,1,1,2-四氟乙烷等。更优选为二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烯、三氯乙烯、氯苯、1,1,1,2-四氟乙烷等。

[0075] 作为脂肪酸酯类,没有特别限制,可以列举例如:丙酸酯、乙酸酯、甲酸酯等。优选为乙酸酯、甲酸酯,更优选为乙酸酯。作为酯基,没有特别限制,通常可以使用碳原子数1~8的烷基酯、碳原子数7~12的芳烷基酯,优选使用碳原子数1~6的烷基酯,更优选使用碳原子数1~4的烷基酯。

[0076] 作为丙酸酯的具体例子,可以列举例如:丙酸甲酯、丙酸乙酯、丙酸丁酯、丙酸异戊酯等。优选为丙酸乙酯等。

[0077] 作为乙酸酯的具体例子,可以列举例如:乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、乙酸仲丁酯、乙酸戊酯、乙酸异戊酯、乙酸仲己酯、乙酸环己酯、乙酸苄酯等。优选为乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、乙酸仲丁酯、乙酸戊酯、乙酸异戊酯、乙酸仲己酯、乙酸环己酯等。更优选为乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯等,最优选为乙酸乙酯。

[0078] 作为甲酸酯的具体例子,可以列举例如:甲酸甲酯、甲酸乙酯、甲酸丙酯、甲酸异丙酯、甲酸丁酯、甲酸异丁酯、甲酸仲丁酯、甲酸戊酯等。优选为甲酸甲酯、甲酸乙酯、甲酸丙酯、甲酸丁酯、甲酸异丁酯、甲酸戊酯等。最优选为甲酸乙酯。

[0079] 作为醚类,无论是环状、非环状的,或者是饱和、不饱和的,均没有特别限制,通常优选使用饱和的醚类。通常可以使用碳原子数3~20、优选为碳原子数4~12、更优选为碳原子数4~8的醚类。作为具体例子,可以列举例如:二乙基醚、甲基叔丁基醚、二丙基醚、二异丙基醚、二丁基醚、二己基醚、乙基乙基醚、丁基乙基醚、苯甲醚、苯乙醚、丁基苯基醚、甲氧基甲苯、二噁烷、呋喃、2-甲基呋喃、四氢呋喃、四氢吡喃、乙二醇二甲醚、乙二醇二乙

醚、乙二醇二丁醚、乙二醇单甲醚、乙二醇单乙醚、乙二醇单丁醚等。优选为二乙基醚、甲基叔丁基醚、二丙基醚、二异丙基醚、二丁基醚、二己基醚、苯甲醚、苯乙醚、丁基苯基醚、甲氧基甲苯、二噁烷、2-甲基呋喃、四氢呋喃、四氢吡喃、乙二醇二甲醚、乙二醇二乙醚、乙二醇二丁醚、乙二醇单甲醚、乙二醇单乙醚等。更优选为二乙基醚、甲基叔丁基醚、苯甲醚、二噁烷、四氢呋喃、乙二醇单甲醚、乙二醇单乙醚等。进一步优选为二乙基醚、甲基叔丁基醚、苯甲醚等，最优选为甲基叔丁基醚。

[0080] 作为醇类，无论是环状、非环状的，或者是饱和、不饱和的，均没有特别限制，通常优选使用饱和的醇类。通常碳原子数为1~20，优选碳原子数为1~12，更优选碳原子数为1~6。其中，优选为碳原子数1~5的一元醇、碳原子数2~5的二元醇、碳原子数3的三元醇。

[0081] 作为这些醇类的具体例子，可以列举例如：甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、2-甲基-1-丁醇、异戊醇、叔戊醇、3-甲基-2-丁醇、新戊醇、1-己醇、2-甲基-1-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-乙基-1-丁醇、1-庚醇、2-庚醇、3-庚醇、1-辛醇、2-辛醇、2-乙基-1-己醇、1-壬醇、1-癸醇、1-十一烷醇、1-十二烷醇、烯丙醇、炔丙醇、苄醇、环己醇、1-甲基环己醇、2-甲基环己醇、3-甲基环己醇、4-甲基环己醇等一元醇；1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、2,3-丁二醇、1,5-戊二醇等二元醇；甘油等三元醇。

[0082] 作为一元醇，优选为甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、2-甲基-1-丁醇、异戊醇、叔戊醇、3-甲基-2-丁醇、新戊醇、1-己醇、2-甲基-1-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-乙基-1-丁醇、1-庚醇、2-庚醇、3-庚醇、1-辛醇、2-辛醇、2-乙基-1-己醇、1-壬醇、1-癸醇、1-十一烷醇、1-十二烷醇、苄醇、环己醇、1-甲基环己醇、2-甲基环己醇、3-甲基环己醇、4-甲基环己醇等。更优选为甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、2-甲基-1-丁醇、异戊醇、叔戊醇、3-甲基-2-丁醇、新戊醇、1-己醇、2-甲基-1-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-乙基-1-丁醇、环己醇等。进一步优选为甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、2-甲基-1-丁醇、异戊醇、叔戊醇、3-甲基-2-丁醇、新戊醇等。特别优选为、甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇、2-甲基-1-丁醇、异戊醇等，最优选为2-丙醇。

[0083] 作为二元醇，优选为1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇等，最优选为1,2-乙二醇。作为三元醇，优选为甘油。

[0084] 作为脂肪酸类，可以列举例如：甲酸、乙酸、丙酸等。优选为甲酸、乙酸，最优选为乙酸。

[0085] 作为酮类，没有特别限制，可以优选使用碳原子数3~6的酮类。作为具体例子，可以列举例如：丙酮、甲基乙基酮、甲基丁基酮、甲基异丁基酮等。优选为丙酮、甲基乙基酮，最优选为丙酮。

[0086] 作为腈类，无论是环状、非环状的，或者是饱和、不饱和的，没有特别限制，通常优选使用饱和的腈类。通常可以使用碳原子数2~20、优选为碳原子数2~12、更优选为碳原子数2~8的腈类。

[0087] 作为具体例子，可以列举例如：乙腈、丙腈、丙二腈、丁腈、异丁腈、丁二腈、戊腈、戊二腈、己腈、辛腈、壬腈、十一腈、十二腈、十三腈、十五腈、硬脂腈、氯乙腈、溴乙腈、氯丙腈、溴丙腈、甲氧基乙腈、氰基乙酸甲酯、氰基乙酸乙酯、甲基苯腈、苯甲腈、氯苯甲腈、溴苯甲

腈、氰基苯甲酸、硝基苯甲腈、茴香腈、萘甲腈、溴甲基苯腈、氰基苯甲酸甲酯、甲氧基苯甲腈、乙酰基苯甲腈、萘甲腈、氰基联苯、苯基丙腈、苯基丁腈、甲基苯乙腈、二苯基乙腈、萘基乙腈、硝基苯乙腈、氯苯乙腈、环丙甲腈、环己甲腈、环庚甲腈、苯基环己甲腈、甲基环己甲腈等。

[0088] 优选为乙腈、丙腈、丁二腈、丁腈、异丁腈、戊腈、氰基乙酸甲酯、氰基乙酸乙酯、苯甲腈、甲基苯腈、氯丙腈,更优选为乙腈、丙腈、丁腈、异丁腈,最优选为乙腈。

[0089] 作为除腈类以外的氮化合物类,可以列举例如:甲酰胺、N-甲基甲酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮等酰胺类、硝基甲烷、三乙胺、吡啶等。

[0090] 作为硫化化合物类,可以列举例如:二甲基亚砷、环丁砷等。

[0091] 在上述有机溶剂当中,优选考虑沸点、熔点、粘性等性质进行选择。例如,作为沸点,从易于进行从湿体中干燥除去溶剂、从晶析滤液等中回收溶剂的观点考虑,优选为1个大气压下、约30~150℃的范围,作为熔点,从在室温下操作时及冷却至室温以下时也不容易固化的观点考虑,为约0℃以上,优选为约10℃以上,更优选为约20℃以上,从减少产品损失、操作方面考虑,粘性优选低至在20℃约为10cp以下。

[0092] 为了从产辅酶Q10微生物的提取液中高效地除去杂质,在上述有机溶剂中,优选使用疏水性有机溶剂或含有疏水性有机溶剂的溶剂,待使用的溶剂不含大量水分时,能够抑制辅酶Q10吸附于吸附剂,因此优选,作为待使用的溶剂中含有的水分量,以重量基准计最多为15%以下,优选为10%以下,更优选为6%以下。

[0093] 作为该情况下使用的疏水性有机溶剂,没有特别限制,在上述的有机溶剂中,可以使用疏水性的溶剂,优选可以使用烃类、脂肪酸酯类、醚类等疏水性有机溶剂,进一步优选使用脂肪酸酯类或烃类,更优选使用脂肪族的烃类。在脂肪烃类中,可以优选使用碳原子数5~8的烃类。作为上述碳原子数5~8的脂肪烃类的具体例子,可以列举例如:戊烷、2-甲基丁烷、己烷、2-甲基戊烷、2,2-二甲基丁烷、2,3-二甲基丁烷、庚烷、2-甲基己烷、3-甲基己烷、2,3-二甲基戊烷、2,4-二甲基戊烷、辛烷、2,2,3-三甲基戊烷、异辛烷、环戊烷、甲基环戊烷、环己烷、甲基环己烷、乙基环己烷等。特别优选为己烷、庚烷、甲基环己烷,最优选为己烷。另外,作为脂肪酸酯类,可以优选使用乙酸乙酯。

[0094] 在本发明的制造方法中,通过如上所述使辅酶Q10溶液与吸附剂(A)接触,使杂质选择性地吸附于吸附剂(A),然后将吸附了杂质的吸附剂(A)从辅酶Q10溶液中分离除去,从而可以得到提高了纯度的辅酶Q10。当然,在组合使用了吸附剂(A)和吸附剂(B)的情况下,根据其组合使用形式,可以将吸附剂(A)和吸附剂(B)分别单独从辅酶Q10溶液中分离除去,或者可以将吸附剂(A)与吸附剂(B)的混合物从辅酶Q10溶液中分离除去。将吸附处理后的吸附剂(A)、吸附剂(B)、或吸附剂(A)与吸附剂(B)的混合物(以下,也简称为“吸附剂”)从辅酶Q10溶液中分离的方法没有特别限定,可以列举:离心分离、自然过滤、减压过滤、加压过滤、离心过滤。另外,在将吸附剂填充于上述柱中使用的情况等下,可以将从柱中流出的辅酶Q10溶液直接用于以下的工序而不特别进行分离除去操作。

[0095] 使用后的吸附剂可以每次处理后废弃,也可以在残留吸附能力的期间再次利用。例如,在填充于柱中使用的情况下,只要能够获得作为目标的除去杂质的效果,就可以连续使用。当然,也可以废弃一部分,将使用后的吸附剂与新的吸附剂混合使用。另外,可以进行利用己烷、乙酸乙酯、异丙醇等或它们的混合溶剂实施的溶剂清洗,对吸附剂进行再生处

理,进行再利用。

[0096] 作为本发明的制造方法中通过上述吸附处理除去的杂质,可以主要举出甾醇衍生物作为来自产辅酶Q10微生物的成分。

[0097] 这里,作为甾醇衍生物,没有特别限定,可以列举:胆甾醇、菜油甾醇、链甾醇、菜子甾醇、豆甾醇、 α -谷甾醇、 β -谷甾醇、二氢- β -谷甾醇、 γ -谷甾醇、7-去氢胆甾醇、麦角甾醇、22-二氢麦角甾醇等。另外,也包含与这些甾醇衍生物的末端酯键合的甾醇酯类。其中,也可以吸附除去2种以上。在本发明中,由于大量包含于对植物体或酵母等进行了培养后的培养产物等中,难以通过晶析法等其它方法分离、除去,因此优选选择性地吸附属于脂肪酸甾醇酯的甾醇衍生物,更具体而言,优选选择性地吸附麦角甾醇。

[0098] 在本发明的制造方法中,与吸附处理前的溶液相比,吸附处理后的溶液中的辅酶Q10的收率通常为85%以上,优选为90%以上。需要说明的是,该收率可以为99%以下。

[0099] 另外,纯度提高百分点通常为2个百分点以上,优选为2.5个百分点以上,例如,可以为10个百分点以下,特别是可以为7个百分点以下。需要说明的是,上述纯度提高百分点表示:使吸附处理前的溶液和吸附处理后的溶液干燥,这两者的不挥发性成分中的Q10重量百分比之差。

[0100] 另外,通过上述吸附处理除去的麦角甾醇的除去率通常为2%以上,优选为30%以上,更优选为40%以上,优选为100%以下,通常为90%以下,也可以为60%以下。

[0101] 在本发明的制造方法中,通过以上的操作,从含有辅酶Q10的微生物细胞、微生物细胞破碎物或微生物细胞破碎物的水性悬浮液、干燥微生物细胞或干燥微生物细胞破碎物中将辅酶Q10提取至有机溶剂中,对其进行吸附处理,由此可以分离/回收经过纯化的、或提高了纯度的辅酶Q10。吸附处理后的辅酶Q10溶液可以直接利用,也可以对从吸附剂分离得到的辅酶Q10提取液进一步进行处理,制成更优选的形式或纯度的含有辅酶Q10的组合物、辅酶Q10结晶。作为这样的处理工序,可以列举:浓缩、溶剂置换、氧化、还原、柱色谱、晶析等,当然可以进行组合。例如,也可以从由吸附剂分离得到的辅酶Q10提取液中蒸馏除去溶剂(浓缩)而制成包含辅酶Q10的纯化物、或者根据需要进一步通过硅胶等的柱色谱等进行了纯化后,蒸馏除去有机溶剂,制成包含辅酶Q10的纯化物。另外,也可以进一步通过晶析操作等以结晶体的形式得到作为目标的辅酶Q10。在上述柱色谱、氧化、还原、晶析之前,可以根据需要进一步进行溶剂置换。例如,从产辅酶Q10微生物中将辅酶Q10提取至有机溶剂中而得到含有辅酶Q10的提取液,通过本发明的制造方法利用吸附处理对该提取液进行纯化,在其前后根据需要进行氧化或还原处理,进而使用晶析操作,可以以高纯度的辅酶Q10的结晶形式获得。

[0102] 需要说明的是,在本发明的制造方法中,为了制造单独的还原型辅酶Q10或还原型辅酶Q10比率高的辅酶Q10作为辅酶Q10,使用生产的辅酶Q10中的还原型辅酶Q10含有比率高的微生物作为产辅酶Q10微生物,在防止氧化的气体氛围下(例如,氮气等非活性气体氛围下)进行上述提取、吸附处理,由此可以得到单独的还原型辅酶Q10或还原型辅酶Q10比率高的辅酶Q10而不进行特别的处理。当然,通过对这样得到的还原型辅酶Q10比率高的辅酶Q10进一步进行还原,可以进一步提高还原型比率,另外,对于因未对含有辅酶Q10的提取液特别实施防止氧化的方法、或者空气中的氧、氧化剂使其氧化而还原型辅酶Q10比率较低的提取液(例如,50mol%以下、或30mol%以下)而言,也可以通过本发明的制造方法进行吸附

处理,然后实施还原反应,从而制造还原型辅酶Q10比率高的辅酶Q10。为了制造还原型辅酶Q10,优选制造的最终工序或作为最终产品的还原型辅酶Q10含有比率高者,在辅酶Q10的总量100mol%中,还原型辅酶Q10例如可以为70mol%以上,优选为80mol%以上,更优选为90mol%以上,进一步更优选为96mol%以上。

[0103] 作为更具体的一个方式,从产辅酶Q10微生物中将辅酶Q10提取至有机溶剂中而得到含有辅酶Q10的提取液,通过本发明的制造方法对该提取液进行吸附处理,使用柱色谱进一步进行纯化后,进行还原处理,使用晶析操作,也可以获得高纯度的还原型辅酶Q10的结晶。

[0104] 另一方面,本发明的制造方法也可以用于氧化型辅酶Q10的制造。在该情况下,从含有辅酶Q10的微生物细胞、微生物细胞破碎物或微生物细胞破碎物的水性悬浮液、干燥微生物细胞或干燥微生物细胞破碎物中将辅酶Q10提取至有机溶剂中,在吸附处理之前或之后进行利用氧化剂的氧化处理,通过仅在空气中等进行提取、吸附、其它纯化、后处理等、或在提取前在空气中干燥菌体,可以利用自然氧化以简便的操作得到氧化型辅酶Q10比率高的辅酶Q10。

[0105] 作为更具体的一个方式,从产辅酶Q10微生物中将辅酶Q10提取至有机溶剂中而得到含有辅酶Q10的提取液,通过本发明的制造方法对该提取液进行吸附处理,在溶剂置换后使用柱色谱进一步进行纯化,然后进行氧化处理,使用晶析操作,也可以得到高纯度的氧化型辅酶Q10的结晶。

[0106] 本申请要求基于2016年7月1日提出申请的日本专利申请第2016-131817号的优先权。将2016年7月1日提出申请的日本专利申请第2016-131817号的说明书的全部内容参考并援引至本申请。

[0107] 实施例

[0108] 以下,列举实施例、比较例对本发明进一步详细地进行说明,但本发明并不限定于这些实施例。另外,实施例、比较例中的辅酶Q10的收率及辅酶Q10的纯度未限定本发明的极限值,也没有限定其上限值。

[0109] 对于辅酶Q10的收率而言,对吸附处理前和吸附处理后的溶液中的辅酶Q10浓度进行分析而计算出来。辅酶Q10的浓度使用高效液相色谱(HPLC)(SHIMADZU制造)在下述条件下进行测定。

[0110] (HPLC测定条件)

[0111] 柱:YMC-Pack ODS-A(YMC公司制造)

[0112] 烘箱温度:30℃

[0113] 流动相:甲醇/己烷=85/15(容积比)

[0114] 送液速度:1.0ml/分

[0115] 检测:UV275nm

[0116] 对于辅酶Q10的纯度提高百分点而言,使吸附处理前的溶液和吸附处理后的溶液干燥,以各自的不挥发性成分中的Q10的重量百分比之差的形式进行计算。

[0117] 对于麦角甾醇除去率而言,对吸附处理前和吸附处理后的溶液中的麦角甾醇浓度(ERG浓度)进行分析,通过下式计算出来。对于麦角甾醇的浓度而言,使用HPLC在与上述辅酶Q10浓度的测定相同条件下进行分析。

[0118] 麦角甾醇除去率

[0119] $= \{ (\text{吸附处理前ERG浓度} - \text{吸附处理后ERG浓度}) / (\text{吸附处理前ERG浓度}) \} \times 100$

[0120] 实施例1

[0121] 使用培养基(蛋白胨5g/L、酵母提取物3g/L、麦芽提取物3g/L、葡萄糖20g/L、pH6.0)在25℃下有氧培养产生辅酶Q10的*Saitoella complicata* IF010748株160小时。将得到的包含辅酶Q10的微生物培养液通过离心分离进行浓缩,通过喷雾干燥器使微生物菌体干燥。向得到的干燥微生物添加与离心分离前的培养液的1.5倍体积相当的量的己烷,在50℃下搅拌1小时,提取辅酶Q10。将该产辅酶Q10微生物的提取液浓缩,使辅酶Q10浓度为25g/L。需要说明的是,浓缩液中的还原型辅酶Q10比率(总辅酶Q10中的还原型辅酶Q10的比例)约为5重量%。相对于辅酶Q10的重量%,以各50重量%分别将作为吸附剂(A)的合成硅酸铝KYOWAAD700(协和化学工业株式会社制造、KW700SN)和作为吸附剂(B)的由氢氧化铝构成的KYOWAAD200(协和化学工业株式会社制造、KW200)添加于该提取浓缩液中。在室温下搅拌1小时后,对溶液进行过滤。对滤液分析的结果可以确认,辅酶Q10的收率为98.41%,其纯度提高3.4个百分点,麦角甾醇除去率为49.7%。

[0122] 实施例2

[0123] 相对于辅酶Q10的重量%,以各50重量%分别将作为吸附剂(A)的KYOWAAD700(协和化学工业株式会社制造、KW700SN)和作为吸附剂(B)的珍珠岩类过滤剂Rokahelp(三井金属矿业株式会社制造)添加至与实施例1同样得到的产辅酶Q10微生物的提取浓缩液中,在与实施例1相同的操作条件下进行了吸附处理。其结果是辅酶Q10的收率为98.97%,其纯度提高2.8个百分点,麦角甾醇除去率为54.7%。

[0124] 实施例3

[0125] 相对于辅酶Q10的重量%,以各50重量%分别将作为吸附剂(A)的KYOWAAD700(协和化学工业株式会社制造、KW700SN)和作为吸附剂(B)的氧化铝与氧化镁的固溶体KYOWAAD2000(协和化学工业株式会社制造、KW2000)添加至与实施例1同样得到的产辅酶Q10微生物的提取浓缩液中,在与实施例1相同的操作条件下进行了吸附处理。其结果是辅酶Q10的收率为96.26%,其纯度提高4.4个百分点,麦角甾醇除去率为37.6%。

[0126] 实施例4

[0127] 将与实施例1同样培养得到的包含辅酶Q10的微生物培养液通过离心分离进行浓缩,分离除去上清,将得到的溶液在约100Mpa下进行压力破碎,制成微生物培养浓缩液,向其中添加提取溶剂己烷和异丙醇,对辅酶Q10进行了提取。对该产辅酶Q10微生物的提取液进行浓缩,使辅酶Q10浓度为25g/L。相对于辅酶Q10的重量%,以9重量%将作为吸附剂(A)的KYOWAAD700(协和化学工业株式会社制造、KW700SN)添加至浓缩液中。在室温下搅拌了1小时后,对溶液进行过滤。对滤液分析的结果是,辅酶Q10的收率为93.83%,其纯度提高3.3个百分点,麦角甾醇除去率为2.8%。

[0128] 实施例5

[0129] 相对于辅酶Q10的重量%,以各50重量%分别将作为吸附剂(A)的KYOWAAD700(协和化学工业株式会社制造、KW700SN)和相同的合成硅酸铝Nikka Gel S(东新化成株式会社制造)添加至与实施例1同样得到的产辅酶Q10微生物的提取浓缩液中,在与实施例1相同的操作条件下进行了吸附处理,结果是辅酶Q10的收率为95.17%,其纯度提高2.9个百分点,

麦角甾醇除去率为39.4%。

[0130] 实施例6

[0131] 使用培养基(蛋白胨5g/L、酵母提取物3g/L、麦芽提取物3g/L、葡萄糖20g/L、pH6.0)在25℃下有氧培养产生辅酶Q10的*Saitoella complicata* IF010748株160小时。将得到的包含辅酶Q10的微生物培养液通过离心分离进行浓缩,通过喷雾干燥器使微生物菌体干燥。向得到的干燥微生物添加离心分离前的培养液的1.0倍体积的乙酸乙酯,在50℃下搅拌1小时,提取了辅酶Q10。将该产辅酶Q10微生物的提取液浓缩,使辅酶Q10浓度为25g/L。需要说明的是,浓缩液中的还原型辅酶Q10比率约为5重量%。相对于辅酶Q10的重量%,以各50重量%分别将作为吸附剂(A)的KYOWAAD700(协和化学工业株式会社制造、KW700SN)和作为吸附剂(B)的Rokahelp(三井金属矿业株式会社制造)添加至浓缩液中。在室温下搅拌了1小时后,对溶液进行过滤。对滤液分析的结果可以确认,辅酶Q10的收率为94.11%,其纯度提高5.4个百分点,麦角甾醇除去率为38.2%。

[0132] (比较例1)

[0133] 相对于辅酶Q10的重量%,以各50重量%分别将KYOWAAD200(协和化学工业株式会社制造、KW200)和Rokahelp(三井金属矿业株式会社制造)添加至与实施例1同样得到的产辅酶Q10微生物的提取浓缩液中,在与实施例1相同的操作条件下进行了吸附处理,结果是辅酶Q10的收率为96.46%,其纯度仅提高1.5个百分点,麦角甾醇除去率为10.7%。

[0134] (比较例2)

[0135] 相对于辅酶Q10的重量%,以50重量%将Rokahelp(三井金属矿业株式会社制造)添加至与实施例1同样得到的产辅酶Q10微生物的提取浓缩液中。在与实施例1相同的操作条件下进行了吸附处理。其结果是辅酶Q10的收率为94.05%,其纯度提高0百分点,麦角甾醇除去率为2.0%。

[0136] (比较例3)

[0137] 相对于辅酶Q10的重量%,以各50重量%分别将KYOWAAD2000(协和化学工业株式会社制造、KW2000)和Rokahelp(三井金属矿业株式会社制造)添加至与实施例1同样得到的产辅酶Q10微生物的提取浓缩液中。在与实施例1相同的操作条件下进行了吸附处理,结果是确认了辅酶Q10的收率为82.82%,其纯度仅提高1.8个百分点,麦角甾醇除去率为4.1%。

[0138] (比较例4)

[0139] 相对于辅酶Q10的重量%,以各50重量%分别将硅酸镁KYOWAAD600(协和化学工业株式会社制造、KW600)和Rokahelp(三井金属矿业株式会社制造)添加至与实施例1同样得到的产辅酶Q10微生物的提取浓缩液中。在与实施例1相同的操作条件下进行了吸附处理,结果是确认了辅酶Q10的收率为96.29%,其纯度仅提高1.3个百分点,麦角甾醇除去率为4.2%。

[0140] (比较例5)

[0141] 相对于辅酶Q10的重量%,以各50重量%分别将活性炭和Rokahelp(三井金属矿业株式会社制造)添加至与实施例1同样得到的产辅酶Q10微生物的提取浓缩液中。在与实施例1相同的操作条件下进行了吸附处理,结果是确认了辅酶Q10的收率为89.99%,其纯度仅提高0.3个百分点,麦角甾醇除去率为29.7%。

[0142] (比较例6)

[0143] 相对于辅酶Q10的重量%，以各50重量%分别将活性氧化铝300 (Nakarai Tesque 公司制造) 和Rokahelp (三井金属矿业株式会社制造) 添加至与实施例1同样得到的产辅酶Q10微生物的提取浓缩液中。在与实施例1相同的操作条件下进行了吸附处理，结果是确认了辅酶Q10的收率为96.78%，其纯度仅提高1.6个百分点，麦角甾醇除去率为1.1%。

[0144]

[表1]

	提取来源	溶剂	吸附剂(A)	吸附剂(B)		收率 (%)	纯度提高 百分点 (%)	麦角甾醇 除去率 (%)
实施例1	未破碎/干燥菌体	己烷	KW700SN(50重量%)	KW200(50重量%)	-	98.41	3.4	49.7
实施例2	未破碎/干燥菌体	己烷	KW700SN(50重量%)	-	Rokahelp(50重量%)	98.97	2.8	54.7
实施例3	未破碎/干燥菌体	己烷	KW700SN(50重量%)	KW2000(50重量%)	-	96.26	4.4	37.6
实施例4	破碎后溶液 (iPrOH)	己烷	KW700SN(9重量%)	-	-	93.83	3.3	2.8
实施例5	未破碎/干燥菌体	己烷	KW700SN(50重量%) Nikka Gel S(50重量%)	-	-	95.17	2.9	39.4
实施例6	未破碎/干燥菌体	乙酸乙酯	KW700SN(50重量%)	-	Rokahelp(50重量%)	94.11	5.4	38.2
比较例1	未破碎/干燥菌体	己烷	-	KW200(50重量%)	Rokahelp(50重量%)	96.46	1.5	10.7
比较例2	未破碎/干燥菌体	己烷	-	-	Rokahelp(50重量%)	94.05	0.0	2.0
比较例3	未破碎/干燥菌体	己烷	-	KW2000(50重量%)	Rokahelp(50重量%)	82.82	1.8	4.1
比较例4	未破碎/干燥菌体	己烷	-	KW600(50重量%)	Rokahelp(50重量%)	96.29	1.3	4.2
比较例5	未破碎/干燥菌体	己烷	-	活性炭(50重量%)	Rokahelp(50重量%)	89.99	0.3	29.7
比较例6	未破碎/干燥菌体	己烷	-	活性氧化铝(50重量%)	Rokahelp(50重量%)	96.78	1.6	1.1