(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12月29日(29.12.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/208658 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 7/66 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/068612

(22) 国際出願日: 2016年6月23日(23.06.2016)

(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 2015-125965 2015年6月23日(23.06.2015) JP

(71) 出願人: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目３番１８号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 金谷 健登(KANAYA, Kento); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 大勝 裕子(OKATSU, Hiroko); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 植木 久一, 外(UEKI, Kyuichi et al.); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島２丁目１番１６号 フジタ東洋紡ビル９階 Osaka (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, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title**: METHOD FOR PRODUCING REDUCED COENZYME Q10

(54) 発明の名称 : 還元型補酵素Ｑ１０の製造方法

(57) **Abstract**: The present invention provides a novel production method that makes it possible to produce reduced coenzyme Q_{10} efficiently, yet safely and easily. The method for producing reduced coenzyme Q_{10} according to the present invention is characterized by including a step for generating oxidized coenzyme Q_{10} that brings the water removed into contact with an oxidizing atmosphere while removing water from an aqueous suspension including reduced coenzyme Q_{10}-containing microbial cells or a crushed product thereof and makes the ratio of oxidized coenzyme Q_{10} be 50 mass% or more relative to the total weight of oxidized and reduced coenzyme Q_{10}, and a step for regenerating reduced coenzyme Q_{10} that reduces the oxidized coenzyme Q_{10} obtained in the oxidized coenzyme Q_{10} generation step outside the microbial cells.

(57) 要約: 本発明は、還元型補酵素Ｑ $_{10}$ を効率よく、しかも安全で且つ簡便に製造することができる新規な製造方法を提供する。 本発明に係る還元型補酵素Ｑ $_{10}$ の製造方法は、還元型補酵素Ｑ $_{10}$ 含有微生物細胞またはその破砕物を含む水性懸濁液から水を除去しつつ、前記水除去物を酸化性雰囲気と接触させ、酸化型補酵素Ｑ $_{10}$ の割合を、酸化型及び還元型補酵素Ｑ $_{10}$ の合計量に対して５０質量％以上にする酸化型補酵素Ｑ $_{10}$ 生成工程、及び 前記酸化型補酵素Ｑ $_{10}$ 生成工程で得られた酸化型補酵素Ｑ $_{10}$ を微生物細胞外で還元する還元型補酵素Ｑ $_{10}$ 再生工程 を含むことを特徴とする。

WO 2016/208658 A1

明　細　書

発明の名称 ： 還元型補酵素Ｑ１０の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、還元型補酵素Ｑ$_{10}$の新規な製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年では、サプリメントや栄養補助食品として、補酵素Ｑ$_{10}$が広く一般需要者にも知られるようになった。補酵素Ｑ$_{10}$とは、キノン構造を有する脂溶性の物質であり、補酵素Ｑ$_{10}$の「１０」はイソプレン側鎖の繰り返し単位が１０個であることに由来する。この補酵素Ｑ$_{10}$には酸化型と還元型の２種類が存在するが、安価であることから酸化型が広く普及している。しかしながら、吸収率の高さでは還元型の方が優れているため、還元型の需要も高まっている。

[0003] 従来、還元型補酵素Ｑ$_{10}$を得るにあたっては、還元型補酵素Ｑ$_{10}$生産性微生物による培養法が一般的であり、例えば、特許文献１には還元型補酵素Ｑ$_{10}$を７０モル％以上の比率で含有する微生物細胞を得、生産された還元型補酵素Ｑ$_{10}$を有機溶媒で抽出する方法が開示されている。なおこの特許文献１には、前記還元型補酵素Ｑ$_{10}$を二酸化マンガン等の酸化剤で酸化し、酸化型補酵素Ｑ$_{10}$を製造する方法についても開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第０３／０５６０２４号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、還元型補酵素Ｑ$_{10}$を効率よく回収するためには、酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の副生を抑制するための特別な工夫が必要となる。加えて、特許文献１の酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法では、二酸化マンガン等の酸化剤で酸化しているところ、酸化反応による不純物が副生し、その除去が必要になっていた。また安全の面からも酸化剤の使用を避けることが望まれる。

[0006]　この様な状況下、本発明は、還元型補酵素Q_{10}を効率よく、しかも安全で且つ簡便に製造することができる新規な製造方法の提供を課題として掲げた。

課題を解決するための手段

[0007]　本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、還元型補酵素Q_{10}含有微生物細胞またはその破砕物を含む水性懸濁液から直接還元型補酵素Q_{10}を回収するのではなく、一旦、酸化型補酵素Q_{10}として回収した後にこれを還元して還元型補酵素Q_{10}を取得すれば、補酵素Q_{10}そのものの回収効率が向上すること、そして還元型補酵素Q_{10}の酸化にあたっては、前記水性懸濁液から水を除去しつつ、前記水除去物を酸化性雰囲気と接触させることで、酸化剤を用いなくても極めて安定且つ簡便に補酵素Q_{10}を酸化できること、これにより一旦酸化型補酵素Q_{10}を経ているにも拘わらず、全体として極めて優れた効率で還元型補酵素Q_{10}を製造できること、を見出し、本発明を完成した。

[0008]　すなわち、本発明に係る還元型補酵素Q_{10}の製造方法は、以下の点に要旨を有する。

［１］還元型補酵素Q_{10}含有微生物細胞またはその破砕物を含む水性懸濁液から水を除去しつつ、前記水除去物を酸化性雰囲気と接触させ、酸化型補酵素Q_{10}の割合を、酸化型及び還元型補酵素Q_{10}の合計量に対して５０質量％以上にする酸化型補酵素Q_{10}生成工程、及び

前記酸化型補酵素Q_{10}生成工程で得られた酸化型補酵素Q_{10}を微生物細胞外で還元する還元型補酵素Q_{10}再生工程

を含むことを特徴とする還元型補酵素Q_{10}の製造方法。

［２］前記水性懸濁液に含まれる還元型補酵素Q_{10}の割合が、酸化型及び還元型補酵素Q_{10}の合計量に対して５０質量％以上である［１］に記載の還元型補酵素Q_{10}の製造方法。

［３］前記水除去物の最終的な含水率が３０質量％以下である［１］または［２］に記載の還元型補酵素Q_{10}の製造方法。

［４］前記微生物細胞またはその破砕物を含む水性懸濁液のｐＨが４を超え

る［１］～［３］に記載の還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

［５］前記水性懸濁液を酸化性雰囲気下で乾燥することによって水を除去して、または、酸化性雰囲気下で乾燥して水を除去した後さらに酸化性雰囲気下で保存して、酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の割合を、酸化型及び還元型補酵素Ｑ$_{10}$の合計量に対して５０質量％以上にする［１］～［４］に記載の還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

［６］前記水除去時の温度が５０℃以上である［５］に記載の還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

［７］前記酸化型補酵素Ｑ$_{10}$生成工程において、酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の割合を、酸化型及び還元型補酵素Ｑ$_{10}$の合計量に対して８０質量％以上にする［１］～［６］に記載の還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

［８］前記酸化型補酵素Ｑ$_{10}$生成工程で得られた酸化型補酵素Ｑ$_{10}$を、微生物細胞またはその破砕物から抽出して分離し、得られた抽出分離物を前記還元型補酵素Ｑ$_{10}$再生工程で還元する［１］～［７］に記載の還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

発明の効果

[0009] 本発明では、還元型補酵素Ｑ$_{10}$含有微生物細胞またはその破砕物を含む水性懸濁液からの水の除去状態で還元型補酵素Ｑ$_{10}$を酸化性雰囲気と接触させているため、極めて効率よく且つ安全に還元型補酵素Ｑ$_{10}$を酸化することができる。そして、このように一旦酸化型にした後で還元して還元型補酵素Ｑ$_{10}$を製造しているため、酸化型と還元型の共存に起因する製造効率の低下を抑制でき、全体として還元型補酵素Ｑ$_{10}$を効率よく製造することができる。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、還元型補酵素Ｑ$_{10}$含有微生物細胞またはその破砕物を含む水性懸濁液から水を除去しつつ、前記水除去物を酸化性雰囲気と接触させ、酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の割合を、酸化型及び還元型補酵素Ｑ$_{10}$の合計量に対して５０質量％以上にする酸化型補酵素Ｑ$_{10}$生成工程、及び

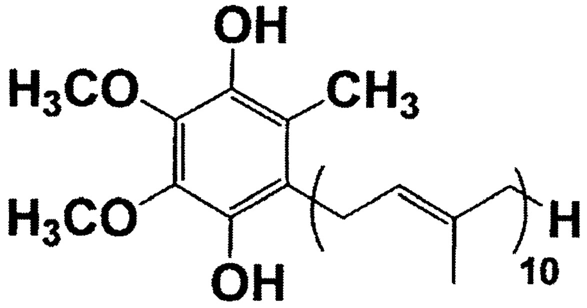
前記酸化型補酵素Ｑ$_{10}$生成工程で得られた酸化型補酵素Ｑ$_{10}$を微生物細胞外

で還元する還元型補酵素Q_{10}再生工程

を含むことを特徴とする。

[0011] なお本発明で製造される還元型補酵素Q_{10}は、下記式（Ｉ）で表される化合物である。

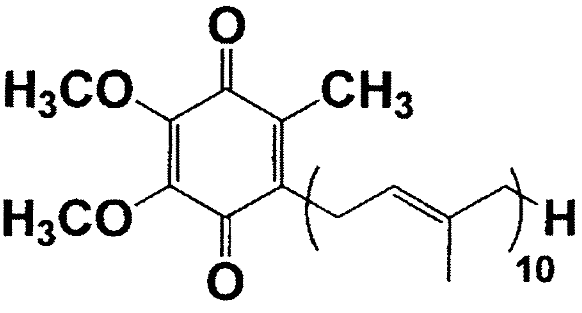
[0012] [化1]



(I)

[0013] また酸化型補酵素Q_{10}とは、下記式（ＩＩ）で表される化合物である。以下、本発明について詳述する。

[0014] [化2]



(II)

[0015] 〔還元型補酵素Q_{10}含有微生物細胞を含む水性懸濁液の調製〕

本発明では、まず還元型補酵素Q_{10}含有微生物細胞又はその破砕物を含む水性懸濁液を調製し、この水性懸濁液から酸化型補酵素Q_{10}を製造する。前記還元型補酵素Q_{10}含有微生物細胞又はその破砕物を含む水性懸濁液は、好ましくは酸化型及び還元型補酵素Q_{10}の合計量（総補酵素Q_{10}量ともいう）のうち、還元型補酵素Q_{10}を５０質量％以上となる比率で生成しうる微生物を培養することによって製造することができる。本発明においては、実際の補酵素Q_{10}生

産条件において還元型補酵素Ｑ$_{10}$を優先的に生成しうる微生物であればいずれも還元型補酵素Ｑ$_{10}$含有微生物として採用出来るが、簡便なスクリーニング法として、例えば、試験管（内径２１ｍｍ、全長２００ｍｍ）を用いて、微生物を１０ｍＬの培地［（グルコース２０ｇ、ペプトン５ｇ、酵母エキス３ｇ、マルトエキス３ｇ）／Ｌ、ｐＨ６．０］中で２５℃、７２時間振とう培養（振幅２ｃｍ、３１０往復／分）する方法によって生成物を評価したとき、還元型補酵素Ｑ$_{10}$を優先的に生成するかどうかで判断することもできる。

[0016]　本発明の製造方法においては、実際の工業生産培養条件下、あるいは上記の培養条件下、還元型補酵素Ｑ$_{10}$が総補酵素Ｑ$_{10}$量のうち５０質量％以上、好ましくは６０質量％以上の含量を示す微生物細胞を用いるとよい。尚、さらに好ましくは、実際の工業生産培養条件下、あるいは上記の培養条件下、培地当たりの還元型補酵素Ｑ$_{10}$の生産能力として、通常１μｇ／ｍＬ以上、好ましくは２μｇ／ｍＬ以上の生産能力を有する微生物を用いるのが良い。

[0017]　ここで、上記の還元型補酵素Ｑ$_{10}$含有量、及び、総補酵素Ｑ$_{10}$量中の還元型補酵素Ｑ$_{10}$比率は、微生物細胞を物理的に破砕した後、有機溶媒で抽出してＨＰＬＣ分析を行うことにより確認できる。その具体的な方法として、特に限定されないが、例えば、以下の手順により測定される。

１）培養後の微生物含有培養液を必要に応じて濃縮し、当該培養液１０容量部をネジ口試験管（内径１６．５ｍｍ、全長１３０ｍｍ）に移し、ガラスビーズ（４２５～６００ミクロン；ＳＩＧＭＡ社製）１０容量部を加える。

２）窒素雰囲気下、該培養液１０容量部に対してイソプロパノール３容量部及びｎ－ヘキサン１８．５容量部を加える。

３）窒素雰囲気下、３分間激しく振とうすることにより、微生物細胞の破砕及び抽出を行う。

４）得られた疎水性有機溶剤相（ｎ－ヘキサン相）を減圧下にエバポレート（バス温：４０℃）し、ＨＰＬＣにより分析する。

カラム：ＹＭＣ－Ｐａｃｋ４．６×２５０ｍｍ（ＹＭＣ．Ｃｏ．，Ｌｔｄ．製）

移動相：メタノール／ｎ－ヘキサン＝８５／１５

流速　：１ｍＬ／ｍｉｎ

検出　：ＵＶ２７５ｎｍ

[0018] 本発明で用いる上記還元型補酵素Ｑ$_{10}$生産性微生物としては、細菌、酵母、カビのいずれも制限無く使用することができる。上記微生物としては、具体的には、例えば、アグロバクテリウム（Agrobacterium）属、アスペルギルス（Aspergillus）属、アセトバクター（Acetobacter）属、アミノバクター（Aminobacter）属、アグロモナス（Agromonas）属、アシドフィラス（Acidiphilium）属、ブレロミセス（Bulleromyces）属、ブレラ（Bullera）属、ブレブンジモナス（Brevundimonas）属、クリプトコッカス（Cryptococcus）属、キオノスファエラ（Chionosphaera）属、カンジタ（Candida）属、セリノステルス（Cerinosterus）属、エキソフィアラ（Exisophiala）属、エキソバシジウム（Exobasidium）属、フィロミセス（Fellomyces）属、フィロバシジエラ（Filobasidiella）属、フィロバシジウム（Filobasidium）属、ゲオトリカム（Geotrichum）属、グラフィオラ（Graphiola）属、グルコノバクター（Gluconobacter）属、コッコバエラ（Kockovaella）属、クルツマノミセス（Kurtzmanomyces）属、ララリア（Lalaria）属、ロイコスポリジウム（Leucosporidium）属、レギオネラ（Legionella）属、メチロバクテリウム（Methylobacterium）属、ミコプラナ（Mycoplana）属、オースポリジウム（Oosporidium）属、シュードモナス（Pseudomonas）属、シュドジマ（Psedozyma）属、パラコッカス（Paracoccus）属、ペトロミセス（Petromyces）属、ロドトルラ（Rhodotorula）属、ロドスポリジウム（Rhodosporidium）属、リゾモナス（Rhizomonas）属、ロドビウム（Rhodobium）属、ロドプラネス（Rhodoplanes）属、ロドシュードモナス（Rhodopseudomonas）属、ロドバクター（Rhodobacter）属、スポロボロミセス（Sporobolomyces）属、スポリジオボラス（Sporidiobolus）属、サイトエラ（Saitoella）属、シゾサッカロミセス（Schizosaccharomyces）属、スフィンゴモナス（Sphingomonas）属、スポロトリクム（Sporotrichum）属、シンポジオミコプシス（Sympodiomycopsis）属、ステ

リグマトスポリジウム（Sterigmatosporidium）属、タファリナ（Tapharina）属、トレメラ（Tremella）属、トリコスポロン（Trichosporon）属、チレチアリア（Tilletiaria）属、チレチア（Tilletia）属、トリポスポリウム（Tolyposporium）属、チレチオプシス（Tilletiopsis）属、ウスチラゴ（Ustilago）属、ウデニオミセス（Udeniomyces）属、キサントフィロミセス（Xanthophllomyces）属、キサントバクター（Xanthobacter）属、ペキロマイセス（Paecilomyces）属、アクレモニウム（Acremonium）属、ハイホモナス（Hyhomonus）属、リゾビウム（Rhizobium）属等の微生物を挙げることができる。

培養の容易さや生産性の観点からは、細菌（好ましくは非光合成細菌）及び酵母が好ましく、例えば、好ましい細菌としてはアグロバクテリウム（Agrobacterium）属、グルコノバクター（Gluconobacter）属等が、好ましい酵母としてはシゾサッカロミセス（Schizosaccharomyces）属、サイトエラ（Saitoella）属等が挙げられる。

[0019] 好ましい種としては、例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefacience IFO13263）、アグロバクテリウム・ラジオバクター（Agrobacterium radiobacter ATCC4718）、アスペルギルス・クラバータス（Aspergillus clavatus JCM1718）、アセトバクター・キシリヌム（Acetobacter xylinum IFO15237）、アミノバクター・アガノウエンシス（Aminobacter aganouensis JCM7854）、アグロモナス・オリゴトロフィカ（Agromonas oligotrophica JCM1494）、アシドフィラス・ムルチボルム（Acidiphilium multivorum JCM8867）、ブレロミセス・アルバス（Bulleromyces albus IFO1192）、ブレラ・アルメニカ（Bullera armeniaca IFO10112）、ブレブンジモナス・ジミヌタ（Brevundimonas diminuta JCM2788）、クリプトコッカス・ラウレンティー（Cryptococcus laurentii IFO0609）、キオノスファエラ・アポバシジアリス（Chionosphaera apobasidialis CBS7430）、カンジタ・クルバータ（Candida curvata ATCC10567）、セリノステルス・ルテオアルバス（Cerinosterus luteoalbus JCM2923）、エキソフィアラ・アルカロフィラ（Exisophiala alcalophila JCM12519）、エキソバシジウム・グラシル（Exo

basidium gracile IFO7788)、フィロミセス・フゾエンシス（Fellomyces fuzhouensis IFO10374）、フィロバシジエラ・ネオフォルマス（Filobasidiella neoformans CBS132）、フィロバシジウム・カプスロイゲヌム（Filobasidium capsuloigenum CBS1906）、ゲオトリカム・カピタウム（Geotrichum capitatum JCM6258）、グラフィオラ・シリンドリカム（Graphiola cylindrica IFO6426）、グルコノバクター・スボキシダンス（Gluconobacter suboxydans IFO3257）、コッコバエラ・イムペラタエ（Kockovaella imperatae JCM7826）、クルツマノミセス・ネクタイレイ（Kurtzmanomyces nectairei IFO10118）、ラフリア・セラシ（Lalaria cerasi CBS275.28）、ロイコスポリジウム・スコティー（Leucosporidium scottii IFO1212）、レギオネラ・アニーサ（Legionella anisa JCM7573）、メチロバクテリウム・エキトルグエンス（Methylobacterium extorguens JCM2802）、ミコプラナ・ラモーサ（Mycoplana ramosa JCM7822）、オースポリジウム・マルガリチフェルム（Oosporidium margaritiferum CBS2531）、シュードモナス・デニトリフィカンス（Pseudomonas denitrificans IAM 12023）、シュードモナス・シルキリエンシス（Pseudomonas shuylkilliensis IAM 1092）、シュドジマ・アフィジス（Psedozyma aphidis CBS517.23）、パラコッカス・デニトリフィカンス（Paracoccus denitrificans JCM6892）、ペトロミセス・アリアセウス（Petromyces alliaceus IFO7538）、ロドトルラ・グルティニス（Rhodotorula glutinis IFO1125）、ロドトルラ・ミヌタ（Rhodotorula minuta IFO0387）、ロドスポリジウム・ジオボバツム（Rhodosporidium diobovatum ATCC1830）、リゾモナス・スベリファシエンス（Rhizomonas suberifaciens IFO15212）、ロドビウム・オリエンツ（Rhodobium orients JCM9337）、ロドプラネス・エレガンス（Rhodoplanes elegans JCM9224）、ロドシュードモナス・パルトリス（Rhodopseudomonas palustris JCM2524）、ロドバクター・カプスレータス（Rhodobacter capsulatus SB1003）、スポロボロミセス・ホルサティカス（Sporobolomyces holsaticus IFO1034）、スポロボロミセス・パラロセウス（Sporobolomyces pararoseus IFO0471）、スポリジオボラス・ジョンソニー（Sporidiobol

us johnsonii IFO1840）、サイトエラ・コンプリカタ（Saitoella complicata IFO10748）、シゾサッカロミセス・ポンペ（Schizosaccharomyces pombe IFO0347）、スフィンゴモナス・パラパウシモビリス（Sphingomonas parapaucimobilis IFO15100）、スポトリクム・セルロフィリウム（Sporotrichum cellulophilium ATCC20493）、シンポジオミコプシス・パフィオペジリ（Sympodiomycopsis paphiopedili JCM8318）、ステリグマトスポリジウム・ポリモルファ（Sterigmatosporidium polymorphum IFO10121）、スフィンゴモナス・アドヘシバ（Sphingomonas adhesiva JCM7370）、タファリナ・カエルレスセンス（Tapharina caerulescens CBS351.35）、トレメラ・メセンテリカ（Tremella mesenterica ATCC24438）、トリコスポロン・クタネウム（Trichosporon cutaneum IFO1198）、チレチアリア・アノマラ（Tilletiaria anomala CBS436.72）、チレチア・カリエス（Tilletia caries JCM1761）、トリポスポリウム・ブラタム（Tolyposporium bullatum JCM2006）、チレチオプシス・ワシントネシス（Tilletiopsis washintonesis CBS544）、ウスチラゴ・エスクレンタ（Ustilago esculenta IFO9887）、ウデニオミセス・メガロスポラス（Udeniomyces megalosporus JCM5269）、キサントフィロミセス・デンドロロウス（Xanthophyllomyces dendrorhous IFO10129）、キサントバクター・フラブス（Xanthobacter flavus JCM1204）、ペキロマイセス・リアシヌス（Paecilomyces lilacinus ATCC10114）、アクレモニウム・クリソゲナム（Acremonium chrysogenum ATCC11550）、ハイホモナス・ヒシアナ（Hyphomonas hirschiana ATCC33886）、リゾビウム・メリロッティ（Rhizobium meliloti ATCC9930）等が挙げられる。

[0020] 還元型補酵素Ｑ$_{10}$生産性微生物としては、上記微生物の野生株のみならず、例えば、上記の微生物の還元型補酵素Ｑ$_{10}$生合成に関与する遺伝子の転写及び翻訳活性、或いは発現蛋白質の酵素活性を改変或いは改良した微生物も好ましく使用することができる。

[0021] 本発明に使用しうるより好ましい微生物は、前記培養方法並びに測定方法により評価した場合に、還元型補酵素Ｑ$_{10}$が酸化型及び還元型補酵素Ｑ$_{10}$のう

ち、５０質量％以上、好ましくは６０質量％以上、より好ましくは６５質量％以上、さらに好ましくは７０質量％以上、特に好ましくは８０質量％以上の含量を示す微生物である。

[0022] 培養は、通常、微生物の増殖に適した多量栄養素や微量栄養素を含んでなる培地中で行われる。上記栄養素は、例えば、炭素源（例えば、グルコース、シュークロース、マルトース、デンプン、コーンシロップ、糖蜜等の炭水化物；メタノール、エタノール等のアルコール等）、窒素源（例えば、コーンスチープリカー、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、尿素、ペプトン等）、リン源（例えば、リン酸アンモニウム、リン酸等）、並びに、微量栄養素（例えば、マグネシウム、カリウム、亜鉛、銅、鉄、マンガン、モリブデン、硫酸、塩酸等のミネラル；ビオチン、デスチオビオチン、ビタミンＢ１等のビタミン類；アラニン、ヒスチジン等のアミノ酸；酵母エキスやマルトエキス等のビタミン類を含有する天然原料等）からなるが、これらに制限されるものではなく、一般的に使用されるものを用いることができる。なお、酵母エキス等の天然培地成分中には、リン酸塩等のリン源も含まれる。また、上記の栄養素は、適宜、組み合わせて用いられる。

[0023] 培養中のｐＨは、還元型補酵素Q_{10}の産生効率の観点から適宜設定でき、例えば、４以上、好ましくは４．５以上、より好ましくは５以上であり、また例えば、１０以下、好ましくは９以下、より好ましくは８．５以下である（以下、この範囲を第１ｐＨ条件と称す）。さらに培養液のｐＨは、低水分及び酸化性雰囲気下で処理する後述の還元型補酵素Q_{10}の酸化工程での酸化効率にも影響を与える。この酸化効率の観点からすると、培養後の水性懸濁液のｐＨは、例えば、４を超えることが好ましく、より好ましくは４．５以上であり、更に好ましくは５以上であり、特に好ましくは５．５以上であり、上限は例えば、１０以下が好ましく、より好ましくは９以下であり、８．５以下であってもよい（以下、この範囲を第２ｐＨ条件と称す）。なお本発明では、培養時のｐＨを第１ｐＨ条件内で調整し、培養後に第２ｐＨ条件を満足

する様に酸や塩基、好ましくは塩基を用いてｐＨを調整して、低水分及び酸化性雰囲気下での酸化工程を実施することも好ましい態様の一つである。

[0024] 培養の温度は、通常、１５～４５℃、好ましくは２０～３７℃である。１５℃未満では、工業生産のために許容されるには微生物の増殖速度が低くなる傾向があり、４５℃を超える高温では、微生物の生存に影響が生じる傾向にある。

[0025] 工業規模での発酵生産においては、微生物の種類にもよるが、培養中、炭素源（生成したアルコールも含む）の濃度を、補酵素Q_{10}生産能力に実質的に悪影響を及ぼさない濃度に制御するのが好ましい。よって、培養液中の炭素源の濃度が、補酵素Q_{10}生産能力に実質的に悪影響を及ぼさない濃度、つまり、通常２０ｇ／Ｌ以下、好ましくは５ｇ／Ｌ以下、より好ましくは２ｇ／Ｌ以下となるように、培養を制御するのが好ましい。

[0026] 培養は、所望の補酵素Q_{10}の生産量に達した時点で終了することができる。培養時間は特に制限されないが、通常、２０～３００時間であり、好ましくは２０～２００時間であり、より好ましくは５０～１００時間である。

[0027] 上記の培養は、通常、好気的に行われる。具体的には、培養中に酸素の制限（酸素の欠乏）が生じないように酸素の供給が行われ、通常は通気下、好ましくは通気攪拌下に培養が行われる。

[0028] 上記のような微生物、並びに培養条件を用いることにより、還元型補酵素Q_{10}を総補酵素Q_{10}量に対して、５０質量％以上、好ましくは６０質量％以上の比率で含有する微生物細胞を得ることができる。また、還元型補酵素Q_{10}の生産量は、例えば、１μｇ／ｍＬ以上、好ましくは２μｇ／ｍＬ以上、さらに好ましくは３μｇ／ｍＬ以上になる。

[0029] 還元型補酵素Q_{10}を含有する微生物細胞は、必要に応じて、粉砕してもよい。破砕の程度は適当に設定でき、例えば、微生物細胞が破れる或いは断片化されるまで破砕してもよく、そこに至らない程度の破砕でもよい。破砕しない場合でも、後述の酸化工程で補酵素Q_{10}を効率よく酸化できる為、酸化効率を落とすことなくプロセスを簡略化できるというメリットが存在するが、破

砕すると、後述する水除去後の細胞からの酸化型補酵素Ｑ$_{10}$抽出時に、回収率が向上するというメリットがあり、生産効率の点で有益である。

[0030] 上記微生物細胞の破砕は、以下の１つ又は幾つかの破砕方法を任意の順序で行うことにより行われる。破砕方法としては、例えば、物理的処理、化学的処理、酵素的処理の他、加熱処理、自己消化、浸透圧溶解、原形質溶解等を挙げることができる。

[0031] 上記物理的処理としては、例えば、高圧ホモジナイザー、超音波ホモジナイザー、フレンチプレス、ボールミル等の使用を挙げることができる。上記化学的処理としては、例えば、塩酸、硫酸等の酸（好ましくは強酸）を用いる処理、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等の塩基（好ましくは強塩基）を用いる処理を挙げることができる。上記酵素的処理としては、例えば、リゾチーム、ザイモリアーゼ、グルカナーゼ、ノボザイム、プロテアーゼ、セルラーゼ等を用いる方法を挙げることができる。上記加熱処理としては、例えば、６０～１００℃で３０分～３時間程度の処理を挙げることができる。上記自己消化としては、例えば、酢酸エチル等の溶媒による処理を挙げることができる。

[0032] 上記の細胞破砕に用いる微生物細胞の形態は、培養液、培養液を濃縮したもの、培養液から微生物細胞を湿菌体として採取したもの、これらを洗浄したもの、湿菌体を溶剤（例えば、水、生理食塩水、緩衝液等も含む）に懸濁したもの等であってよいが、好ましくは微生物細胞の水性懸濁液であり、操作性等の面から、より好ましくは、培養液、培養液を濃縮したものや、これらを洗浄したものである。

[0033] 上記の微生物細胞又は該細胞破砕物の水性懸濁液における菌体濃度は、特に制限されず、乾燥重量で通常１～２５重量％であるが、経済的には１０～２０重量％であるのが好ましい。

[0034] 〔酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の生成工程〕

以上の様にして調製した水性懸濁液は、還元型補酵素Ｑ$_{10}$を含有する微生物細胞又はその破砕物を含んでいる。そして本発明では、最終目的物が還元型

補酵素Q_{10}であるにも拘わらず、得られた還元型補酵素Q_{10}をそのまま回収するのではなく、一旦、一定量以上を酸化型補酵素Q_{10}にする。一旦、酸化型補酵素Q_{10}にしておくことで、還元型補酵素Q_{10}が多く共存することに起因する非効率性を排除でき、かえってプロセス全体の効率を高めつつ、還元型補酵素Q_{10}を製造できる。

そして本発明では、還元型補酵素Q_{10}を酸化するにあたり、前記水性懸濁液から水を除去し、酸化性雰囲気と接触させている。この方法によれば、酸化剤を特段用いなくても、還元型補酵素Q_{10}を簡便かつ安全に酸化することができる。そのため酸化剤の使用に由来する不純物の生成をも抑制でき、不純物除去処理が不要となって、さらに製造効率を高めることができる。

[0035] 酸化性雰囲気との接触のタイミングは、一部であっても水除去物が生じた段階で該水除去物と酸化性雰囲気とが接触していれば足り、例えば、水除去開始前、水除去中などの適当な段階から処理物あるいは水性懸濁液が酸化性雰囲気と接触していてもよい。また水除去後に、酸化性雰囲気との接触を継続してもよい。

[0036] 酸化性雰囲気との接触手法は特に限定されず、酸化性雰囲気に被処理物や水性懸濁液を暴露する方法でもよく、酸化性雰囲気を被処理物や水性懸濁液に向けて通気（送風など）する方法でもよい。

[0037] 水性懸濁液から水を除去した後に得られる水除去物の含水率は、最終的には、例えば、３０質量％以下が好ましく、２５質量％以下がより好ましく、２０質量％以下が更に好ましく、１５質量％以下が特に好ましい。下限は特に制限されず、例えば、１質量％以上であってもよく、５質量％以上であってもよい。含水率を小さくすることで、酸化効率を高めることができる。前記酸化性雰囲気としては、酸素やオゾンなどの酸化性の気体を含む気体であれば特に限定されないが、一般的には空気が好ましい。

[0038] 水性懸濁液からの水の除去方法としては、水を気化して除去する方法が好ましく、具体的には種々の乾燥方法が採用できる。また公知の濃縮方法や蒸留方法であっても、水を気化することで所定の範囲に低減できる限り、本発

明の水除去方法に含まれる。水除去時（乾燥などによって水を除去する際など）には、処理物を適宜加熱してもよい。水除去時の温度（乾燥温度など）は限定されず、例えば減圧乾燥などは室温やそれ以下の温度でも実施できるが、加熱する場合は、５０℃以上が好ましく、より好ましくは７０℃以上である。水性懸濁液の成分が変質しないよう、水除去時の温度（乾燥温度など）は２００℃以下が好ましく、より好ましくは１９０℃以下である。

[0039] 乾燥方法は特に限定されず、減圧乾燥、加熱乾燥、通気乾燥などの公知の乾燥方法を適宜採用でき、好ましい乾燥方法には、噴霧乾燥が含まれる。噴霧乾燥による場合は、前記水性懸濁液を、気体（特に高温の気体。好ましくは高温の空気）中に噴霧して微粒化分散させ、急速に（数秒～数十秒間で）水分を気化させる。噴霧乾燥では水性懸濁液を微粒化しているため、噴霧された微粒子が高温の熱風に晒されても、水分の蒸発により微粒子自体の温度上昇が抑えられ熱履歴を低減できる、また噴霧された微粒子は球状を維持したまま乾燥されるため、乾燥後の菌体と酸化性雰囲気との接触面積を大きくすることができる、といったメリットがある。

[0040] 噴霧乾燥としては、水性懸濁液を高圧でノズルから吹出する加圧噴霧、回転円盤による遠心力を利用した遠心噴霧等が挙げられる。噴霧乾燥の場合、加熱温度を前述した範囲内に設定するためには、乾燥機の入口温度を好ましくは１００～２００℃、より好ましくは１５０～２００℃に調整し、出口温度を好ましくは５０～１５０℃、より好ましくは７０～１２０℃に調整するとよい。また噴霧乾燥を行う際には、液体等の分散性を高めるために、適宜、水性懸濁液に分散剤を添加してもよい。

[0041] 上述した様に、本発明では、水除去後に、さらに被処理物と酸化性雰囲気との接触を継続してもよい。酸化性雰囲気との接触を継続することで、酸化反応をさらに促進させることができる。そのため、例えば、乾燥直後では酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の生成率が不足していたとしても、酸化性雰囲気との接触を継続することで、酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の割合を高めることができる。

[0042] 酸化性雰囲気との接触を継続するには、いわゆる「保存」を行うことが簡

便である。「保存」とは、還元型補酵素Ｑ$_{10}$含有微生物細胞またはその破砕物を含む水性懸濁液を乾燥させて得られる水除去物を、酸化性雰囲気下、一定期間そのままの状態で置いておく操作をいう。なお保存は、密閉容器中で行ってもよいが、酸化性雰囲気の量が不足する場合などは、開放容器中で行うことが好ましい。また保存期間は、酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の割合が、総補酵素Ｑ$_{10}$量に対して５０質量％以上となる限り特に限定されないが、例えば、１日～３０日が好ましく、５日～２０日がより好ましく、１０日～１８日が更に好ましい。

[0043] 保存中に温度は特に限定されないが、酸化反応を促進するため、－３０℃以上が好ましく、より好ましくは－１０℃以上であり、更に好ましくは５℃以上であり、８０℃以下が好ましく、より好ましくは６０℃以下であり、更に好ましくは４０℃以下である。

[0044] 酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の生成工程後の酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の割合は、総補酵素Ｑ$_{10}$量に対して５０質量％以上、好ましくは６０質量％以上、更に好ましくは７０質量％以上、特に好ましくは８０質量％以上であり、より更に好ましくは９０質量％以上であり、上限は特に限定されないが、１００質量％が好ましく、９７質量％以下であってもよい。

[0045] 〔還元型補酵素Ｑ$_{10}$再生工程〕

前記酸化工程で生成する酸化型補酵素Ｑ$_{10}$を微生物細胞外で還元することで、還元型補酵素Ｑ$_{10}$を再生する。一旦、酸化型補酵素Ｑ$_{10}$にした後で還元することで、還元型補酵素Ｑ$_{10}$を安定して効率よく製造できる。

[0046] （１）抽出工程

酸化型補酵素Ｑ$_{10}$は、酸化終了後は、微生物又はその破砕物と共に存在している。そのため本発明では、該酸化型補酵素Ｑ$_{10}$を還元するに先立って、前記酸化型補酵素Ｑ$_{10}$生成工程で得られた酸化型補酵素Ｑ$_{10}$を、微生物細胞またはその破砕物から抽出して分離し、得られた抽出分離物を前記還元型補酵素Ｑ$_{10}$再生工程で還元するのが好ましい。先に酸化型補酵素Ｑ$_{10}$を還元してから還元型補酵素Ｑ$_{10}$を抽出分離する場合には、抽出分離中に還元型補酵素Ｑ$_{10}$が酸化

されて収率が低下する心配があるのに対して、酸化型補酵素Q$_{10}$の状態で抽出分離してから還元する場合には、収率が低下する心配がなく、効率よく還元型補酵素Q$_{10}$を製造できる。

[0047] 酸化型補酵素Q$_{10}$を細胞又はその破砕物から抽出するには、炭化水素類、脂肪酸エステル類、エーテル類、アルコール類、脂肪酸類、ケトン類、窒素化合物類（ニトリル類、アミド類を含む）、硫黄化合物類等の有機溶媒が使用できる。

[0048] 炭化水素類としては、特に制限されないが、例えば、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、ハロゲン化炭化水素等を挙げることができる。

[0049] 脂肪族炭化水素としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に、飽和のものが好ましく用いられる。通常、炭素数３～２０、好ましくは炭素数５～１２、より好ましくは炭素数５～８のものが用いられる。具体例としては、例えば、プロパン、ブタン、イソブタン、ペンタン、２－メチルブタン、ヘキサン、２－メチルペンタン、２，２－ジメチルブタン、２，３－ジメチルブタン、ヘプタン、ヘプタン異性体（例えば、２－メチルヘキサン、３－メチルヘキサン、２，３－ジメチルペンタン、２，４－ジメチルペンタン）、オクタン、２，２，３－トリメチルペンタン、イソオクタン、ノナン、２，２，５－トリメチルヘキサン、デカン、ドデカン、２－ペンテン、１－ヘキセン、１－ヘプテン、１－オクテン、１－ノネン、１－デセン、シクロペンタン、メチルシクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、エチルシクロヘキサン、ｐ－メンタン、シクロヘキセン等を挙げることができる。より好ましくは、ペンタン、２－メチルブタン、ヘキサン、２－メチルペンタン、２，２－ジメチルブタン、２，３－ジメチルブタン、ヘプタン、ヘプタン異性体（例えば、２－メチルヘキサン、３－メチルヘキサン、２，３－ジメチルペンタン、２，４－ジメチルペンタン）、オクタン、２，２，３－トリメチルペンタン、イソオクタン、シクロペンタン、メチルシクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、エチルシクロヘキサン等である。

[0050] 芳香族炭化水素としては、特に制限されないが、通常、炭素数６～２０、好ましくは炭素数６～１２、より好ましくは炭素数７～１０のものが用いられる。具体例としては、例えば、ベンゼン、トルエン、キシレン、ｏ－キシレン、ｍ－キシレン、ｐ－キシレン、エチルベンゼン、クメン、メシチレン、テトラリン、ブチルベンゼン、ｐ－シメン、シクロヘキシルベンゼン、ジエチルベンゼン、ペンチルベンゼン、ジペンチルベンゼン、ドデシルベンゼン、スチレン等を挙げることができる。好ましくは、トルエン、キシレン、ｏ－キシレン、ｍ－キシレン、ｐ－キシレン、クメン、テトラリン等であり、最も好ましくは、クメンである。

[0051] ハロゲン化炭化水素としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に、非環状のものが好ましく用いられる。より好ましくは塩素化炭化水素、フッ素化炭化水素であり、さらに好ましくは塩素化炭化水素である。また、炭素数１～６、好ましくは炭素数１～４、より好ましくは炭素数１～２のものが好適に用いられる。具体例としては、例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、１，１－ジクロロエタン、１，２－ジクロロエタン、１，１，１－トリクロロエタン、１，１，２－トリクロロエタン、１，１，１，２－テトラクロロエタン、１，１，２，２－テトラクロロエタン、ペンタクロロエタン、ヘキサクロロエタン、１，１－ジクロロエチレン、１，２－ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、１，２－ジクロロプロパン、１，２，３－トリクロロプロパン、クロロベンゼン，１，１，１，２－テトラフルオロエタン等を挙げることができる。好ましくは、ジクロロメタン、クロロホルム、１，２－ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、クロロベンゼン、１，１，１，２－テトラフルオロエタン等であり、最も好ましくはクロロホルムである。

[0052] 脂肪酸エステル類としては、特に制限されないが、例えば、プロピオン酸エステル、酢酸エステル、ギ酸エステル等を挙げることができ、好ましくは酢酸エステルである。エステル基としては、特に制限されないが、通常、炭

素数１～８のアルキルエステル、炭素数７～１２のアラルキルエステルが、好ましくは炭素数１～４のアルキルエステルが用いられる。

[0053] プロピオン酸エステルの具体例としては、例えば、プロピオン酸メチル、プロピオン酸エチル、プロピオン酸ブチル、プロピオン酸イソペンチル等を挙げることができる。好ましくはプロピオン酸エチル等である。

[0054] 酢酸エステルの具体例としては、例えば、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル、酢酸ｓｅｃ－ブチル、酢酸ペンチル、酢酸イソペンチル、酢酸ｓｅｃ－ヘキシル、酢酸シクロヘキシル、酢酸ベンジル等を挙げることができる。好ましくは、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル等であり、最も好ましくは、酢酸エチルである。

[0055] ギ酸エステルの具体例としては、例えば、ギ酸メチル、ギ酸エチル、ギ酸プロピル、ギ酸イソプロピル、ギ酸ブチル、ギ酸イソブチル、ギ酸ｓｅｃ－ブチル、ギ酸ペンチル等を挙げることができる。好ましくは、ギ酸メチル、ギ酸エチル、ギ酸プロピル、ギ酸ブチル、ギ酸イソブチル、ギ酸ペンチル等である。最も好ましくは、ギ酸エチルである。

[0056] エーテル類としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に、飽和のものが好ましく用いられる。通常、炭素数３～２０、好ましくは炭素数４～１２、より好ましくは炭素数４～８のものが用いられる。具体例としては、例えば、ジエチルエーテル、メチルｔｅｒｔ－ブチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、ジヘキシルエーテル、エチルビニルエーテル、ブチルビニルエーテル、アニソール、フェネトール、ブテルフェニルエーテル、メトキシトルエン、ジオキサン、フラン、２－メチルフラン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロピラン、エチレングリコールジメチルエーテル、エチレングリコールジエチルエーテル、エチレングリコールジブチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル、エチレングリコールモノブチルエーテル等を挙げることができる。好

ましくは、ジエチルエーテル、メチルｔｅｒｔ－ブチルエーテル、アニソール、ジオキサン、テトラヒドロフラン、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル等である。さらに好ましくは、ジエチルエーテル、メチルｔｅｒｔ－ブチルエーテル、アニソール等である。

[0057] アルコール類としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に、飽和のものが好ましく用いられる。通常、炭素数１～２０、好ましくは炭素数１～１２、より好ましくは炭素数１～６である。なかでも、炭素数１～５の１価アルコール、炭素数２～５の２価アルコール、炭素数３の３価アルコールが好ましい。これらアルコール類の具体例としては、例えば、メタノール、エタノール、１－プロパノール、２－プロパノール、１－ブタノール、２－ブタノール、イソブチルアルコール、ｔｅｒｔ－ブチルアルコール、１－ペンタノール、２－ペンタノール、３－ペンタノール、２－メチル－１－ブタノール、イソペンチルアルコール、ｔｅｒｔ－ペンチルアルコール、３－メチル－２－ブタノール、ネオペンチルアルコール、１－ヘキサノール、２－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－２－ペンタノール、２－エチル－１－ブタノール、１－ヘプタノール、２－ヘプタノール、３－ヘプタノール、１－オクタノール、２－オクタノール、２－エチル－１－ヘキサノール、１－ノナノール、１－デカノール、１－ウンデカノール、１－ドデカノール、アリルアルコール、プロパルギルアルコール、ベンジルアルコール、シクロヘキサノール、１－メチルシクロヘキサノール、２－メチルシクロヘキサノール、３－メチルシクロヘキサノール、４－メチルシクロヘキサノール等の１価アルコール；１，２－エタンジオール、１，２－プロパンジオール、１，３－プロパンジオール、１，２－ブタンジオール、１，３－ブタンジオール、１，４－ブタンジオール、２，３－ブタンジオール、１，５－ペンタンジオール等の２価アルコール；グリセリン等の３価アルコールを挙げることができる。

１価アルコールとしては、好ましくは、メタノール、エタノール、１－プ

ロパノール、２－プロパノール、１－ブタノール、２－ブタノール、イソブチルアルコール、ｔｅｒｔ－ブチルアルコール、１－ペンタノール、２－ペンタノール、３－ペンタノール、２－メチル－１－ブタノール、イソペンチルアルコール、ｔｅｒｔ－ペンチルアルコール、３－メチル－２－ブタノール、ネオペンチルアルコール等である。最も好ましくは、メタノール、エタノールである。

２価アルコールとしては、１，２－エタンジオール、１，２－プロパンジオール、１，３－プロパンジオール等が好ましく、１，２－エタンジオールが最も好ましい。３価アルコールとしては、グリセリンが好ましい。

[0058] 脂肪酸類としては、例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸等を挙げることができる。好ましくは、ギ酸、酢酸であり、最も好ましくは酢酸である。

[0059] ケトン類としては、特に制限されず、炭素数３～６のものが好適に用いられる。具体例としては、例えば、アセトン、メチルエチルケトン、メチルブチルケトン、メチルイソブチルケトン等を挙げることができる。好ましくは、アセトン、メチルエチルケトンである。

[0060] ニトリル類としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に飽和のものが好ましく用いられる。通常、炭素数２～２０、好ましくは炭素数２～１２、より好ましくは炭素数２～８のものが用いられる。

具体例としては、例えば、アセトニトリル、プロピオニトリル、マロノニトリル、ブチロニトリル、イソブチロニトリル、スクシノニトリル、バレロニトリル、グルタロニトリル、ヘキサンニトリル、ヘプチルシアニド、オクチルシアニド、ウンデカンニトリル、ドデカンニトリル、トリデカンニトリル、ペンタデカンニトリル、ステアロニトリル、クロロナセトニトリル、ブロモアセトニトリル、クロロプロピオニトリル、ブロモプロピオニトリル、メトキシアセトニトリル、シアノ酢酸メチル、シアノ酢酸エチル、トルニトリル、ベンゾニトリル、クロロベンゾニトリル、ブロモベンゾニトリル、シアノ安息香酸、ニトロベンゾニトリル、アニソニトリル、フタロニトリル、

ブロモトルニトリル、メチルシアノベンゾエート、メトキシベンゾニトリル、アセチルベンゾニトリル、ナフトニトリル、ビフェニルカルボニトリル、フェニルプロピオニトリル、フェニルブチロニトリル、メチルフェニルアセトニトリル、ジフェニルアセトニトリル、ナフチルアセトニトリル、ニトロフェニルアセトニトリル、クロロベンジルシアニド、シクロプロパンカルボニトリル、シクロヘキサンカルボニトリル、シクロヘプタンカルボニトリル、フェニルシクロヘキサンカルボニトリル、トリルシクロヘキサンカルボニトリル等を挙げることができる。好ましくはアセトニトリル、プロピオニトリル、ブチロニトリル、イソブチロニトリルである。

[0061] ニトリル類を除く窒素化合物類としては、例えば、ホルムアミド、Ｎ－メチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ－メチルピロリドン等のアミド類やニトロメタン、トリエチルアミン、ピリジン等を挙げることができる。

[0062] 硫黄化合物類としては、例えば、ジメチルスルホキシド、スルホラン等を挙げることができる。

[0063] 上記有機溶剤の中でも、沸点、粘性等の性質（例えば、溶解度を高めるための適度な加温ができ、且つ、湿体からの溶剤の乾燥除去や晶析濾液等からの溶剤回収の行いやすい沸点（１気圧下、約３０～１５０℃）、室温での取り扱い時及び室温以下に冷却した時も固化しにくい融点（約０℃以上、好ましくは約１０℃以上、より好ましくは約２０℃以上）を持ち、粘性が低い（２０℃において約１０ｃｐ以下等））を考慮して選定するのが好ましい。

[0064] 上記有機溶剤のうち、好ましい有機溶剤としては、脂肪族炭化水素、ハロゲン化炭化水素、アルコール類、ケトン類、ニトリル類が挙げられ、中でも、ヘキサン、メタノール、エタノール、１－プロパノール、２－プロパノール、アセトン、アセトニトリル等が好ましい。なお前述した各溶媒は、単独で用いても混合して用いてもよい。

[0065] 抽出時の温度は、特に制限されないが、通常０～６０℃、好ましくは２０～５０℃の範囲である。

[0066] 抽出方法としては、回分抽出、連続抽出（好ましくは、向流多段抽出）のどちらの方法でも行うことが可能である。回分抽出における撹拌時間は、特に制限されないが、通常５分以上であり、連続抽出における平均滞留時間は、特に制限されないが、通常１０分以上である。

[0067] 抽出後、抽出液を微生物やその破砕物から分離する方法も特に限定されず、濾過、遠心分離等の公知の固液分離方法が採用できる。

[0068] （２）精製工程

抽出などによって細胞から分離された酸化型補酵素Q_{10}は、そのまま還元してもよく、精製してから還元してもよい。精製してから還元することで、還元後の精製負荷を低減することができ、また還元後の精製中に酸化型補酵素Q_{10}が生じて還元体の収率が低下することも防止できるので好ましい。先に酸化型補酵素Q_{10}を精製してから還元すると、精製段階で補酵素Q_{10}における酸化型比率が高い為、還元型と酸化型の両方が混在する場合に比べて簡便且つ効率よく、酸化型補酵素Q_{10}を精製できる。

[0069] 精製方法としては特に限定されず、カラムクロマトグラフィー、晶析等の公知の精製方法が採用でき、また両者を組み合わせることもできる。好ましくはカラムクロマトグラフィーか、カラムクロマトグラフィーと他の精製法との組み合わせである。また精製に先だって、抽出液を濃縮してもよい。

[0070] （３）還元工程

酸化型補酵素Q_{10}生成工程で得られた酸化型補酵素Q_{10}は、以上の様な前処理を必要に応じて実施した後、還元工程で処理することで還元型補酵素Q_{10}とすることができる。この還元工程では、還元剤を用いて酸化型補酵素Q_{10}を還元する。還元剤としては、Ｌ－アスコルビン酸、Ｄ－arabo-アスコルビン酸、Ｌ－アスコルビルパルミテート、Ｌ－アスコルビルステアレート等のアスコルビン酸類、水素化ホウ素ナトリウム、ハイドロサルファイトナトリウム（次亜硫酸ナトリウム）、レチナール、β－カロチン、トコトリエノール、ＮＡＤＨ、シアノコバラミン、没食子酸オクチル、没食子酸ドデシル、セサモール、チアミン塩酸塩等が挙げられ、好ましくはハイドロサルファイトナ

トリウム（次亜硫酸ナトリウム）、水素化ホウ素ナトリウム、アスコルビン酸類等である。なお前記還元剤を含む天然物、天然抽出物、天然色素などを還元剤として用いてもよく、こうした天然物にはローヤルゼリー、香酢等が含まれる。天然抽出物には、アセロラ抽出物、松皮抽出物、黄杞葉抽出物、ドクダミ抽出物、酵素処理ルチンが含まれる。天然色素には、カカオ色素、クチナシ色素、ブドウ果皮色素、紅麹色素等が含まれる。

[0071] 還元剤は、酸化型補酵素Q_{10}に対し、１～５０ｍｏｌ％、より好ましくは１０～３０ｍｏｌ％、更に好ましくは１５～２５ｍｏｌ％の比率で添加することが好ましい。

[0072] 還元反応における温度は、反応を促進する観点から４０～１２０℃が好ましく、より好ましくは５０～１１０℃であり、更に好ましくは６０～１００℃である。また反応時間は特に限定されないが、１～５０時間が好ましく、より好ましくは１０～４０時間であり、更に好ましくは１５～２５時間である。

[0073] 還元工程では、前記還元剤と酸化型補酵素Q_{10}とを反応溶媒中で攪拌することが多い。反応溶媒としては、酸化・還元反応に悪影響を及ぼさない限り特に限定されず、上述した抽出用有機溶媒と同様の範囲から選択してもよく、水を用いてもよく、有機溶媒と水との混合溶媒であってもよい。また反応溶媒を使用せず、酸化型補酵素Q_{10}を含む補酵素Q_{10}を加温条件下油状物として直接還元剤と反応させてもよい。前記有機溶媒としては限定されず、例えば、アルコール類、ケトン類、ニトリル類、エーテル類などを挙げることができ、好ましくは、エタノールなどのアルコール類である。還元反応における溶媒としてアルコールなどを用いた場合、得られた還元型補酵素Q_{10}を引き続き晶析等により精製し、結晶として回収できる。

[0074] 還元工程で得られた還元型補酵素Q_{10}は、さらに、濃縮、晶析、カラムクロマトグラフィー等の適当な方法で精製してもよい。好ましい精製方法は、濃縮、晶析等である。これらの方法によれば、還元型補酵素Q_{10}を酸化させることなく、高純度の還元型補酵素Q_{10}を固体（特に結晶）として回収できる。

[0075] 本発明によれば、固体（好ましくは結晶）中の還元型補酵素Q_{10}の含有率は極めて高く、例えば、９８質量％以上、より好ましくは９９質量％以上を達成できる。

[0076] 本願は、２０１５年６月２３日に出願された日本国特許出願第２０１５－１２５９６５号に基づく優先権の利益を主張するものである。２０１５年６月２３日に出願された日本国特許出願第２０１５－１２５９６５号の明細書の全内容が、本願に参考のため援用される。

実施例

[0077] 以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はもとより下記実施例によって制限を受けるものではなく、前・後記の趣旨に適合し得る範囲で適当に変更を加えて実施することも勿論可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に包含される。

[0078] 〔ＨＰＬＣ分析条件〕

カラム：ＹＭＣ－Ｐａｃｋ４．６×２５０ｍｍ（ＹＭＣ．Ｃｏ．，Ｌｔｄ．製）

移動相：メタノール／ｎ－ヘキサン＝８５／１５

流速：１ｍＬ／分

検出：ＵＶ２７５ｎｍ

[0079] 参考例１

補酵素Q_{10}を生産するサイトエラ・コンプリカタ（Saitoella complicata）ＩＦＯ１０７４８株を、１０Ｌの培地（ペプトン５ｇ／Ｌ、酵母エキス３ｇ／Ｌ、マルトエキス３ｇ／Ｌ、グルコース２０ｇ／Ｌ、ｐＨ６．０）を用いて、好気的に２５℃で７２時間培養した。得られた微生物細胞培養液のｐＨは６であった。

[0080] 実施例１

参考例１で得られた微生物細胞培養液を、空気雰囲気下、スプレードライヤーにより乾燥させて（入口温度：１８０℃、出口温度：８０℃）、乾燥菌体を得、次いで蓋をしていない開放系のガラス製ボトル中で、１２日間、室

温で保存した。乾燥直後の菌体の含水率は１３ｗｔ％であった。また乾燥直後の菌体、及び保存後の乾燥菌体をそれぞれ１０ｇずつ、エタノール（１００ｍＬ）を用いて、６０℃で６０分間の回分抽出操作を行った。その後、ろ過により固液分離を行い、分離した液相を抽出液として採取し、ＨＰＬＣによる分析を行ったところ、補酵素Q_{10}のうち、酸化型補酵素Q_{10}の割合はそれぞれ４８％、９７％であった。

[0081] 実施例２

参考例１で得られた微生物細胞培養液を、空気雰囲気下、スプレードライヤーにより乾燥させて（入口温度：１８０℃、出口温度：８０℃）、乾燥菌体を得、次いで蓋をしていない開放系のガラス製ボトル中で、１２日間室温で保存した。乾燥菌体の含水率は１３ｗｔ％であった。また乾燥直後の菌体、及び保存後の乾燥菌体をそれぞれ０．１ｇずつ、メタノール３：クロロホルム１となるように調製した混合溶媒（５０ｍＬ）を用いて、室温で３０分間の回分抽出操作を行った。その後、ろ過により固液分離を行い、分離した液相を抽出液として採取し、ＨＰＬＣによる分析を行ったところ、補酵素Q_{10}のうち、酸化型補酵素Q_{10}の割合はそれぞれ４８％、９１％であった。

[0082] 実施例３

参考例１で得られた培養後の微生物細胞培養液に、４０％（ｗ／ｗ）の水酸化ナトリウム水溶液を添加してｐＨを８に調整した。この微生物培養液を、空気雰囲気下、スプレードライヤーにより乾燥させて（入口温度：１８０℃、出口温度：８０℃）、乾燥菌体を得、次いで蓋をしていない開放系のガラス製ボトル中で、１２日間室温で保存した。乾燥菌体の含水率は１３ｗｔ％であった。また乾燥直後の菌体、及び保存後の乾燥菌体をそれぞれ０．１ｇずつ、メタノール３：クロロホルム１となるように調製した混合溶媒（５０ｍＬ）を用いて、室温で３０分間の回分抽出操作を行った。その後、ろ過により固液分離を行い、分離した液相を抽出液として採取し、ＨＰＬＣによる分析を行ったところ、補酵素Q_{10}のうち、酸化型補酵素Q_{10}の割合はそれぞれ６２％、９１％であった。

[0083] 実施例４

参考例１で得られた微生物細胞培養液を、空気雰囲気下、スプレードライヤーにより乾燥させて（入口温度：１８０℃、出口温度：８０℃）、乾燥菌体を得、次いで蓋をしていない開放系のガラス製ボトル中で、１４日間室温で保存した。乾燥菌体の含水率は１３ｗｔ％であった。また乾燥直後の菌体、及び保存後の乾燥菌体をそれぞれ１５ｇずつ、ヘキサン（３００ｍＬ）を用いて、５０℃で６０分間の回分抽出操作を行った。その後、ろ過により固液分離を行い、分離した液相を抽出液として採取し、ＨＰＬＣによる分析を行ったところ、補酵素Q_{10}のうち、酸化型補酵素Q_{10}の割合はそれぞれ４８％、８９％であった。

[0084] 比較例１

参考例１で得られた微生物細胞培養液を１ｍＬ、メタノール３：クロロホルム１となるように調製した混合溶媒（５０ｍＬ）を用いて、室温で３０分間の回分抽出操作を行った。その後、ろ過により固液分離を行い、分離した液相を抽出液として採取し、ＨＰＬＣによる分析を行ったところ、補酵素Q_{10}のうち、酸化型補酵素Q_{10}の割合は１０％であった。

[0085] 比較例２

参考例１の培養により得られた微生物菌体を、圧力式ホモジナイザー（ラニー社製）により破砕圧力８０ＭＰａで２回破砕し、補酵素Q_{10}を含有する微生物細胞破砕液を調製した。得られた微生物細胞破砕液１ｍＬを、メタノール３：クロロホルム１となるように調製した混合溶媒（５０ｍＬ）を用いて、室温で３０分間の回分抽出操作を行った。その後、ろ過により固液分離を行い、分離した液相を抽出液として採取し、ＨＰＬＣによる分析を行ったところ、補酵素Q_{10}のうち、酸化型補酵素Q_{10}の割合は３０％であった。

[0086] 比較例３

参考例１で得られた培養後の微生物細胞培養液に、濃硫酸を添加してｐＨを４に調整した。この微生物培養液を、空気雰囲気下、スプレードライヤーにより乾燥させて（入口温度：１８０℃、出口温度：８０℃）、乾燥菌体を

得、次いで蓋をしていない開放系のガラス製ボトル中で、１２日間室温で保存した。乾燥菌体の含水率は１３ｗｔ％であった。また乾燥直後の菌体、及び保存後の乾燥菌体をそれぞれ０．１ｇずつ、メタノール３：クロロホルム１となるように調製した混合溶媒（５０ｍＬ）を用いて、室温で３０分間の回分抽出操作を行った。その後、ろ過により固液分離を行い、分離した液相を抽出液として採取し、ＨＰＬＣによる分析を行ったところ、補酵素Q_{10}のうち、酸化型補酵素Q_{10}の割合はそれぞれ４２％、４９％であった。

[0087] 比較例４

比較例２と同様に調製した微生物細胞破砕液３０容量部に、ヘキサン７０容量部を混合し、４５℃で６０分間の回分抽出操作を行った。その後、静置させたところ、速やかな油水分離を確認され、全液量に対する抽出残渣の容量比は０．３５であった。分離したヘキサン相を抽出液として採取し、ＨＰＬＣによる分析を行ったところ、補酵素Q_{10}の抽出率は６０．２％であった。調製した抽出液を、エバポレータを使って６倍に濃縮して得た抽出濃縮液をろ過後、シリカゲル順相カラムに通液したが、補酵素Q_{10}は満足に分画されなかった。

[0088]

[表1]

	菌体培養液pH	乾燥温度(℃)	保存日数(日)	保存条件	抽出溶媒	温度(℃)／時間(min)	乾燥直後(%)	保存後(%)
実施例1	6	80(out)-180(in)	12	開放	エタノール	60／60	48	97
実施例2	6	80(out)-180(in)	12	開放	メタノール3/クロロホルム1	室温／30	48	91
実施例3	8	80(out)-180(in)	12	開放	メタノール3/クロロホルム1	室温／30	62	91
実施例4	6	80(out)-180(in)	14	開放	ヘキサン	50／60	48	89
比較例1	6	−			メタノール3/クロロホルム1	室温／30	10*	−
比較例2	6	破砕			メタノール3/クロロホルム1	室温／30	30*	−
比較例3	4	80(out)-180(in)	12	開放	メタノール3/クロロホルム1	室温／30	42	49
比較例4	6	破砕			ヘキサン	45／60	分画不十分*	−

*: 乾燥工程は実施していないが、比較のために同欄に記載

[0089] 実施例５

実施例１で得られた抽出液を、エバポレータを使って６倍に濃縮した。得られた抽出濃縮液をろ過した後、シリカゲル順相カラムを用いて酸化型補酵素Q_{10}画分を分取した。補酵素Q_{10}分取液をエタノールに溶解し、アスコルビン酸を補酵素Q_{10}に対して２０ｍｏｌ％添加し、７８℃で２０時間の還元反応を行った。これにより取得された還元型補酵素Q_{10}の結晶における還元型補酵素Q_{10}の含有率は９９．６％であった。

請求の範囲

[請求項1] 還元型補酵素Ｑ$_{10}$含有微生物細胞またはその破砕物を含む水性懸濁液から水を除去しつつ、前記水除去物を酸化性雰囲気と接触させ、酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の割合を、酸化型及び還元型補酵素Ｑ$_{10}$の合計量に対して５０質量％以上にする酸化型補酵素Ｑ$_{10}$生成工程、及び

前記酸化型補酵素Ｑ$_{10}$生成工程で得られた酸化型補酵素Ｑ$_{10}$を微生物細胞外で還元する還元型補酵素Ｑ$_{10}$再生工程

を含むことを特徴とする還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

[請求項2] 前記水性懸濁液に含まれる還元型補酵素Ｑ$_{10}$の割合が、酸化型及び還元型補酵素Ｑ$_{10}$の合計量に対して５０質量％以上である請求項１に記載の還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

[請求項3] 前記水除去物の最終的な含水率が３０質量％以下である請求項１または２に記載の還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

[請求項4] 前記微生物細胞またはその破砕物を含む水性懸濁液のｐＨが４を超える請求項１～３のいずれか１項に記載の還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

[請求項5] 前記水性懸濁液を酸化性雰囲気下で乾燥することによって水を除去して、または、酸化性雰囲気下で乾燥して水を除去した後さらに酸化性雰囲気下で保存して、酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の割合を、酸化型及び還元型補酵素Ｑ$_{10}$の合計量に対して５０質量％以上にする請求項１～４のいずれか１項に記載の還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

[請求項6] 前記水除去時の温度が５０℃以上である請求項５に記載の還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

[請求項7] 前記酸化型補酵素Ｑ$_{10}$生成工程において、酸化型補酵素Ｑ$_{10}$の割合を、酸化型及び還元型補酵素Ｑ$_{10}$の合計量に対して８０質量％以上にする請求項１～６のいずれか１項に記載の還元型補酵素Ｑ$_{10}$の製造方法。

[請求項8] 前記酸化型補酵素Ｑ$_{10}$生成工程で得られた酸化型補酵素Ｑ$_{10}$を、微

生物細胞またはその破砕物から抽出して分離し、得られた抽出分離物を前記還元型補酵素Q_{10}再生工程で還元する請求項１～７のいずれか１項に記載の還元型補酵素Q_{10}の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/068612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P7/66(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P7/66

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/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2003/056024 A1 (Kaneka Corp.), 10 July 2003 (10.07.2003), claims; pages 16 to 26 & US 2005/0069996 A1 claims; paragraphs [0094] to [0135] & EP 1466983 A1	1-8
Y	WO 2011/132718 A1 (Kaneka Corp.), 27 October 2011 (27.10.2011), claims & US 2013/142767 A1 claims	1-8

☒ 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 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	Date of mailing of the international search report
02 September 2016 (02.09.16)	20 September 2016 (20.09.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/113900 A1 (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 07 October 2010 (07.10.2010), paragraph [0013] & US 2012/059194 A1 paragraph [0020] & EP 2415467 A1	1-8
Y	US 6740338 B1 (CHOPRA, Raj K.), 25 May 2004 (25.05.2004), claims & WO 2001/052822 A1 & EP 1251834 A1	1-8
Y	JP 54-46889 A (Laboratoire Roger Bellon S.A.), 13 April 1979 (13.04.1979), claims; examples & GB 1591047 A examples & DE 2834952 A1 & FR 2400555 A1	6-8

国際調査報告　｜　国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６８６１２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　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.　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

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/WPIDS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2003/056024 A1（株式会社カネカ）2003.07.10, 特許請求の範囲、p.16-26 & US 2005/0069996 A1, Claims, [0094]-[0135], & EP 1466983 A1	1-8
Y	WO 2011/132718 A1（株式会社カネカ）2011.10.27, 特許請求の範囲 & US 2013/142767 A1, Claims	1-8
Y	WO 2010/113900 A1（三菱瓦斯化学株式会社）2010.10.07, [0013] & US 2012/059194 A1, [0020] & EP 2415467 A1	1-8

☑　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	国際調査報告の発送日
０２．０９．２０１６	２０．０９．２０１６

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）　４Ｂ　３６３４
平林　由利子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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 6740338 B1（CHOPRA, Raj K.）2004.05.25, Claims & WO 2001/052822 A1 & EP 1251834 A1	1-8
Y	JP 54-46889 A（ラボラトワール・ロージユ・ブロン・ソシエテ・アノニム）1979.04.13, 特許請求の範囲、実施例 & GB 1591047 A, Examples & DE 2834952 A1 & FR 2400555 A1	6-8