

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 369**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/66** (2006.01)  
**B01D 11/04** (2006.01)  
**A23L 3/3463** (2006.01)  
**C09B 61/00** (2006.01)  
**C11B 1/10** (2006.01)  
**C11C 3/00** (2006.01)  
**B01D 11/02** (2006.01)  
**A23L 29/10** (2006.01)  
**A23L 33/105** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2011 PCT/JP2011/066764**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12011589**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2011 E 11809759 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2597156**

54 Título: **Método para la fabricación de una sustancia bioactiva liposoluble**

30 Prioridad:

**22.07.2010 JP 2010164531**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.07.2018**

73 Titular/es:

**KANEKA CORPORATION (100.0%)  
3-18, Nakanoshima 2-chome, Kita-ku  
Osaka-shi, Osaka 530-8288, JP**

72 Inventor/es:

**KANAYA, KENTO;  
SUZUKI, YASUYUKI;  
KANDA, AKIHISA y  
YOKOE, KAZUYA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 676 369 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para la fabricación de una sustancia bioactiva liposoluble

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un método de producción de una sustancia bioactiva lipófila, que comprende extraer la sustancia bioactiva lipófila a partir de una suspensión acuosa de células microbianas que contienen la sustancia bioactiva lipófila o un homogenato de células microbianas de la misma.

**Antecedentes de la técnica**

10 Hay muchas sustancias bioactivas lipófilas conocidas útiles para los organismos vivos. Entre ellas, la coenzima Q es un componente esencial ampliamente distribuido en organismos vivos desde bacterias hasta mamíferos y se conoce que es un componente constitutivo del sistema de transporte de electrones de la mitocondria en las células de organismos vivos. La coenzima Q funciona como un componente de transporte en el sistema de transporte de electrones repitiendo la oxidación y reducción en mitocondrias y de la coenzima Q, la coenzima Q reducida se conoce que tiene una acción antioxidante. En seres humanos, la coenzima Q10, que es una coenzima Q que tiene 10 estructuras repetidas en la cadena lateral, es el componente principal y, generalmente, aproximadamente un 40-15 90% de la misma en los organismos vivos es del tipo reducido. Las acciones fisiológicas de la coenzima Q incluyen la activación de la producción de energía activando la mitocondria, activación de la función cardíaca, efecto estabilizante de membranas celulares, efecto de protección celular mediante una acción oxidante y similares.

20 De la coenzima Q10, la coenzima Q10 oxidada ha sido convencionalmente usada como un fármaco para el fallo cardíaco congestivo o alimentos saludables y, en los últimos años, es conocida la coenzima Q10 reducida que tiene una actividad fisiológica superior.

25 Las sustancias bioactivas lipófilas como la coenzima Q10 y similares pueden ser obtenidas, por ejemplo, mediante síntesis, fermentación, extracción a partir de sustancias que se producen de forma natural y similares. Cuando sea necesario la coenzima Q10 que tiene una pureza superior puede ser obtenida también sometiendo el extracto obtenido a purificación mediante cromatografía o cristalización mediante precipitación de cristales. Por ejemplo, un método general para obtener coenzima Q10 incluye cultivar un microorganismo que produce Q10 y extraer la coenzima Q10 en el microorganismo a partir de una suspensión del microorganismo usando un disolvente orgánico.

30 Para una operación para extraer un componente útil contenido en una célula microbiana, son convencionalmente conocidos un método que incluye deshidratar una suspensión acuosa de un microorganismo cultivado para proporcionar una estructura de hongos húmedos y poner la misma en contacto con un disolvente orgánico, un método que incluye deshidratar una suspensión acuosa, secar la misma para proporcionar una estructura de hongos secos y poner los mismos en contacto con un disolvente orgánico y un método que incluye poner una suspensión acuosa directamente en contacto con un disolvente orgánico y realizar una extracción líquido-líquido.

35 El documento de patente 1 describe un ejemplo en el que una suspensión de levadura *Phaffia* cultivada se centrifugó para recuperar hongos, la estructura de hongos recuperada se secó por aspersión y la astaxantina en la estructura de hongos se extrajo mientras se homogeneizaba con un disolvente mixto de hexano, etanol y similares. Además, en un ejemplo en el que una estructura de hongos del género *Mortierella* fue cultivada, una suspensión de la estructura de hongos se deshidrató y se secó y un aceite que contenía ácido araquidónico se extrajo con hexano (documento de patente 2) y es conocido un ejemplo en el que la estructura de hongos del género *Mucor* fue cultivada, el medio de cultivo fue homogeneizada, liofilizada y ácido  $\gamma$ -linolénico se extrajo con un disolvente como hexano y similares (documento de patente 3). En estos métodos de extracción, se mezclaron una estructura de hongos secos y un disolvente orgánico como un disolvente de extracción y se realizó una separación sólido-líquido después de completarse la operación de extracción para separar residuos de estructuras de hongos, con lo que se puede obtener una fase orgánica que contiene la sustancia objeto.

45 El documento de patente 4 describe un ejemplo en el que una estructura de hongos húmeda o estructura de hongos seca de un microorganismo que contiene coenzima Q10 se puso en contacto con metanol a baja temperatura, se retiraron los contaminantes de dentro y fuera de la estructura de hongo y seguidamente la estructura de hongos se puso en contacto con metanol y seguidamente la estructura de hongos se puso en contacto con metanol a una temperatura elevada, con lo que se extrajo la coenzima Q10. Esta operación de extracción sólido-líquido es ventajosa ya que es fácil una separación sólido-líquido después de la extracción debido a una gran diferencia en la densidad aparente entre una estructura de hongos y un disolvente de extracción, la pérdida de la sustancia objeto es pequeña y la extracción se puede realizar con una eficacia elevada.

55 Por el contrario, estos métodos tienen problemas en cuanto que requieren una etapa de deshidratación y secado antes de la extracción, una gran cantidad de agua de una suspensión acuosa de un microorganismo cultivado mediante un aparato como centrifugación, secado por aspersión, liofilizador y similares, puede que no se consigue una velocidad de extracción suficiente en algunos casos dependiendo del contenido de agua que permanece en la estructura de hongos, el coste del aparato y el coste de funcionamiento pueden resultar elevados y similares.

5 Como un ejemplo en el que una suspensión acuosa de un microorganismo es extraída sin deshidratación y secado, es conocido un ejemplo en el que una suspensión homogeneizada de un microorganismo cultivado se puso en contacto con un disolvente orgánico como hexano, 2-propanol y similares, en el que se extrajo coenzima Q10 en la estructura de hongos (documento de patente 5). En esta operación de extracción líquido-líquido, una sustancia objeto puede ser extraída con un rendimiento elevado en una cantidad de tratamiento grande sin deshidratar y secar el microorganismo. Sin embargo, cuando una suspensión acuosa de una célula microbiana o un homogenato celular de la misma, particularmente una suspensión acuosa del homogenato celular, especialmente una suspensión acuosa del homogenato celular mediante un tratamiento físico es sometida a extracción con un disolvente orgánico, se producen problemas ya que tiende a producirse el fenómeno de la emulsión debido a la presencia de componentes celulares como proteína parcial, una gran cantidad de fase orgánica que contiene la sustancia objeto es atrapada en la suspensión de homogenato de la célula microbiana, la fase orgánica no puede ser separada eficazmente, lo que a su vez no solamente disminuye el rendimiento, sino que rebaja también la velocidad de recuperación del disolvente de extracción usado. Además, el funcionamiento complicado y el aumento de los costes han sido un problema ya que, a parte del disolvente orgánico hidrófobo, es necesario utilizar un disolvente hidrófilo en una cantidad que sobrepasa un cierto nivel.

El documento de patente 6 se refiere a un procedimiento para la extracción de carotenos a partir de células microbianas con una mezcla disolvente que contiene ésteres de ácido acético y alcoholes C1-C4 y un aceite.

El documento de patente 7 se refiere a un procedimiento para producir coenzima Q10 reducida extrayendo la coenzima con un disolvente orgánico.

20 El documento no patente 1 se refiere a la extracción de lípidos como carotenoides y coenzima Q10 a partir de biomasa de fermentación derivada de microorganismos. Para la extracción se usan dimetil-éter y/o dióxido de carbono supercríticos.

25 Convencionalmente, cuando se usa un tensioactivo para una extracción líquido-líquido, la afinidad entre una fase acuosa y una fase de disolvente orgánico se hace elevada debido a un efecto de superficie interfacial, como consecuencia de lo cual se produce fácilmente la homogeneización y la fase acuosa y la fase de disolvente orgánico necesitan un tiempo de separación prolongado o, a menudo, no se separan incluso cuando ha transcurrido un tiempo en la misma y, en algunos casos, es necesario una separación forzada mediante una operación como centrifugación y similares. Por lo tanto, el uso de un tensioactivo en una etapa de extracción en una extracción líquido-líquido general se ha considerado que no es preferible.

30 Lista de documentos

Documentos de patentes

Documento de patente 1: JP-A-7-41687

Documento de patente 2: JP-A-2009-120840

Documento de patente 3: JP-A-5-17796

35 Documento de patente 4: JP-B-4275621

Documento de patente 5: JP-A-2008-253271

Documento de patente 6: US-A-5.714.658

Documento de patente 7: EP-A-1466983

Literatura no de patentes

40 Documento no patente 1: O. Catchpole *et al.*, J. of Supercritical Fluids, 53, 2010, págs. 34-41.

### Descripción de la invención

Problemas que van a ser resueltos mediante la invención

45 Como se mencionó anteriormente, una operación de extracción de un componente útil como una sustancia bioactiva lipófila a partir de células microbianas convencionales está asociada con problemas de funcionamiento complicado y aumento de costes, ya que es necesaria una instalación especial para la deshidratación, secado y similares del microorganismo antes de la extracción, capacidad de separación entre un disolvente que contiene un componente útil y componentes de estructuras de hongos después de la extracción es escasa, el rendimiento es insuficiente y es necesario usar varios disolventes.

50 La presente invención se dirige a proporcionar un método de producción de una sustancia bioactiva lipófila, que incluye extraer la sustancia bioactiva lipófila a partir de una célula microbiana que contiene dicha sustancia, sin usar

una deshidratación especial, instalación de secado y sin provocar una disminución en el rendimiento debido a la capacidad de separación degradada entre el disolvente y el componente de estructura de hongos, consiguiéndose así una producción industrial eficaz.

Medios para solucionar los problemas

- 5 Los presentes inventores han realizado estudios intensivos para intentar resolver los problemas anteriormente mencionados y encontraron que una operación de extracción de una suspensión acuosa de una célula microbiana o un homogenato de células microbianas que contienen una sustancia bioactiva lipófila con un disolvente orgánico en presencia de un tensioactivo particular, no solamente mejora la afinidad del disolvente orgánico y la suspensión acuosa, sino que permite también que se produzca rápidamente una separación de aceite-agua después de mezclar y sedimentar, proporcionando así una extracción eficaz de la sustancia bioactiva lipófila, y que el método es también adecuado para una producción industrial, lo que dio lugar a que se complementase la presente invención.

Consecuentemente, la presente invención proporciona lo siguiente:

- 15 [1] Un método de producción de una sustancia bioactiva lipófila, que comprende mezclar una suspensión acuosa de una célula microbiana que contiene una sustancia bioactiva lipófila o un homogenato de células microbianas de la misma con un disolvente orgánico en presencia de al menos un tipo de tensioactivo no iónico seleccionado entre el grupo que consiste en tensioactivos de copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, ésteres de ácidos grasos y sacarosa, ésteres de ácidos grasos y glicerol, ésteres de ácidos grasos y sorbitán, tensioactivos de poliéter-poliol, tensioactivos de polioxietileno-alqui-éter y tensioactivos de alquil-éter y extraer la sustancia bioactiva lipófila, en que la cantidad del tensioactivo no iónico que va a ser añadido es de 0,01% p-10% p de la suspensión acuosa de la célula microbiana o el homogenato de células microbianas, en que la sustancia bioactiva lipófila se selecciona entre coenzimas Q, vitaminas, carotenoides, polifenoles liposolubles, flavonoides, esteroides, ácido  $\alpha$ -lipoico y L-carnitina y en que el disolvente orgánico es un disolvente que contiene un disolvente orgánico hidrófobo o un disolvente hidrófobo.

[2] El método de producción del apartado [1], en el que la sustancia bioactiva lipófila es coenzima Q10.

- 25 [3] El método de producción del apartado [2], en el que la coenzima Q10 es coenzima Q10 reducida o una mezcla de coenzima Q10 reducida y coenzima Q10 oxidada.

[4] El método de producción de cualquiera de los apartados [1]-[3], en el que el tensioactivo no iónico es al menos un tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno.

- 30 [5] El método de producción de uno cualquiera de los apartados [1] a [4], en el que se usa además un disolvente orgánico hidrófilo en combinación con el disolvente hidrófobo.

[6] El método de producción de uno cualquiera de los apartados [1]-[5], en el que la extracción es una extracción continua.

- 35 Los métodos convencionales de extracción de componentes útiles a partir de células microbianas tienen problemas en la instalación, costes de producción y estabilidad de funcionamiento y tienen también problemas similares como un método de producción de una sustancia bioactiva lipófila. Sin embargo, una sustancia bioactiva lipófila puede ser eficazmente extraída mediante una operación de extracción líquido-líquido según el método de producción de la presente invención, y el método es también adecuado para una producción industrial.

- 40 Además, usando el tensioactivo particular encontrado en la presente invención para una operación de extracción líquido-líquido, una fase de dispersión que contiene la sustancia objeto puede ser finamente dispersada en un disolvente de extracción durante la extracción, se puede favorecer la transferencia de la sustancia objeto en un disolvente de extracción y se puede realizar rápidamente una separación de aceite-agua sedimentando la fase orgánica y la fase acuosa. Por lo tanto, puede ser establemente producida una sustancia bioactiva lipófila con un rendimiento elevado, se puede suprimir también la pérdida de disolvente de extracción de vida a la transferencia de la fase orgánica en la fase acuosa. Además, incluso cuando son necesarios convencionalmente varios tipos de disolventes de extracción para una operación de extracción para obtener la sustancia objeto con un rendimiento superior, se puede realizar una operación de rendimiento elevado con un único disolvente solo en la presente invención, lo que simplifica el aparato y la operación, proporcionando también efectos de reducción de la energía necesaria para la recuperación del disolvente y reducción de la carga medioambiental.

### Descripción de realizaciones

- 50 La realización de la presente invención se describe en detalle en lo que sigue.

La presente invención es un método de producción de una sustancia bioactiva lipófila, que comprende mezclar una suspensión acuosa de células microbianas que contienen una sustancia bioactiva lipófila o un homogenato celular de la misma con un disolvente orgánico que comprende un disolvente orgánico hidrófobo en presencia del tensioactivo no iónico particular mencionado con posterioridad y extraer la bioactiva en la fase del

disolvente orgánico.

En el método de producción de la presente invención, la sustancia bioactiva lipófila que va a ser el objetivo de la extracción es producida en una célula microbiana, muestra afinidad por disolventes orgánicos (liposolubles) y es una sustancia fisiológicamente activa útil para organismos vivos. La sustancia bioactiva lipófila se selecciona entre coenzimas Q como enzima Q10, vitaminas como vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, carotenoides como caroteno, astaxantina, fucoxantina, polifenoles liposolubles, flavonoides, esteroides como ergosterol, ácido  $\alpha$ -lipoico y L-carnitina. De estas, son particularmente preferibles la coenzima Q10, astaxantina, ergosterol.

La coenzima Q10 incluye el tipo oxidado y el tipo reducido, como se mencionó anteriormente. La presente invención se dirige, como enzima Q10, tanto a coenzima Q10 oxidada como coenzima Q10 reducida. La coenzima Q10 que incluye coenzima Q10 reducida, a saber, coenzima Q10 reducida sola o coenzima Q10 que es una mezcla de coenzima Q10 reducida y coenzima Q10 oxidada es preferentemente la diana. En la presente memoria descriptiva, cuando se indica solamente como coenzima Q10, puede ser coenzima Q10 oxidada o coenzima Q10 reducida y cuando se mezclan las dos, se quiere indicar la mezcla completa.

Como el microorganismo que contiene una sustancia bioactiva lipófila que va a ser usada en la presente invención, se puede usar cualquiera de una bacteria, levadura y moho sin limitación, en la medida en que sea un microorganismo que produzca la sustancia bioactiva lipófila objeto o un precursor de la misma en la estructura de hongos o un microorganismo que contiene inherentemente la sustancia en una cantidad dada o más. De estos, es preferible un microorganismo que produce la sustancia bioactiva lipófila en la estructura de hongos.

Ejemplos específicos del microorganismo anteriormente mencionado incluyen microorganismos como el género *Agrobacterium*, el género *Aspergillus*, el género *Acetobacter*, el género *Aminobacter*, el género *Agromonas*, el género *Acidiphilium*, el género *Bulleromyces*, el género *Bullera*, el género *Brevundimonas*, el género *Cryptococcus*, el género *Chionosphaera*, el género *Candida*, el género *Cerinosterus*, el género *Exisophiala*, el género *Exobasidium*, el género *Fellomyces*, el género *Filobasidiella*, el género *Filobasidium*, el género *Geotrichum*, el género *Graphiola*, el género *Gluconobacter*, el género *Kockovaella*, el género *Kurtzmanomyces*, el género *Lalaria*, el género *Leucosporidium*, el género *Legionella*, el género *Methylobacterium*, el género *Mycoplana*, el género *Oosporidium*, el género *Pseudomonas*, el género *Pseudozyma*, el género *Paracoccus*, el género *Petromyces*, el género *Rhodotorula*, el género *Rhodospiridium*, el género *Rhizomonas*, el género *Rhodobiun*, el género *Rhodoplana*, el género *Rhodopseudomonas*, el género *Rhodobacter*, el género *Sporobolomyces*, el género *Sporidiobolus*, el género *Saitoella*, el género *Schizosaccharomyces*, el género *Sphingomonas*, el género *Sporotrichum*, el género *Synpodiomyces*, el género *Sterigmatosporidium*, el género *Tapharina*, el género *Tremella*, el género *Trichosporon*, el género *Tilletiaria*, el género *Tilletia*, el género *Tolyposporium*, el género *Tilletiopsis*, el género *Ustilago*, el género *Udeniomyces*, el género *Xanthophyllomyces*, el género *Xanthobacter*, el género *Paecilomyces*, el género *Acremonium*, el género *Hyphomonus*, el género *Rhizobium*, el género *Phaffia*, el género *Haematococcus* y similares. A partir de los aspectos de facilidad de cultivo y productividad, es preferible una bacteria o levadura y la bacteria es más preferentemente una bacteria no fotosintética, además, el género *Agrobacterium*, el género *Gluconobacter*, el género *Methylobacterium*, el género *Pseudomonas*, el género *Paracoccus*, el género *Rhodobacter* y la levadura es de forma particularmente preferida del género *Schizosaccharomyces*, el género *Saitoella*, el género *Phaffia*.

La presente invención abarca también microorganismos que producen una sustancia bioactiva lipófila fuera de la estructura de hongos, es decir, en un medio de cultivo.

Como el microorganismo que produce una sustancia bioactiva lipófila, se pueden usar preferentemente no solo las cepas salvajes de los microorganismos anteriormente mencionados sino también, por ejemplo, variantes y recombinantes en los que la actividad de transcripción y traducción del gen implicado en la biosíntesis de la sustancia bioactiva lipófila objeto para el microorganismo anteriormente mencionado, o la actividad enzimática de la proteína expresada, ha(n) sido alterado(s) o mejorado(s).

Las células microbianas que contienen una sustancia bioactiva lipófila como coenzima Q10 y similares pueden ser obtenidas cultivando el microorganismo anteriormente mencionado. El método de cultivo no está particularmente limitado y se puede seleccionar apropiadamente un método de cultivo adecuado para el microorganismo diana o adecuado para la producción de la sustancia bioactiva lipófila objeto. El periodo de cultivo no está particularmente limitado, y solo es necesario producir una cantidad deseada de la sustancia bioactiva lipófila objeto en una célula microbiana. Aunque la cantidad de producción (contenido) de la sustancia bioactiva lipófila en este caso no está particularmente limitada por el objeto, el contenido de la sustancia bioactiva lipófila por medio es, por ejemplo, no menos de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , preferentemente no menos de 1  $\mu\text{g/ml}$ , más preferentemente no menos de 2  $\mu\text{g/ml}$ .

En el método de producción de la presente invención, para la extracción de una sustancia bioactiva lipófila a partir de las células microbianas anteriormente mencionadas que contienen la sustancia bioactiva lipófila, esta puede ser directamente extraída a partir de las células microbianas. Cuando se desee, las células microbianas anteriormente mencionadas pueden ser homogeneizadas para proporcionar un homogenato de células microbianas y la sustancia puede ser extraída a partir del homogenato. La homogeneización celular contribuye a una extracción eficaz de una sustancia bioactiva lipófila producida y acumulada en una célula microbiana. Aunque no siempre es necesario un

5 tratamiento de homogeneización celular para bacterias, preferentemente se realiza cuando se usan células de levaduras o mohos. Cuando se usan células de levaduras o de mohos y las células no son homogeneizadas, disminuye la eficacia de recuperación de la sustancia bioactiva lipófila producida y acumulada en las células microbianas. No es necesario decir que la homogeneización y extracción celular se pueden realizar simultáneamente.

Para la "homogeneización" en la presente invención, es suficiente un deterioro de la estructura de la superficie como la pared celular hasta el alcance en que la sustancia bioactiva lipófila objeto pueda ser extraída, y no es necesario que se rompa o fragmente la célula del microorganismo.

10 En la presente solicitud, una "suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato de células microbianas de las mismas" se refiere a una suspensión de células microbianas o un homogenato de células microbianas de las mismas en un disolvente acuoso como agua, solución salina, tampón, medio y similares, preferentemente agua y/o medio.

15 La forma de las células microbianas que van a ser la diana para la homogeneización celular anteriormente mencionada puede ser una suspensión acuosa de células microbianas, medio de cultivo de las mismas, medio de cultivo concentrado de las mismas, células microbianas como estructura de hongos húmeda recogida a partir de un medio de cultivo, las cuales después de un lavado, la estructura de hongos húmeda se puso en suspensión en un disolvente (que incluye, por ejemplo, agua, solución salina, tampón, etc.), en que la estructura de hongos seca es la estructura de hongos húmeda anteriormente mencionada después de secar, la estructura de hongos seca se pone en suspensión en un disolvente (que incluye, por ejemplo, agua, solución salina, tampón, etc.). Son preferidas las suspensiones acuosas de células microbianas, medio de cultivo de las mismas, medio de cultivo concentrado de las mismas, las cuales después de un lavado, y más preferentemente desde el punto de vista de la funcionalidad son un medio de cultivo, medio de cultivo concentrado de las mismas y después de un lavado.

20 Las células microbianas anteriormente mencionadas son homogeneizadas realizando uno o más de los siguientes métodos de homogeneización en un orden opcional. Ejemplos de métodos de homogeneización incluyen tratamiento físico, tratamiento químico, tratamiento enzimático así como tratamientos con calor, autólisis, lisis osmótica o plasmólisis.

Ejemplos del tratamiento físico anteriormente mencionado incluyen homogeneizador a presión elevada, homogeneizador de paletas rotatorias, homogeneizador por ultrasonidos, prensa francesa, molino de bolas o sus combinaciones.

30 Ejemplos del tratamiento químico anteriormente mencionado incluyen un tratamiento usando un ácido como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico (preferentemente ácido fuerte), tratamiento usando una base como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio (preferentemente base fuerte) y combinaciones con los mismos.

Ejemplos del tratamiento enzimático anteriormente mencionado incluyen métodos que usan lisozima, zimoliasa, glucanasa, novozima, proteasa, celulasa y estas pueden ser usadas también en combinaciones apropiadas.

35 Ejemplos del tratamiento con calor anteriormente mencionado incluyen un tratamiento a 60-140 °C durante aproximadamente 30 minutos-3 horas.

Ejemplos de la autólisis anteriormente mencionada incluyen un tratamiento con un disolvente como acetato de etilo.

40 Además, puede ser inducida también una lisis osmótica y plasmólisis de las células mediante un tratamiento con una solución que tiene una concentración diferente de sales intracelulares. Sin embargo, como el uso de este método solo da lugar a menudo a un efecto insuficiente de homogeneización celular, se usa preferentemente en combinación con el tratamiento físico, tratamiento químico, tratamiento enzimático, tratamiento con calor o autólisis anteriormente mencionados.

45 En la presente invención, como un método de homogeneización celular para un pretratamiento de extracción y recuperación de una sustancia bioactiva lipófila, desde el punto de vista de la eficacia de la homogeneización es más preferentemente un tratamiento físico, tratamiento químico (particularmente tratamiento con ácidos, preferentemente ácidos fuertes (por ejemplo, tratamiento con un ácido con un pKa de 2,5 o menos en solución acuosa)) y un tratamiento con calor, entre los métodos de homogeneización anteriormente mencionados.

50 En la presente invención, las células microbianas que contienen una sustancia bioactiva lipófila, o un homogenato de células microbianas que contienen una sustancia bioactiva lipófila, que es obtenida como se mencionó anteriormente, son tratadas en forma de una suspensión acuosa y se extrae la sustancia bioactiva lipófila. En la presente invención, el método para preparar una suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato de células microbianas no está particularmente limitado. Por ejemplo, un medio de cultivo después del cultivo de un microorganismo que produce una sustancia bioactiva lipófila, el medio de cultivo después de una concentración y/o lavado o la estructura de hongos húmeda o la estructura de hongos seca de las células microbianas se pone en suspensión en agua o un disolvente acuoso. Alternativamente, una suspensión acuosa de células microbianas

puede ser homogeneizada mediante el método anteriormente mencionado.

En el método de producción de la presente invención, la concentración de la estructura de hongos en una suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato de células microbianas que va a ser la diana de extracción no está particularmente limitada. Sin embargo, generalmente está en el intervalo de 1-25% p en términos del peso seco de la estructura de hongos y económica de forma preferente en el intervalo de 10-20% p.

En el método de la presente invención, en presencia de un tensioactivo no iónico particular, una suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato de células microbianas que contiene la sustancia bioactiva lipófila anteriormente mencionada y un disolvente orgánico que comprende un disolvente orgánico hidrófobo se mezclan y la sustancia bioactiva lipófila es extraída en la fase del disolvente orgánico mediante extracción líquido-líquido, con lo que se separan aceite y agua sedimentando la mezcla preferentemente sin necesidad de una etapa de separación forzada aceite-agua, y la sustancia bioactiva lipófila se recupera a partir de la fase separada del disolvente orgánico. Es decir, se puede realizar continuamente una etapa de extraer una sustancia bioactiva lipófila a partir de una mezcla de dicha suspensión acuosa y el disolvente orgánico y una etapa de sedimentar la mezcla para proporcionar la separación aceite-agua, para obtener eficazmente la sustancia.

En el método de producción de la presente invención, es necesario el uso de un éster de ácido graso y glicerol, éster de ácido graso y sacarosa, éster de ácido graso y sorbitán, tensioactivo de poliéter-poliol, tensioactivo de polioxietileno-alquil-éter, tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno o un tensioactivo de alquil-éter, como un tensioactivo no iónico para la extracción. Se pueden usar dos o más tipos de estos tensioactivos no iónicos en combinación o se pueden usar en combinación estos tensioactivos no iónicos y otros tensioactivos.

Ejemplos de los ésteres de ácidos grasos y glicerol anteriormente mencionados incluyen glicéridos parciales de ácidos grasos, éster de ácido graso y poliglicerol, o ricinoleato condensado de poliglicerol. Ejemplos de los glicéridos parciales de ácidos grasos incluyen ésteres de ácidos grasos y monoglicerol como monocaprilato de monoglicerol, monocaprato de monoglicerol, dicaprilato de monoglicerol, dicaprato de monoglicerol, dilaurato de monoglicerol, dimiristato de monoglicerol, diestearato de monoglicerol, dioleato de monoglicerol, dierucato de monoglicerol, dibehenato de monoglicerol, ésteres de ácidos orgánicos y ácidos grasos y monoglicerol como éster de ácido caprílico y ácido succínico y monoglicerol, éster de ácido esteárico y ácido cítrico y monoglicerol, éster de ácido esteárico y ácido acético y monoglicerol, éster de ácido esteárico y ácido succínico y monoglicerol, éster de ácido esteárico y ácido láctico y monoglicerol, éster de ácido esteárico y ácido diacetiltartárico y monoglicerol, éster de ácido oleico y ácido cítrico y monoglicerol. Ejemplos del éster de ácido graso y poliglicerol incluyen un poliglicerol en que el poliglicerol que tiene un grado de polimerización de 2 a 10, como componente principal es esterificado con un ácido graso que tiene 6-22 átomos de carbono en uno o más grupos hidroxilo del poliglicerol. Ejemplos específicos incluyen monocaprilato de hexaglicerol, dicaprilato de hexaglicerol, monocaprilato de decaglicerol, monolaurato de triglicerol, monolaurato de tetraglicerol, monolaurato de pentaglicerol, monolaurato de hexaglicerol, monolaurato de decaglicerol, monomiristato de triglicerol, monomiristato de pentaglicerol, trimiristato de pentaglicerol, monomiristato de hexaglicerol, monomiristato de decaglicerol, monooleato de diglicerol, monooleato de triglicerol, monooleato de tetraglicerol, monooleato de pentaglicerol, monooleato de hexaglicerol, monooleato de decaglicerol, monoestearato de diglicerol, monoestearato de triglicerol, monoestearato de tetraglicerol, monoestearato de pentaglicerol, triestearato de pentaglicerol, monoestearato de hexaglicerol, triestearato de hexaglicerol, diestearato de hexaglicerol, monoestearato de decaglicerol, diestearato de decaglicerol o triestearato de decaglicerol. Ejemplos del ricinoleato condensado con poliglicerol incluyen los que tienen un grado de polimerización medio de poliglicerol de 2-10 y un grado de condensación medio de ácido poliricinoleico (número medio ácido ricinoleico condensado) de 2-4, por ejemplo, ricinoleato condensado con tetraglicerol, ricinoleato condensado con pentaglicerol o ricinoleato condensado con hexaglicerol.

Ejemplos de los ésteres de sacarosa anteriormente mencionados incluyen aquellos en los que uno o más grupos hidroxilo de sacarosa están esterificados con un ácido graso que tiene 6-18, preferentemente 6-12 átomos de carbono. Ejemplos específicos incluyen palmitato de sacarosa o estearato de sacarosa.

Ejemplos de los ésteres de ácidos grasos y sorbitán anteriormente mencionados incluyen aquellos en los que uno o más grupos hidroxilo de sorbitán están esterificados con un ácido graso que tiene 6-18, preferentemente 6-12 átomos de carbono. Ejemplos específicos incluyen monoestearato de sorbitán o monooleato de sorbitán.

Ejemplos del tensioactivo de poliéter-poliol anteriormente mencionado incluyen la serie Adekanol LG (LG-109, LG-126, LG-294, LG-295S, LG-299, LG-805) fabricados por la empresa ADEKA CORPORATION.

Son preferidos como el tensioactivo de polioxietileno-alquil-éter anteriormente mencionado aquellos obtenidos mediante polimerización por adición de óxido de etileno a un alcohol alifático que tiene 12-22 átomos de carbono. Ejemplos incluyen la serie Emulgen (103, 104P, 105, 106, 108, 109P, 120, 123P, 147, 150, 210, 220, 306P, 320P, 350, 404, 408, 409PV, 420, 430, 705, 707, 709, 1108) fabricados por la empresa Kao Corporation.

Como el tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno anteriormente mencionado se incluyen aquellos que tienen una cadena de óxido de propileno (PO) entre cadenas de óxido de etileno (EO)

(EPOxPOyEOz), copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno de tipo inverso, copolímero de bloques de etilenodiamina-polioxietileno-polioxipropileno, que son copolímeros de bloques obtenidos añadiendo óxido de etileno a ambos extremos de polipropilenglicol.

5 Ejemplos del copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno anteriormente mencionado que tienen una cadena de óxido de propileno (PO) entre cadenas de óxido de etileno (EO) incluyen la serie Pluronic L (L-31, L-34, L-44, L-61, L-62, L-64, L-71, L-72, L-101, L-121), la serie Pluronic P (P-65, P-84, P-85, P-103, P-105, P-123) fabricadas por la empresa ADEKA CORPORATION, la serie Pluronic F (F-68, F-108, F-127), la serie Pluronic PE fabricadas por la empresa BASF.

10 Ejemplos del copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno de tipo inverso anteriormente mencionado incluyen la serie Pluronic R (25R-1, 25R-2, 17R-2, 17R-3, 17R-4) fabricada por la empresa ADEKA CORPORATION, la serie Pluronic RPE fabricada por la empresa BASF.

Ejemplos del copolímero de bloques de etilenodiamina-polioxietileno-polioxipropileno anteriormente mencionado incluyen la serie Pluronic TR (TR-701, TR-702, TR-704) fabricada por la empresa ADEKA CORPORATION, la serie Tetricon (ploxamina) fabricada por la empresa BASF.

15 Además, un tensioactivo de tipo copolímero tribloques (EOxBOyEOz) que tiene una cadena de óxido de butileno (BO) entre dos cadenas de óxido de etileno (EO) (EOxPOyEOz), que tiene una estructura similar a la de un tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, puede ser usado también en el método de producción de la presente invención, como el tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno.

20 De los tensioactivos de copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno (y sus análogos) anteriormente mencionados, es preferible un tensioactivo que tiene un peso molecular medio másico en el intervalo de 500-8.000, y es más preferible un tensioactivo que tiene un peso molecular medio másico en el intervalo de 1.000-4.000.

25 Ejemplos del tensioactivo de tipo no iónico de alquil-éter anteriormente mencionado incluyen la serie Adekatol LB (LB-53B, LB-720, LB-820, LB-54C, LB-83, LB-93, LB-103, LB-1220, LB-1520), o la serie Adekatol LA (LA-675B, LA-775, LA-875, LA-975, LA-1275) fabricadas por la empresa ADEKA CORPORATION.

No es necesario decir que dos o más tipos de los tensioactivos no iónicos mostrados en la presente memoria descriptiva pueden ser usados también en la combinación.

30 Es preferible usar al menos un tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno entre los tensioactivos no iónicos anteriormente mencionados. En este caso, puede ser usado solo un tipo de tensioactivo de copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno y es particularmente preferible usar dos o más tipos de los tensioactivos de copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno en combinación o un tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno y un tensioactivo no iónico diferente en combinación. Ejemplos del tensioactivo no iónico que va a ser combinado con el tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno incluyen los tensioactivos no iónicos anteriormente mencionados, a saber, ésteres de polioxietileno-polioxipropileno incluyen los tensioactivos no iónicos anteriormente mencionados, a saber, ésteres de ácidos grasos y glicerol, ésteres de ácidos grasos y sacarosa, ésteres de ácidos grasos y sorbitán, tensioactivos de poliéter-poliol, tensioactivos de tipo polioxietileno-alquil-éter y tensioactivos de alquil-éter. Entre estos, es particularmente preferible una combinación de dos tipos de tensioactivos de copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno y una combinación de un tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno y un éster de ácido graso y sacarosa, es más preferible una combinación de dos tipos de tensioactivos de copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno y es particularmente preferible una combinación de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno que tiene una cadena de óxido de propileno (PO) entre cadenas de óxido de etileno (EO) y un copolímero de bloques de etilenodiamina-polioxietileno-polioxipropileno.

45 Cuando se combina un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno y un tensioactivo no iónico diferente, la cantidad del tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno que va a ser usado es preferentemente más que la del tensioactivo no iónico diferente. Por ejemplo, es preferentemente 50% p o más, más preferentemente 60% p o más, de forma adicionalmente preferente 75% p o más con relación a la cantidad total de los tensioactivos no iónicos que van a ser usados.

50 Usando un tensioactivo para una operación de extracción líquido-líquido, puede ser finamente dispersada una fase de dispersión que contiene la sustancia bioactiva lipófila objeto en un disolvente orgánico que es un disolvente de extracción, durante la extracción. Como consecuencia, se mejora la eficacia del contacto entre el disolvente de extracción y la sustancia bioactiva lipófila y se favorece la transferencia de la sustancia bioactiva lipófila en la fase del disolvente orgánico. Convencionalmente, cuando se usa un tensioactivo para una extracción líquido-líquido, la afinidad entre la fase acuosa y la fase del disolvente orgánico se hace elevada debido a un efecto interfacial, como consecuencia de lo cual se produce fácilmente una homogeneización y la fase acuosa y la fase del disolvente orgánico requieren un tiempo prolongado para la separación o, a menudo, no se separan incluso cuando se agota el tiempo en las mismas y, en algunos casos, requieren una separación forzada mediante una operación como una



centrifugación o similar. Por lo tanto, el uso de un tensioactivo en una extracción líquido-líquido general se ha considerado que no es preferible. Sin embargo, se encontró por primera vez en la presente invención que la extracción líquido-líquido de una sustancia bioactiva lipófila en la fase de disolvente orgánico de una suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato de células microbianas que contiene la sustancia bioactiva lipófila con un disolvente orgánico en presencia del tensioactivo dado anteriormente mencionado, particularmente un tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, no solamente mejora la afinidad del disolvente orgánico y la suspensión acuosa, sino que permite que se produzca también rápidamente una separación aceite-agua después de mezclar y sedimentar. Por lo tanto, el método de producción de la presente invención puede recuperar la fase de disolvente orgánico que contiene la sustancia bioactiva lipófila objeto disuelta en el mismo de forma estable y con un rendimiento elevado.

Cuando se usa un tensioactivo no iónico en pasta o en copos en el método de producción de la presente invención, se usa preferentemente un disolvente para disolver el tensioactivo. Incluso cuando se usa un tensioactivo líquido, se usa preferentemente un disolvente cuando su viscosidad es elevada. Como disolvente que va a ser usado para ello, son deseables agua y alcoholes, que pueden ser usados aisladamente o en forma de un disolvente mixto de agua y alcohol.

En el método de producción de la presente invención, la cantidad del tensioactivo no iónico particular anteriormente mencionado que va a ser usada durante la operación de extracción está en el intervalo de 0,01-10% p, de forma adicionalmente preferible en el intervalo de 0,1-5% p, de forma particularmente preferible en el intervalo de 0,5-5% p, como una concentración relativa a la suspensión acuosa de células microbianas u homogenato de células microbianas. Cuando la cantidad del tensioactivo anteriormente mencionado que va a ser añadido es 0,01% p o menos, no se produce la dispersión fina de la suspensión acuosa en el disolvente orgánico y no se puede asegurar una eficacia suficiente de la extracción. Por otra parte, cuando la cantidad del tensioactivo anteriormente mencionado que va a ser añadido sobrepasa 10%p, la afinidad del disolvente orgánico y la suspensión acuosa se hace mayor de lo necesario. Como consecuencia, se favorece la dispersión fina de la suspensión acuosa en el disolvente orgánico, pero a veces se degradan la capacidad de separación de aceite-agua en el disolvente orgánico y la suspensión acuosa en un estado mixto durante la sedimentación.

En el método de producción de la presente invención, un método de extracción en presencia del tensioactivo no iónico particular anteriormente mencionado no está particularmente limitado en la medida en que una suspensión acuosa y un disolvente orgánico contiene una cantidad dada de un tensioactivo durante la extracción. Ejemplos del método incluyen un método que incluye la adición de un tensioactivo a una suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato de células microbianas antes de la extracción, un método que incluye la adición de un tensioactivo a un disolvente orgánico usado para la extracción, un método que incluye la adición de un tensioactivo a una mezcla de un disolvente orgánico y una suspensión acuosa, un método que incluye la adición de un tensioactivo por adelantado durante la preparación o antes de la preparación de una suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato de células microbianas, un método que incluye utilizar un tensioactivo usado para la homogeneización de células microbianas directamente para la extracción.

En el método de producción de la presente invención, ejemplos del disolvente orgánico que contiene un disolvente orgánico hidrófobo o un disolvente orgánico hidrófobo que va a ser usado para la extracción incluyen hidrocarburos, ésteres de ácidos grasos, éteres, alcoholes, ácidos grasos, cetonas, compuestos de nitrógeno (incluidos nitrilos o amidas) o compuestos de azufre.

Aunque los hidrocarburos no están particularmente limitados, ejemplos de los mismos incluyen hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos o hidrocarburos halogenados. De estos, son preferibles los hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos y son más preferibles los hidrocarburos alifáticos.

Aunque el hidrocarburo alifático puede ser cíclico o acíclico, o saturado o insaturado, y no está particularmente limitado, generalmente son usados de forma preferente los saturados. Generalmente, se usan de forma preferente los que tienen 3-20 átomos de carbono, preferentemente 5-12 átomos de carbono, más preferentemente 5-8 átomos de carbono. Ejemplos específicos incluyen propano, butano, isobutano, pentano, 2-metilbutano, hexano, 2-metilpentano, 2,2-dimetilbutano, 2,3-dimetilbutano, heptano, isómero de heptano (por ejemplo, 2-metilhexano, 3-metilhexano, 2,3-dimetilpentano, 2,4-dimetilpentano), octano, 2,2,3-trimetilpentano, isooctano, nonano, 2,2,5-trimetilhexano, decano, dodecano, 2-penteno, 1-hexeno, 1-hepteno, 1-octeno, 1-nonano, 1-deceno, ciclopentano, metilciclopentano, ciclohexano, metilciclohexano, etilciclohexano, p-mentano, ciclohexeno y similares. Son preferidos pentano, 2-metilbutano, hexano, 2-metilpentano, 2,2-dimetilbutano, 2,3-dimetilbutano, heptano, 2-metilhexano, 3-metilhexano, 2,3-dimetilpentano, 2,4-dimetilpentano, octano, 2,2,3-trimetilpentano, isooctano, nonano, 2,2,5-trimetilhexano, decano, dodecano, ciclopentano, metilciclopentano, ciclohexano, metilciclohexano, etilciclohexano, p-mentano y similares. Son más preferidos pentano, 2-metilbutano, hexano, 2-metilpentano, 2,2-dimetilbutano, 2,3-dimetilbutano, heptano, 2-metilhexano, 3-metilhexano, 2,3-dimetilpentano, 2,4-dimetilpentano, octano, 2,2,3-trimetilpentano, isooctano, ciclopentano, metilciclopentano, ciclohexano, metilciclohexano, etilciclohexano y similares, y son adicionalmente preferidos pentano, hexano, ciclohexano, metilciclohexano y similares.

Aunque el hidrocarburo aromático no está particularmente limitado, generalmente se usa un hidrocarburo aromático

- que tiene de 6 a 20 átomos de carbono, preferentemente de 6 a 12 átomos de carbono, más preferentemente de 7 a 10 átomos de carbono. Ejemplos específicos de los mismos incluyen benceno, tolueno, xileno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, cumeno, mesitileno, tetralina, butilbenceno, p-cumeno, ciclohexilbenceno, dietilbenceno, pentilbenceno, dipentilbenceno, dodecilbenceno, estireno. Preferentemente es tolueno, xileno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, cumeno, mesitileno, tetralina, butilbenceno, p-cumeno, ciclohexilbenceno, dietilbenceno, pentilbenceno, más preferentemente, tolueno, xileno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, cumeno, tetralina y lo más preferentemente cumeno.
- El hidrocarburo halogenado puede ser cíclico o acíclico, saturado o insaturado y no está particularmente limitado. En general, se usa preferentemente uno acíclico. Son más preferibles los hidrocarburos clorados e hidrocarburos fluorados y son todavía más preferibles los hidrocarburos clorados. Además, se usa apropiadamente un hidrocarburo halogenado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono, más preferentemente 1 o 2 átomos de carbono. Ejemplos específicos de los mismos incluyen diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, 1,1-dicloroetano, 1,2-dicloroetano, 1,1,1-tricloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,1,1,2-tetracloroetano, 1,1,2,2-tetracloroetano, pentacloroetano, hexacloroetano, 1,1-dicloroetileno, 1,2-dicloroetileno, tricloroetileno, tetracloroetileno, 1,2-dicloropropano, 1,2,3-tricloropropano, clorobenceno, 1,1,1,2-tetrafluoroetano. Son preferidos diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, 1,1-dicloroetano, 1,2-dicloroetano, 1,1,1-tricloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,1-dicloroetileno, 1,2-dicloroetileno, tricloroetileno, clorobenceno, 1,1,1,2-tetrafluoroetano y similares, y los más preferidos son diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetileno, tricloroetileno, clorobenceno, 1,1,1,2-tetrafluoroetano.
- Aunque los ésteres de ácidos grasos no están particularmente limitados, por ejemplo, se pueden mencionar propionato, acetato o formiato. Son preferidos los acetatos y formiatos y son más preferidos los acetatos. Aunque el grupo éster no está particularmente limitado, en general, se usa un éster alquílico que tiene de 1 a 8 átomos de carbono y un éster aralquílico que tiene de 7 a 12 átomos de carbono, preferentemente un éster alquílico que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, más preferentemente un éster alquílico que tiene de 1 a 4 átomos de carbono.
- Ejemplos específicos de propionatos incluyen propionato de metilo, propionato de etilo, propionato de butilo y propionato de isopentilo, dándose preferencia al propionato de etilo.
- Ejemplos específicos de acetatos incluyen acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, acetato de sec-butilo, acetato de pentilo, acetato de isopentilo, acetato de sec-hexilo, acetato de ciclohexilo o acetato de bencilo. Preferentemente es acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, acetato de sec-butilo, acetato de pentilo, acetato de isopentilo, acetato de sec-hexilo, acetato de ciclohexilo, más preferentemente acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, y lo más preferentemente acetato de etilo.
- Ejemplos específicos de formiato incluyen formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de isopropilo, formiato de butilo, formiato de isobutilo, formiato de sec-butilo o formiato de pentilo. Preferentemente formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de butilo, formiato de isobutilo, formiato de pentilo y lo más preferentemente formiato de etilo.
- Los éteres pueden cíclicos o acíclicos, saturados o insaturados y no están particularmente limitados. Generalmente, se usan los saturados. Generalmente, se usa un éter que tiene de 3 a 20 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono, más preferentemente de 4 a 8 átomos de carbono. Ejemplos específicos incluyen dietiléter, metil terc-butiléter, dipropiléter, diisopropiléter, dibutiléter, dihexiléter, etilviniléter, butilviniléter, anisol, fenetol, butilfeniléter, metoxitolueno, dioxano, furano, 2-metilfurano, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, etilenglicol-dimetiléter, etilenglicol-dietiléter, etilenglicol-dibutiléter, etilenglicol-monometiléter, etilenglicol-monoetiléter, etilenglicol-monobutiléter y similares. Son preferidos como éteres dietiléter, metil terc-butiléter, dipropiléter, diisopropiléter, dibutiléter, dihexiléter, anisol, fenetol, butilfeniléter, metoxitolueno, dioxano, 2-metilfurano, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, etilenglicol-dimetiléter, etilenglicol-dietiléter, etilenglicol-dibutiléter, etilenglicol-monometiléter y etilenglicol-monoetiléter y similares. Son más preferidos dietiléter, metil terc-butiléter, anisol, dioxano, tetrahidrofurano, etilenglicol-monometiléter, etilenglicol-monoetiléter y similares. Son adicionalmente preferidos dietiléter, metil-terc-butiléter, anisol y similares y el más preferido es metil-terc-butiléter.
- Los alcoholes pueden ser cíclicos o acíclicos, saturados o insaturados y no están particularmente limitados y, generalmente, se usan preferentemente los saturados. Normalmente, se usa un alcohol que tiene de 1 a 20 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 12 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono. Entre estos, son preferibles un alcohol monovalente que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un alcohol divalente que tiene de 2 a 5 átomos de carbono y un alcohol trivalente que tiene 3 átomos de carbono.
- Ejemplos de este alcohol incluyen un alcohol monovalente como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, alcohol isobutílico, alcohol terc-butílico, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, alcohol isopentílico, alcohol terc-pentílico, 3-metil-2-butanol, alcohol neopentílico, 1-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-etil-1-butanol, 1-heptanol, 2-heptanol, 3-heptanol, 1-octanol, 2-octanol, 2-etil-1-hexanol, 1-nonanol, 1-decanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, alcohol alílico, alcohol propargílico, alcohol bencílico, ciclohexanol, 1-

metilciclohexanol, 2-metilciclohexanol, 3-metilciclohexanol, 4-metilciclohexanol; un alcohol divalente como 1,2-etanodiol, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, 2,3-butanodiol, 1,5-pentanodiol; y un alcohol trivalente como glicerol.

5 Son preferidos como el alcohol monovalente metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, alcohol isobutílico, alcohol terc-butílico, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, alcohol isopentílico, alcohol terc-pentílico, 3-metil-2-butanol, alcohol neopentílico, 1-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-etil-1-butanol, 1-heptanol, 2-heptanol, 3-heptanol, 1-octanol, 2-octanol, 2-etil-1-hexanol, 1-nonanol, 1-decanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, alcohol bencílico, ciclohexanol, 1-metilciclohexanol, 2- metilciclohexanol, 3- metilciclohexanol, 4-metilciclohexanol. Son más preferidos metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-  
10 butanol, alcohol isobutílico, alcohol terc-butílico, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, alcohol isopentílico, alcohol terc-pentílico, 3-metil-2- butanol, alcohol neopentílico, 1-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-etil-1-butanol, ciclohexanol y similares. Más preferidos son metanol, etanol, 1-propanol, 2- propanol, 1-  
15 butanol, 2-butanol, alcohol isobutílico, alcohol terc-butílico, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, alcohol isopentílico, alcohol terc-pentílico, 3-metil-2-butanol o alcohol neopentílico. Son particularmente preferidos metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, alcohol isobutílico, 2-metil-1-butanol, alcohol isopentílico y el más preferido es 2-propanol.

Como el alcohol divalente son preferibles 1,2-etanodiol, 1-2-propanodiol o 1,3-propanodiol y el más preferible es 1,2-etanodiol. Como el alcohol trivalente es preferible glicerol.

20 Ejemplos de los ácidos grasos incluyen ácido fórmico, ácido acético o ácido propiónico. Son preferidos ácido fórmico y ácido acético y el más preferido es ácido acético.

Las cetonas no están particularmente limitadas y se usa preferentemente una cetona que tiene de 3 a 6 átomos de carbono. Ejemplos específicos de las mismas incluyen acetona, metil-etil-cetona, metil-butil-cetona o metil-isobutil-cetona. Son preferidas la acetona y metil-etil-cetona y la más preferida es acetona.

25 Los nitrilos pueden ser cíclicos o acíclicos, saturados o insaturados y no están particularmente limitados. En general se usa uno que sea saturado. Generalmente se usa un nitrilo que tiene de 2 a 20 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 12 átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 8 átomos de carbono.

30 Ejemplos específicos de los mismos incluyen acetonitrilo, propionitrilo, malononitrilo, butironitrilo, isobutironitrilo, succinonitrilo, valerionitrilo, glutaronitrilo, hexanonitrilo, cianuro de heptilo, cianuro de octilo, undecanonitrilo, dodecanonitrilo, tridecanonitrilo, pentadecanonitrilo, estearonitrilo, cloroacetoneitrilo, bromoacetoneitrilo, cloropropionitrilo, bromopropionitrilo, metoxiacetonitrilo, cianoacetato de metilo, cianoacetato de etilo, tolunitrilo, benzonitrilo, clorobenzonitrilo, bromobenzonitrilo, ácido cianobenzoico, nitrobenzonitrilo, anisonitrilo, ftalonitrilo, bromotolunitrilo, metilcianobenzoato, metoxibenzonitrilo, acetilbenzonitrilo, naftonitrilo, bifenilcarbonitrilo, fenilpropionitrilo, fenilbutironitrilo, metilfenilacetoneitrilo, difenilacetoneitrilo, naftilacetoneitrilo, nitrofenilacetoneitrilo, cianuro de clorobencilo, ciclopropanocarbonitrilo, ciclohexanocarbonitrilo, cicloheptanocarbonitrilo, fenilciclohexanocarbonitrilo o tolilciclohexanocarbonitrilo.

35 Preferentemente es acetonitrilo, propionitrilo, succinonitrilo, butironitrilo, isobutironitrilo, valerionitrilo, metilo cianoacetato, cianoacetato de etilo, benzonitrilo, tolunitrilo o cloropropionitrilo, más preferentemente acetonitrilo, propionitrilo, butironitrilo o isobutironitrilo, lo más preferentemente acetonitrilo.

40 Ejemplos de los compuestos de nitrógeno distintos de nitrilos incluyen amidas como formamida, N-metilformamida, N,N- dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona y similares, nitrometano, trietilamina o piridina.

Ejemplos de los compuestos de azufre incluyen dimetilsulfóxido o sulfolano.

45 Es preferible seleccionar disolventes entre los disolventes orgánicos anteriormente mencionados considerando las propiedades como el punto de ebullición, punto de fusión, viscosidad y similares. Por ejemplo, el punto de ebullición está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 30-150 °C a 1 atm, desde los aspectos de la facilidad de un calentamiento adecuado para aumentar la solubilidad, separación del disolvente de una estructura húmeda mediante secado y recuperación de un disolvente a partir de un filtrado de cristalización y similares. El punto de fusión es preferentemente de aproximadamente 20 °C o menos, preferentemente de aproximadamente 10 °C o menos, todavía más preferentemente de aproximadamente 0°C o menos, considerando la solidificación difícil en el manejo a temperatura ambiente y después de enfriar a una temperatura no superior a la temperatura ambiente y la viscosidad es preferentemente inferior, como de aproximadamente 10 cp o menos a 20 °C.

50 De los disolventes orgánicos anteriormente mencionados, se usa un disolvente que contiene un disolvente orgánico hidrófobo o un disolvente orgánico hidrófobo como disolvente de extracción para una extracción líquido-líquido en un sistema de dos fases para extraer y recuperar una sustancia bioactiva lipófila a partir de una suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato de células microbianas.

55 El disolvente orgánico hidrófobo que va a ser usado en este caso no está particularmente limitado y, de los

5 disolventes orgánicos anteriormente mencionados, se puede usar un disolvente hidrófobo que forme un sistema de dos fases mezclando completamente con agua. Son preferidos los disolventes orgánicos hidrófobos como hidrocarburos, ésteres de ácidos grasos, éteres y son más preferidos los hidrocarburos y son adicionalmente preferidos los hidrocarburos alifáticos. Entre los hidrocarburos alifáticos se pueden usar preferentemente los que tienen 5-8 átomos de carbono. Ejemplos específicos del hidrocarburo alifático anteriormente mencionado que tiene 5-8 átomos de carbono incluyen pentano, 2-metilbutano, hexano, 2-metilpentano, 2,2-dimetilbutano, 2,3-dimetilbutano, heptano, 2-metilhexano, 3-metilhexano, 2,3-dimetilpentano, 2,4-dimetilpentano, octano, 2,2,3-trimetilpentano, isooctano, ciclopentano, metilciclopentano, ciclohexano, metilciclohexano, etilciclohexano. Son particularmente preferidos hexano, heptano y metilciclohexano y los más preferidos son hexano y heptano.

10 En el método de producción de la presente invención, la extracción se realiza en presencia de un tensioactivo, en el que se mejora la afinidad de una suspensión acuosa de una célula microbiana o un homogenato de células microbianas y el disolvente orgánico hidrófobo anteriormente mencionado y se puede conseguir una eficacia de extracción suficiente. Es más preferible usar, como un disolvente orgánico para la extracción, una combinación de un disolvente orgánico hidrófobo como una ayuda y el disolvente orgánico hidrófobo anteriormente mencionado, ya que la suspensión acuosa en el disolvente orgánico puede ser adicionalmente dividida en forma fina y se puede mejorar la estabilidad de la separación aceite-agua durante la sedimentación.

15 En el método de producción de la presente invención, el disolvente orgánico hidrófilo que va a ser usado en combinación con el disolvente orgánico hidrófobo no está particularmente limitado y, de los disolventes orgánicos anteriormente mencionados, se puede usar un disolvente hidrófilo, que es preferentemente un alcohol. Entre los alcoholes, se usa preferentemente un alcohol monovalente que tiene 1-5 átomos de carbono. Ejemplos específicos del mismo incluyen metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, alcohol isobutílico, terc-butílico alcohol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, alcohol isopentílico, alcohol terc-pentílico, 3-metil-2-butanol o alcohol neopentílico. Son particularmente preferidos metanol, etanol, 1-propanol y 2-propanol, y el más preferido es 2-propanol.

20 En el método de producción de la presente invención, la cantidad del disolvente orgánico hidrófobo que va a ser usado como un disolvente de extracción no está particularmente limitada. La concentración durante la extracción está preferentemente en el intervalo de 25-80% en volumen, más preferentemente 50-75% en volumen, con relación al volumen total de las soluciones del sistema de extracción (solución mixta de una suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato celular de las mismas, extracción con disolventes, tensioactivo no iónico, etc.). Además, la cantidad del disolvente orgánico hidrófilo que va a ser usado en combinación con un disolvente orgánico hidrófilo como se mencionó anteriormente no está particularmente limitada en la medida en que se pueda mantener el sistema de dos fases. Preferentemente está en el intervalo de 0,1-50% en volumen, más preferentemente 0,1-10% en volumen, de forma adicionalmente preferida 0,2-5% en volumen con relación al volumen total de las soluciones. Incluso aunque la cantidad del disolvente orgánico hidrófilo que va a ser usado es una cantidad residual de 0,2-2% en volumen con relación al volumen total de las soluciones, el efecto del mismo puede ser exhibido en la presente invención.

25 Cuando se usan un disolvente orgánico hidrófilo y un disolvente orgánico hidrófobo en combinación en el método de producción de la presente invención, el método de adición del disolvente no está particularmente limitado y se pueden mezclar y usar apropiadamente un disolvente orgánico hidrófilo y un disolvente orgánico hidrófobo como un disolvente de extracción, o se puede añadir un disolvente orgánico hidrófilo a una suspensión acuosa de una célula microbiana o un homogenato de células microbianas y seguidamente se puede añadir un disolvente orgánico hidrófobo o se pueden añadir en el orden inverso.

30 En el método de producción de la presente invención, la temperatura para la extracción no está particularmente limitada y la extracción se puede llevar a cabo generalmente a 0-60 °C, preferentemente en el intervalo de 20-50 °C.

35 Como el método de extracción se puede realizar cualquier extracción discontinua y extracción continua. Industrialmente, la extracción continua es preferible considerando la productividad. De la extracción continua, es particularmente preferible una extracción de múltiples fases en contracorriente. El tiempo de agitación en el caso de la extracción discontinua no está particularmente limitado y es generalmente de 5 minutos o más. El tiempo de residencia medio en el caso de la extracción continua no está particularmente limitado y es generalmente de 10 minutos o más.

40 En el método de producción de la presente invención, generalmente, una suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato celular de las mismas, un disolvente orgánico y el tensioactivo anteriormente mencionado se mezclan durante un tiempo dado para realizar la extracción, la mezcla se deja sedimentar para permitir la separación de la fase acuosa y la fase del disolvente orgánico que contiene la sustancia bioactiva lipófila. Cuando la separación de la superficie de aceite-agua es considerablemente lenta, la separación se puede realizar también de forma forzada usando una centrifugadora, centrifugadora continua, ciclón líquido y similares.

45 Adoptando el método de producción anteriormente mencionado de la presente invención, una sustancia bioactiva lipófila contenida en una suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato de células microbianas puede ser extraído con una eficacia elevada. La velocidad de extracción en el método de producción de la presente

invención es generalmente de 70% o más, más preferentemente 80% o más, de forma adicionalmente preferida 90% o más.

5 La velocidad de extracción en este caso es una relación de la cantidad de una sustancia bioactiva lipófila contenida en el extracto después de completarse la operación de extracción respecto a la cantidad total de la sustancia bioactiva lipófila contenida en una suspensión acuosa de células microbianas o un homogenato de células microbianas antes de la extracción, que se puede obtener específicamente como en los ejemplos mencionados con posterioridad.

10 En el método de producción de la presente invención, una sustancia bioactiva lipófila puede ser aislada y recuperada extrayendo la sustancia bioactiva lipófila a partir de células microbianas o un homogenato de células microbianas que contiene la sustancia bioactiva lipófila en un disolvente orgánico mediante la operación que antecede. Se puede utilizar directamente la solución de disolvente orgánico que contiene la sustancia bioactiva lipófila obtenida, o la sustancia puede ser altamente purificada aplicando sucesivamente un método de purificación general.

15 Por ejemplo, después de una purificación con un adsorbente como carbón activado, arcilla blanca y similares, el disolvente orgánico se evapora para proporcionar un extracto que contiene una sustancia bioactiva lipófila o un producto purificado de una sustancia bioactiva lipófila. Además, se puede aplicar un tratamiento de purificación como cromatografía de columna o distribución líquido-líquido generalmente usado, lavando con agua o un disolvente orgánico y similares. Estos tratamientos de purificación se pueden realizar aisladamente o se pueden aplicar varios tipos de los mismos en combinación. De forma más necesaria, se pueden añadir también etapas de saponificación, oxidación, reducción, otro tratamiento de reacción sintética y similares. Además, la sustancia bioactiva lipófila puede ser obtenida también en forma cristalina mediante una operación de cristalización y similares.

20 Por ejemplo, cuando la sustancia bioactiva lipófila objeto es coenzima Q10, la coenzima Q10 puede ser obtenida mediante el método de producción de la presente invención extrayendo coenzima Q10 a partir de una coenzima Q10 que contiene células microbianas o un homogenato de células microbianas de las mismas con un disolvente orgánico y purificando el extracto obtenido que contiene coenzima Q10 mediante un método públicamente conocido. Por ejemplo, el cristal altamente puro coenzima Q10 puede ser obtenido purificando, cuando se desee, un tratamiento con un adsorbente como carbón activado, arcilla blanca y similares, cromatografía de columna y similares y realizando, en la medida necesaria, un tratamiento de oxidación o reducción antes o después de la purificación, que está seguido de una operación de cristalización.

### Ejemplos

30 La presente invención se explica seguidamente más en detalle haciendo referencia a ejemplos, que no están concebidos como una limitación.

35 La velocidad de extracción en cada ejemplo se calculó como sigue. Se añadió una mezcla de metanol-cloroformo (3:1) a un homogenato de células microbianas que contiene coenzima Q10 (1 ml) antes de la extracción hasta una cantidad total de 50 ml y la mezcla se agitó a 25 °C durante 30 minutos. Un sólido derivado de la estructura de hongos se sometió a una separación sólido-líquido, la concentración de coenzima Q de la capa líquida obtenida se midió bajo las siguientes condiciones de HPLC y se calculó la cantidad de coenzima Q contenida en el homogenato de células microbianas diana de extracción.

40 Análogamente, se midió la concentración de coenzima Q del extracto después de la operación de extracción bajo las siguientes condiciones de HPLC y se calculó la cantidad de coenzima Q extraída y se determinó la velocidad de extracción mediante la siguiente fórmula:

velocidad de extracción (%) = peso de coenzima Q contenida en extracto/ peso de coenzima Q contenida en el homogenato de células microbianas antes de la extracción x 100.

Condiciones del análisis HPLC

columna: YMC-Pack 4.6 x 250 mm (fabricada por la empresa YMC. Co., Ltd.)

45 fase móvil: metanol/n-hexano = 85/15

caudal: 1 ml/min

detección: UV 275 nm

Ejemplo 1

50 La cepa *Saitoella complicata* IFO10748 que produce coenzima Q10 fue anaeróbicamente cultivada usando 10 l de un medio (peptona 5 g/l, extracto de levadura 3 g/l, extracto de malta 3 g/l, glucosa 20 g/l, pH 6,0) a 25 °C durante 72 h. El medio de cultivo obtenido que contenía la estructura de hongos del microorganismo se homogeneizó dos veces en un homogeneizador a presión (fabricado por la empresa Rannie) a una presión de homogeneización de 80 mPa

para preparar una solución de homogenato de células microbianas que contenía coenzima Q10.

5 A la solución de homogenato de células microbianas obtenida se añadió tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic L-62, fabricado por la empresa ADEKA CORPORATION) hasta una concentración de 3,3% p, la mezcla resultante (30 partes en volumen) se mezcló con hexano (70 partes en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Como consecuencia, se confirmó una separación de aceite-agua rápida y la relación en volumen del residuo extraído (fase acuosa de la capa inferior que contenía un sólido derivado de microorganismos) con relación a la cantidad de líquido total de la mezcla fue de 0,37. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de 90,8%.

#### Ejemplo 2

15 A una solución de homogenato de estructura de hongos preparada de la misma manera que en el ejemplo 1 se añadió tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic L-62, fabricado por la empresa ADEKA CORPORATION) hasta una concentración de 1,3% p, la mezcla resultante (30 partes en volumen) se mezcló con hexano (69 partes en volumen) y 2-propanol (1 parte en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Como consecuencia, se confirmó una separación de aceite-agua rápida y la relación en volumen del residuo extraído con relación a la cantidad de líquido total fue de 0,33. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de 92,5%.

#### Ejemplo 3

25 A una solución de homogenato de estructura de hongos preparada de la misma manera que en el ejemplo 1 se añadió un tensioactivo de poliéter-poliol (Adekanol LG-126, fabricado por la empresa ADEKA CORPORATION) hasta una concentración de 3,3% p, la mezcla resultante (30 partes en volumen) se mezcló con hexano (70 partes en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Como consecuencia, se confirmó una separación aceite-agua rápida y la relación en volumen del residuo extraído con relación a la cantidad de líquido total fue de 0,39. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de 79,5%.

#### 30 Ejemplo 4

A una solución de homogenato de estructura de hongos preparada de la misma manera que en el ejemplo 1 se añadió tensioactivo de alquil-éter (Adekatol LA-775, fabricado por la empresa ADEKA CORPORATION) hasta una concentración de 3,3% p, la mezcla resultante (30 partes en volumen) se mezcló con hexano (70 partes en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Como consecuencia, se confirmó una separación aceite-agua rápida y la relación en volumen del residuo extraído con relación a la cantidad de líquido total fue de 0,35. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de 85,3%.

#### Ejemplo 5

40 A una solución de homogenato de estructura de hongos preparada de la misma manera que en el ejemplo 1 se añadió tensioactivo de alquil-éter (Adekatol LA-1275, fabricado por la empresa ADEKA CORPORATION) hasta una concentración de 0,3% p, la mezcla resultante (30 partes en volumen) se mezcló con hexano (70 partes en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar y se sometió a una separación aceite-agua forzada mediante una centrifugadora. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de 71,3%.

#### Ejemplo 6

50 A una solución de homogenato de estructura de hongos preparada de la misma manera que en el ejemplo 1 se añadió tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic L-62, fabricado por la empresa ADEKA CORPORATION) hasta una concentración de 1,3% p y estearato de sacarosa (S-1670, fabricado por la empresa Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation) hasta una concentración de 0,3% p, la mezcla resultante (30 partes en volumen) se mezcló con hexano (70 partes en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Como consecuencia, se confirmó una separación aceite-agua rápida y la relación en volumen del residuo extraído con relación a la cantidad de líquido total fue de 0,32. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de

84,6%.

#### Ejemplo 7

5 A una solución de homogenato de estructura de hongos preparada de la misma manera que en el ejemplo 1 se añadió un tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic L-62, fabricado por la empresa ADEKA CORPORATION) hasta una concentración de 1,3% p y un tensioactivo de polímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic TR-702, fabricado por la empresa ADEKA CORPORATION) hasta una concentración de 0,3% p, la mezcla resultante (30 partes en volumen) se mezcló con hexano (70 partes en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Como consecuencia, se confirmó una separación aceite-agua rápida y la relación en volumen del residuo extraído con relación a la cantidad de líquido total fue de 0,30. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de 83,0%.

#### Ejemplo 8

15 A una solución de homogenato de estructura de hongos preparada de la misma manera que en el ejemplo 1 se añadió un tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic L-62, fabricado por la empresa ADEKA CORPORATION) hasta una concentración de 1,3% p y un tensioactivo de polímero de bloques de etilendiamina-polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic TR-701, fabricado por la empresa ADEKA CORPORATION) hasta una concentración de 0,3% p, la mezcla resultante (30 partes en volumen) se mezcló con hexano (70 partes en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Como consecuencia, se confirmó una separación aceite-agua rápida y la relación en volumen del residuo extraído con relación a la cantidad de líquido total fue de 0,31. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de 89,9%.

#### Ejemplo 9

25 La cepa *Saccharomyces cerevisiae* IFO0309 que produce ergosterol fue anaeróbicamente cultivada usando 10 l de un medio (peptona 5 g/l, extracto de levadura 3 g/l, extracto de malta 3 g/l, glucosa 20 g/l, pH 6,0) a 28 °C durante 72 h. La estructura de hongos del microorganismo obtenida se homogeneizó dos veces en un homogeneizador a presión (fabricado por la empresa Rannie) a una presión de homogeneización de 80 mPa para preparar una solución de homogenato de células microbianas que contenía coenzima ergosterol.

30 A la solución de homogenato de células microbianas obtenida se añadió un tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic L-62, fabricado por la empresa ADEKA CORPORATION) hasta una concentración de 3,3% p, la mezcla resultante (30 partes en volumen) se mezcló con hexano (70 partes en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Como consecuencia, se confirmó una separación de aceite-agua rápida y la relación en volumen del residuo extraído con relación a la cantidad de líquido total fue de 0,35. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de ergosterol fue de 89,1%.

#### Ejemplo comparativo 1

40 A una solución de homogenato de estructura de hongos (30 partes en volumen) preparada de la misma manera que en el ejemplo 1 se mezcló con hexano (70 partes en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Como consecuencia, se confirmó una separación aceite-agua rápida y la relación en volumen del residuo extraído con relación a la cantidad de líquido total fue de 0,35. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de 60,2%.

#### Ejemplo comparativo 2

50 A una solución de homogenato de estructura de hongos preparada de la misma manera que en el ejemplo 1 se añadió lisolecitina (fabricada por la empresa Degussa) hasta una concentración de 0,7% p, la mezcla resultante (30 partes en volumen) se mezcló con hexano (70 partes en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Sin embargo, no se produjo una separación aceite-agua y, por lo tanto, la solución se sometió a una separación aceite-agua forzada mediante una centrifugadora. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de 62,2%.

#### Ejemplo comparativo 3

5 A una solución de homogenato de estructura de hongos preparada de la misma manera que en el ejemplo 1 se añadió poli(alcohol vinílico) (preparado por la empresa Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) hasta una concentración de 3,3% p y la mezcla resultante (30 partes en volumen) se mezcló con hexano (70 partes en volumen) y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Como consecuencia, se confirmó una separación aceite-agua rápida y la relación en volumen del residuo extraído con relación a la cantidad de líquido total fue de 0,35. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de 61,9%.

#### Ejemplo de referencia

10 A una solución de homogenato de estructura de hongos (30 partes en volumen) preparada de la misma manera que en el ejemplo 1 se mezcló con hexano (52 partes en volumen) y 2-propanol (18 partes en volumen) a esta relación y la mezcla se sometió a una operación de extracción discontinua a 45 °C durante 60 minutos. Después de mezclar durante un tiempo dado, la solución se dejó sedimentar. Como consecuencia, se confirmó una separación aceite-agua rápida y la relación en volumen del residuo extraído con relación a la cantidad de líquido total fue de 0,48.

15 La cantidad del disolvente de extracción que se transfirió a la fase acuosa fue considerablemente grande. La fase de hexano separada se recogió en forma de una solución del extracto y se analizó mediante HPLC. La velocidad de extracción de coenzima Q10 fue de 91,5%.

20 La tabla 1 muestra las condiciones de introducción de los ejemplos 1-9, ejemplos comparativos 1-3 y ejemplo de referencia, la velocidad de extracción de sustancias bioactivas lipófilas y los resultados de la relación en volumen de los residuos extraídos.

Tabla 1

	partes introducidas			tensoactivo		velocidad de extracción (%)	relación en volumen de residuo extraído (-)
	homogenato de estructura de hongos	disolvente orgánico hidrófobo	disolvente orgánico hidrófilo	tipo	cantidad (% p) introducida en la solución de homogenato de estructura de hongos		
Ejemplo 1	30	70	-	Pluronic L-62	3,3	90,8	0,37
Ejemplo 2	30	69	1	Pluronic L-62	1,3	92,5	0,33
Ejemplo 3	30	70	-	AdekatoL LG-126	3,3	79,5	0,39
Ejemplo 4	30	70	-	AdekatoL LA-775	3,3	85,3	0,35
Ejemplo 5	30	70	-	AdekatoL LA-1275	0,3	71,3	separación forzada
Ejemplo 6	30	70	-	Pluronic L-62 estearato de sacarosa	1,3 0,3	84,6	0,32
Ejemplo 7	30	70	-	Pluronic L-62 Pluronic TR-702	1,3 0,3	83,0	0,30
Ejemplo 8	30	70	-	Pluronic L-62 Pluronic TR-702	1,3 0,3	89,9	0,31
Ejemplo 9	30	70	-	Pluronic L-62	3,3	89,1	0,35



ES 2 676 369 T3

Ejemplo comparativo 1	30	70	-	-	-	60,2	0,35
Ejemplo comparativo 2	30	70	-	lisolectina	0,7	62,2	separación forzada
Ejemplo comparativo 3	30	70	-	poli(alcohol vinílico)	3,3	61,9	0,35
Ejemplo de referencia	30	52	18	-	-	91,5	0,48

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producción de una sustancia bioactiva lipófila, que comprende mezclar una suspensión acuosa de células microbianas que contiene una sustancia bioactiva lipófila o un homogenato de células microbianas de la misma con un disolvente orgánico en presencia de al menos un tipo de tensioactivo no iónico seleccionado entre el grupo que consiste en tensioactivos de copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, ésteres de ácidos grasos y sacarosa, ésteres de ácidos grasos y glicerol, ésteres de ácidos grasos y sorbitán, tensioactivos de poliéter-poliol, tensioactivos de polioxietileno-alquil-éter y tensioactivos de alquil-éter y extraer la sustancia bioactiva lipófila,
- 5 en el que la cantidad del tensioactivo no iónico que va a ser añadido está en el intervalo de 0,01-10% p de la suspensión acuosa de la célula microbiana u homogenato de células microbianas, y en que la sustancia bioactiva lipófila se selecciona entre coenzimas Q, vitaminas, carotenoides, polifenoles liposolubles, flavonoides, esteroides, ácido  $\alpha$ -lipoico y L-carnitina, y
- 10 en que el disolvente orgánico es un disolvente que contiene un disolvente orgánico hidrófobo o un disolvente orgánico hidrófilo.
2. El método de producción según la reivindicación 1, en el que la sustancia bioactiva lipófila es coenzima Q10.
- 15 3. El método de producción según la reivindicación 2, en el que la coenzima Q10 es coenzima Q10 reducida o una mezcla de coenzima Q10 reducida y coenzima Q10 oxidada.
4. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tensioactivo no iónico es al menos un tensioactivo de copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno.
- 20 5. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el disolvente orgánico hidrófilo es usado adicionalmente en combinación con el disolvente orgánico hidrófobo.
6. El método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la extracción es una extracción continua.