



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

209 836

Int.Cl.³

3(51) C 07 J 9/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

1) WP C 07 J/ 2424 828

(22) 13.08.82

(44) 23.05.84

1) ADW DER DDR; BERLIN, DD

2) WORBS, MARTIN, DIPL.-CHEM.; VOIGT, BEATE, DR. SC. NAT.; FREUDENBERG, BERND;
GABSCH, GUENTHER, DIPL.-CHEM.; DD;

4) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON ERGOSTEROL

57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Ergosterol aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten, die bei der mikrobiellen Gewinnung von Futterhefen auf der Basis von Kohlenwasserstoffen anfallen. Ziel der Erfindung ist die kostengünstige Gewinnung von Ergosterol aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten, die sich aus Kohlenwasserstoff-Anteilen > 10% und ggf. sehr unterschiedlichen Kohlenwasserstoff-Typen zusammensetzen, bei minimalem Hilfsstoffverbrauch. Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, vor der Gewinnung des Ergosterols aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten eine Anreicherung des Ergosterols vorzunehmen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die acetonlösliche, das Ergosterol enthaltende Fraktion des Lipid-Kohlenwasserstoff-Extraktes einer diskontinuierlichen oder kontinuierlichen multiplikativen Verteilung in einem ternären Lösungsmittelgemisch, bestehend aus einem Kohlenwasserstoff bzw. einem Kohlenwasserstoff-Gemisch, vorzugsweise im Temperaturbereich 50 bis 160°C, einem Alkohol (Kettenlänge C₁ bis C₄) und H₂O unterworfen wird. Aus den ergosterolhaltigen Ober- und Unterphasen, die den mindestens 20fachen Gehalt an Ergosterol im Vergleich zum Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt enthalten, wird Ergosterol in bekannter Weise durch Kristallisation gewonnen.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Gewinnung von Ergosterol

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von
5 Ergosterol aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten, die
bei der mikrobiellen Gewinnung von Eiweiß auf der Basis
von Kohlenwasserstoffen anfallen.

Sie ist in die IPK C 07 C einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

- 10 Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakte fallen bei der mikro-
biellen Gewinnung von Eiweiß durch Extraktion der Bio-
masse mit niedrigsiedenden Lösungsmitteln oder Lösungs-
mittelgemischen an. Sie sind durch einen Gehalt von
10 bis 80 % Phosphatiden, 10 bis 80 % Fettsäuren, die
15 vorwiegend in gebundener Form vorliegen, sowie weiteren
biogenen Inhaltsstoffen - Ergosterol, fettlöslichen Co-
enzymen und Vitaminen - gekennzeichnet, die im mikro-
biell nicht verwerteten Anteil der Kohlenwasserstoff-
Fraktion gelöst sind. Demzufolge bestehen die Lipid-Koh-
20 lenwasserstoff-Extrakte aus einem Gemisch von Lipiden
und ggf. sehr unterschiedlichen Kohlenwasserstoff-Typen,
z. B. der Siedelage 240 bis 380°C. Die Kohlenwasser-
stoffe können in erheblichen Mengen vorhanden sein (>10 %).

Von den biologisch aktiven Verbindungen ist das Ergosterol von besonderem Interesse, da es als Ausgangsprodukt für die Gewinnung von Vitamin D₂ oder Steroidhormonen genutzt werden kann.

5 Es sind Verfahren bekannt, die die Gewinnung von Ergosterol aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten ermöglichen. In der SU-PS 568 676 wird über ein Verfahren berichtet, bei dem der gesamte Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt verseift und aus dem Unverseifbaren das Ergosterol durch Kühlung
10 abgetrennt wird. In DD-PS 110 037 und DD-PS 151 007 sind Verfahren zur Gewinnung von Ergosterol aus dem acetonlöslichen Anteil des Lipid-Kohlenwasserstoff-Extraktes beschrieben. In DD-PS 110 037 wird der acetonlösliche Anteil mit alkoholischer Lauge verseift, mit unpolaren Lösungsmitteln unter Hinzufügen von Ethanol extrahiert und aus dem
15 Rückstand nach Abtreibung des Extraktionsmittels bei 0 bis 15°C Ergosterol kristallin abgetrennt. Bei dem in DD-PS 151 007 beschriebenen Verfahren wird die acetonlösliche Phase nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels auf
20 160 bis 200°C bei ≤ 2 Torr erwärmt, um einen Teil der Kohlenwasserstoffe abzutrennen. Das Sumpfprodukt wird mit alkoholischer bzw. wässriger Kalilauge verseift und das Ergosterol aus dem Unverseifbaren bei Temperaturen von -10°C bis +20°C durch Kristallisation gewonnen.

25 Die angeführten Verfahren weisen eine Reihe von Nachteilen auf.

Die Isolierung des Ergosterols erfordert zahlreiche Verfahrensstufen, wie die Isolierung des Acetonlöslichen, Verseifung, Extraktion der Seifenlösung, Kristallisation
30 des Ergosterols aus dem Unverseifbaren. Bedingt durch den hohen Kohlenwasserstoff-Anteil, insbesondere in der acetonlöslichen Phase und dem Unverseifbaren, ist der Verbrauch an Energie und Hilfsstoffen bei Verseifung, Extraktion und Kristallisation außerordentlich groß. Darüber

hinaus wird bei allen beschriebenen Verfahren der überwiegende Teil der Lipide des Lipid-Kohlenwasserstoff-Extraktes einem Stoffwandlungsprozeß unterworfen.

Ziel der Erfindung

- 5 Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zu entwickeln, das die einfache und kostengünstige Gewinnung von Ergosterol aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten ermöglicht.

Darstellung des Wesens der Erfindung

- 10 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Ergosterol aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten unter Ausnutzung der unterschiedlichen Löslichkeiten der einzelnen Komponenten des Lipid-Kohlenwasserstoff-Extraktes in lipophilen und hydrophilen Lösungsmitteln anzureichern.

- 15 Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man den Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt in eine acetonunlösliche sowie eine acetonlösliche, das Ergosterol enthaltende Fraktion, trennt. Aus der lösungsmittelfreien acetonlöslichen Fraktion wird Ergosterol durch multiplikative Verteilung in einem ternären Lösungsmittelgemisch soweit
20 angereichert, daß eine nachfolgende einfache Isolierung möglich ist. Aus den ergosterolhaltigen Ober- und Unterphasen kann Ergosterol durch Kristallisation abgetrennt und anschließend gereinigt werden.

Im einzelnen wird dabei wie folgt verfahren:

- 25 Durch Acetonbehandlung wird der Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt in bekannter Weise in eine acetonunlösliche, die Phosphatide enthaltende Fraktion und eine acetonlösliche, die biologisch aktiven Verbindungen enthaltende Fraktion getrennt. Die acetonlösliche Fraktion wird nach
30 destillativer Entfernung des Acetons in einem Lösungsmittelgemisch aus einem Kohlenwasserstoff bzw. einem Kohlenwasserstoff-Gemisch, vorzugsweise im Siedebereich 50 bis 160°C, einem Alkohol (Kettenlänge C₁ bis C₄) und Wasser, beispielsweise einem Gemisch aus 50 Gew.-Teilen

Siedegrenzenbenzin, 50 Gew.-Teilen Methanol und 0,5 bis 2 Gew.-Teilen Wasser einer multiplikativen Verteilung unterworfen. Die multiplikative Verteilung kann diskontinuierlich oder kontinuierlich vorgenommen werden.

Aus den ergosterolhaltigen Ober- und Unterphasen, die im Ergebnis der multiplikativen Verteilung erhalten werden und die den mindestens 20-fachen Gehalt an Ergosterol im Vergleich zum Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt aufweisen, wird nach teilweiser Entfernung des Lösungsmittels Ergosterol bei -10°C bis $+20^{\circ}\text{C}$, vorzugsweise -5°C bis $+5^{\circ}\text{C}$ abgetrennt. Die weitere Reinigung kann durch Umkristallisation aus Aceton oder Alkohol erfolgen. Die ergosterolfreien Phasen, die $> 90\%$ der acetonlöslichen Fraktion darstellen, können nach Entfernung des Lösungsmittels in bekannter Weise, z. B. in Trennölen der Bauindustrie oder in Sammlerreagenzien für die Flotation fluoridischer Erze, Verwendung finden. Sie können aber auch zur Gewinnung weiterer Inhaltsstoffe des Lipid-Kohlenwasserstoff-Extraktes, wie Fettsäuren oder Ubichinone, eingesetzt werden.

Der wesentliche Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Anreicherung des Ergosterols unter Ausschluß von Stoffwandlungsprozessen möglich ist. Dadurch verringert sich der Zeit- und Arbeitsaufwand sowie der Verbrauch an Energie und Chemikalien bei der Isolierung des Ergosterols. Alle im Verfahren genutzten Rohstoffe können darüber hinaus einer wiederholten Nutzung zugeführt werden.

Die acetonlösliche Fraktion der Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakte wird nur einer unwesentlichen stofflichen Veränderung bei der erfindungsgemäßen Verfahrensweise unterworfen und ist einer weiteren Nutzung zugänglich.

Das Verfahren gemäß der Erfindung wird durch nachfolgendes Beispiel erläutert:

Ein Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt wurde aus einem Kohlenwasserstoffe verwertenden Stamm der Hefe *Lodderomyces elongisporus* gewonnen.

Der Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt ist wie folgt charakterisiert:

Kohlenwasserstoffe	44 %
Phosphatide	37 %
freie Fettsäuren und Glyceride	18 %
Ergosterol	0,8 % (dav. Ergosterol-ester < 10 %)
Ubichinone	0,16 %

Zur Herstellung der Ober- und Unterphase für die Craig-Verteilung werden 14 l Siedegrenzenbenzin 100/140 mit 14 l Methanol (Wassergehalt 1 %) zur gegenseitigen Sättigung versetzt.

100 g Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt werden bei Raumtemperatur 10 Minuten mit 200 g Aceton gemischt. Die leichtere, ergosterolhaltige Phase (Ergosterolgehalt 1,3 %) wird abgetrennt, das Aceton destillativ entfernt und der Rückstand (55 g) mit Oberphase auf 200 ml aufgefüllt und in die ersten beiden Verteilelemente eingegeben. Die Verteilung erfolgte in einer Craig-Apparatur mit einem Elementevolumen von 200 ml. Für die Verteilung wurden folgende Parameter eingestellt:

Elemente zur Sättigung	5
Elemente zur Verteilung	100
Absetzzeit	5 min
Temperatur	22-25°C

Die ergosterolhaltigen Elemente wurden dünnschichtchromatographisch festgestellt. Nach dem Einengen wurden 2,5 g Produkt (Ergosterolgehalt 25,6 %), in welchem das gesamte freie Ergosterol der aus dem Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt gewonnenen leichten Phase enthalten ist, erhalten. Nach dem Umkristallisieren aus Aceton wurden 530 mg Reinerergosterol erhalten.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung von Ergosterol aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten, die durch Extraktion von mikrobiell auf Kohlenwasserstoffbasis erzeugter Biomasse mit unpolaren bzw. Kombinationen aus polaren und unpolaren Lösungsmitteln erhalten und mit Aceton in eine acetonunlösliche sowie eine acetonlösliche, das Ergosterol enthaltende Fraktion getrennt werden, dadurch gekennzeichnet, daß man die lösungsmittelfreie acetonlösliche Fraktion einer multiplikativen Verteilung in einem ternären Lösungsmittelgemisch zur Anreicherung des Ergosterols unterwirft und aus den angereicherten Phasen Ergosterol durch Kristallisation gewinnt.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die multiplikative Verteilung ein Gemisch bestehend aus einem Kohlenwasserstoff bzw. einem Kohlenwasserstoff-Gemisch, vorzugsweise im Siedebereich 50 bis 160°C, einem Alkohol (Kettenlänge C₁ bis C₄) und Wasser verwendet wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die multiplikative Verteilung diskontinuierlich oder kontinuierlich vorgenommen wird.