



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

208 171

Int.Cl.³

3(51) C 12 D 7/66

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 D/ 2406 151

(22) 10.06.82

(44) 28.03.84

(71) ADW DER DDR, BERLIN, DD

(72) VOIGT, BEATE, DR. SC. NAT. DIPL.-CHEM.; MUELLER, HORST, DR. RER. NAT. DIPL.-CHEM.;
WORBS, MARTIN, DIPL.-CHEM.; REUTGEN, HERMANN, DR. RER. NAT. DIPL.-LEBENSMITTEL-CHEM., DD;
SESSER, INGRID; BERNHARDT, CLAUS, DD;

(73) siehe (72)

(74) ADW DER DDR INST. F. TECHN. CHEMIE AG PATENTWESEN 7050 LEIPZIG PERMOSERSTR. 15

(54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON UBICHINONEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Ubichinonen aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten, die bei der mikrobiellen Gewinnung von Futterhefen auf der Basis von Kohlenwasserstoffen anfallen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Ubichinone aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten unter Nutzung von Unterschieden in Molekülgröße und -struktur anzureichern und gleichzeitig von den Kohlenwasserstoffen abzutrennen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß aus der acetonlöslichen, die Ubichinone enthaltenden Fraktion des Lipid-Kohlenwasserstoff-Extraktes chromatographisch unter Verwendung von Sephadex LH-20 Ubichinone als definierte Fraktion abgetrennt werden. Die abgetrennte Fraktion weist gegenüber dem Acetonlöslichen des Lipid-Kohlenwasserstoff-Extraktes den mindestens 10fachen Gehalt an Ubichinonen auf und enthält keine Kohlenwasserstoffe.

Titel

Verfahren zur Gewinnung von Ubichinonen

Anwendungsgebiet der Erfindung

- Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Ubichinonen aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten, die bei der mikrobiellen Gewinnung von Eiweiß auf der Basis von Kohlenwasserstoffen anfallen. Sie ist in die IPK C 12 D - 13/00 einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

- 10 Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakte fallen bei der mikrobiellen Gewinnung von Eiweiß durch Extraktion der Biomasse mit niedrigsiedenden Lösungsmitteln oder Lösungsmittel-Gemischen an. Sie sind durch einen Gehalt von 10 bis 80 % Phosphatiden, 10 bis 80 % Fettsäuren, die vorwiegend in gebundener Form vorliegen, sowie weiteren biogenen Inhaltsstoffen - Sterolen, fettlöslichen Coenzymen und Vitaminen - gekennzeichnet, die im mikrobiell nicht verwerteten Anteil der Kohlenwasserstoff-Fraktion gelöst sind.
- 15
- 20 Von den biogenen Inhaltsstoffen sind die Ubichinone (Coenzym Q) von besonderem Interesse. Für Ubichinone, die coenzymatische Aktivität im Elektronentransportsystem der Atmungskette aufweisen, wurden zahlreiche pharmakologische Wirkungen gefunden. So wurden beispielsweise bemerkenswerte Effekte auf das Kongestions-Herzversagen,
- 25

die Coronarinsuffizienz, die durch Fehlernährung verursachte Muskeldystrophie und Anämien nachgewiesen.

Verfahren zur Gewinnung von Ubichinonen aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten sind bekannt. So ist in der SU-PS 401.180 ein Verfahren beschrieben, das die gleichzeitige Gewinnung von Biomasse und Ubichinonen zum Ziel hat. Der durch Extraktion isolierte Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt wird in Gegenwart von Pyrogallol verseift und aus der unverseifbaren Fraktion die Ubichinone säulenchromatographisch unter Verwendung von Al_2O_3 abgetrennt. In der DD-PS 115.899 wird über ein Verfahren zur gleichzeitigen Gewinnung von Ergosterol und Ubichinon-45 aus Lipidfraktionen mikrobieller Herkunft berichtet. Aus der Lipidfraktion werden nach einer alkalisch-ethanolischen Verseifung in Gegenwart eines Reduktionsmittels die unverseifbaren Bestandteile isoliert und daraus durch Kühlung Ergosterol sowie chromatographisch an Al_2O_3 Ubichinon-45 abgetrennt. Werden dabei Lipid-Kohlenwasserstoff-Fractionen eingesetzt, bei denen die Kohlenwasserstoffe n-Alkane darstellen, so trennt man die n-Alkane vor der adsorptionschromatographischen Isolierung der Ubichinone durch Ausfrieren ab. In dem beschriebenen Verfahren beträgt der Anteil der n-Alkane lediglich 7,2 %, wobei sich das Spektrum der n-Alkane von C_{11} bis C_{23} erstreckt. Nachteilig erweist sich bei den in SU-PS 401.180 und DD-PS 115.899 beschriebenen Verfahren, daß der überwiegende Teil der Lipide einem Stoffwandlungsprozeß unterworfen wird.

Die angeführten Verfahren weisen weitere wesentliche Nachteile auf, wenn der Gehalt an Kohlenwasserstoffen 10 % beträgt und sich die Kohlenwasserstoffe gleichzeitig aus ggf. sehr unterschiedlichen Kohlenwasserstoff-Typen, z. B. der Siedelage 240 bis 380°C, zusammensetzen.

Die Kohlenwasserstoffe, die dann einen Hauptbestandteil der Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakte darstellen, werden erst im letzten Verfahrensschritt abgetrennt und mindern entscheidend die Effektivität der vorgestellten Verfahren.

5 Vereeifung, Extraktion der Seifenlösung sowie die Isolierung des Ubichinons aus dem Unverseifbaren erfordern durch die Anwesenheit der Kohlenwasserstoffe einen wesentlich höheren Aufwand an Chemikalien, Arbeitszeit und Energie als üblicherweise für eine Isolierung der Ubichinone aus

10 Lipidfraktionen notwendig ist.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren, das die Gewinnung von Ubichinonen aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten, die durch Extraktion von mikrobiell erzeugter Biomasse auf

15 Kohlenwasserstoff-Basis mit unpolaren oder Kombinationen aus polaren und unpolaren Lösungsmitteln erhalten wurden, kostengünstig bei minimalem Hilfestoffverbrauch und Arbeitsaufwand ermöglicht.

Darstellung des Wesens der Erfindung

20 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Ubichinone aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten unter Nutzung von Unterschieden in Molekülgröße und -struktur anzureichern und gleichzeitig von den Kohlenwasserstoffen abzutrennen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß aus

25 der acetonlöslichen, die Ubichinone enthaltenden Fraktion chromatographisch unter Verwendung von Sephadex LH-20 Ubichinone als definierte Fraktion abgetrennt werden. Im einzelnen wird dabei wie folgt verfahren:

30 Die acetonlösliche lösungsmittelfreie Phase des Lipid-Kohlenwasserstoff-Extraktes wird im doppelten Volumen CHCl_3 gelöst und auf eine Chromatographiesäule, die Sephadex LH-20 als Trennmateriale enthält, gegeben.

Bei der Elution mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ erscheint als zweite Fraktion das gesamte im Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt enthaltene Ubichinon. Die Konzentration der Ubichinone in dieser Fraktion weist gegenüber derjenigen der acetonlöslichen Fraktion den mindestens 10-fachen Wert auf. In der ubichinonhaltigen Fraktion waren dünnschichtchromatographisch keine Kohlenwasserstoffe mehr nachweisbar.

Die Isolierung der Ubichinone kann in bekannter Weise aus dem Unverseifbaren chromatographisch bzw. durch Umkristallisation erfolgen. Alle weiteren in der acetonlöslichen Fraktion des Lipid-Kohlenwasserstoff-Extraktes enthaltenen Inhaltsstoffe werden ohne weitere Auftrennung in der Fraktion 3 eluiert.

Die erfindungsgemäße Verfahrensweise weist eine Reihe von Vorteilen auf. Kohlenwasserstoffe, die einen Hauptbestandteil der Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakte darstellen, werden vor der Aufarbeitung der Ubichinone vollständig abgetrennt. Gleichzeitig werden die Ubichinone weitgehend von den anderen lipophilen Bestandteilen abgetrennt und auf mindestens das 10-fache angereichert. Dadurch wird der Aufwand an Chemikalien, Lösungsmitteln, Energie und Arbeitszeit für die Isolierung der Ubichinone entscheidend gesenkt.

Die als dritte Fraktion isolierte lipophile Fraktion weist im wesentlichen die gleichen Bestandteile wie vor der Abtrennung der Ubichinone auf und kann in bekannter Weise, z. B. in Trennölen oder Flotationshilfsmitteln Verwendung finden.

Das Verfahren gemäß der Erfindung wird durch folgendes Beispiel erläutert:

Ein Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt wurde aus einem Kohlenwasserstoff verwertendem Stamm der Hefe *Lodderomyces elongisporus* H 128 gewonnen, die aus einer Fermentation stammte, bei der die Hefe in Gegenwart eines im Bereich von 240 bis 380°C siedenden, als Kohlenstoffquelle dienenden Erdöldestillats kultiviert wurde.

Die Gewinnung des Lipid-Kohlenwasserstoff-Extraktes erfolgte nach Extraktion des Hefetrockenproduktes mit einem Benzin/Ethanol/Wasser-Gemisch bei 40°C. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels wurde ein Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt folgender Zusammensetzung erhalten:

Kohlenwasserstoffe u.a. unverseifbare			
10	Bestandteile	44	Gew.-%
	Phosphatide	37	"
	freie Fettsäuren und Glyceride	18	"
	Ubichinon-45	0,16	"
	Nichtlipide u.a.	1	"

Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt wird mit der doppelten Menge Aceton 5 Minuten intensiv gerührt. Nach Beruhigung bilden sich 2 Phasen, die obere ubichinonhaltige Phase wird abdekantiert und nach Entfernung des Lösungsmittels wird eine acetonlösliche Fraktion folgender Zusammensetzung erhalten:

Kohlenwasserstoffe u.a. unverseifbare			
20	Bestandteile	65	Gew.-%
	Phosphatide	5,5	"
	freie Fettsäuren und Glyceride	29	"
	Ubichinon-45	0,25	"

Die acetonlösliche Fraktion wird mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2 : 1) im Vol.-Verhältnis 1 : 1 verdünnt. 20 ml dieser Mischung werden auf eine Chromatographiesäule (Durchmesser 8 cm, Höhe 75 cm) mit Sephadex LH-20 gegeben. Die Elution erfolgt mit einem Gemisch $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2 : 1) in folgenden Fraktionen:

30	Vorlauf	880 ml
	Fraktion 1	200 ml
	Fraktion 2	380 ml
	Fraktion 3	1580 ml

In Fraktion 2 ist das gesamte Ubichinon-45 enthalten. Dünnschichtchromatographisch waren in dieser Fraktion keine Kohlenwasserstoffe mehr nachweisbar.

Nach Abdestillieren des Lösungsmittels von Fraktion 2 wird ein Rückstand von 1,08 g erhalten (Ubichinongehalt 2,6 %). Nach Verseifung des Rückstandes mit methanolischer Kalilauge und Extraktion der Seifenlösung mit Benzin wird aus dem Unverseifbaren durch Kristallisation aus Aceton Ubichinon-45 isoliert.

Ausbeute: 18 mg

Die Chromatographiesäule ist nach Elution von Fraktion 3 ohne eine weitere Regenerierung wieder einsatzbereit.

240615 1

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung von Ubichinonen aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten, die durch Extraktionen von mikrobiell auf Kohlenwasserstoff-Basis erzeugter Biomasse erhalten und mit Aceton in eine acetonunlösliche sowie eine acetonlösliche, die Ubichinone enthaltende Fraktion getrennt werden, dadurch gekennzeichnet, daß aus der acetonlöslichen Fraktion die Ubichinone chromatographisch unter Verwendung von Sephadex LH-20 angereichert und gleichzeitig von den Kohlenwasserstoffen abgetrennt werden.
5
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Elutionsmittel Mischungen aus Methanol und Chloroform, vorzugsweise im Vol.-Verhältnis 1 : 2, verwendet werden.
10
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufgabe der acetonlöslichen Fraktion und Isolierung der Ubichinonfraktion mehrfach erfolgen kann, bevor eine Regenerierung der Sephadex LH-20-Säule vorgenommen werden muß.
15
20