



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

209 187

Int.Cl.³ 3(51) C 07 C 46/10
C 07 C 50/06
C 07 C 50/26
C 07 J 9/00
C 12 P 7/66
C 12 P 33/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 07 C/ 2430 787

(22) 08.09.82

(44) 25.04.84

(71) ADW DER DDR, BERLIN, DD

(72) VIER, BARBARA, DIPL.-CHEM.; VOIGT, BEATE, DR. SC. NAT. DIPL.-CHEM.; WORBS, MARTIN, DIPL.-CHEM.; DD;

(73) siehe (72)

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

(54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON ERGOSTEROL UND UBICHINONEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Ergosterol und Ubichinonen aus Lipid-KW-Extrakten mit KW-Anteilen >10%, die bei der mikrobiellen Gewinnung von Eiweiß auf der Basis von KW anfallen. Erfindungsgemäß werden Ergosterol und Ubichinone vor ihrer Isolierung adsorptiv unter Verwendung von Silicagel aus dem Lipid-KW-Extrakt bzw. der acetonlöslichen Fraktion des Lipid-KW-Extraktes angereichert und gleichzeitig von den KW abgetrennt. Die Anreicherung erfolgt bei einem Verhältnis von 1 Gew.-Teil Silicagel zu 2 bis 4 Gew.-Teilen Lipid-KW-Extrakt bzw. acetonlöslicher Fraktion aus einem Kohlenwasserstoff bzw. Kohlenwasserstoffgemisch vorzugsweise der Siedelage 50 bis 160°C.

Titel

Verfahren zur Gewinnung von Ergosterol und Ubichinonen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Ergosterol und Ubichinonen aus Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakten, die bei der mikrobiellen Gewinnung von Eiweiß auf der Basis von Kohlenwasserstoffen (KW) anfallen. Sie ist in die IPK C 07 C einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

10 Lipid-KW-Extrakte fallen bei der mikrobiellen Gewinnung von
Eiweiß durch Extraktion der Biomasse mit niedrigsiedenden
Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen an. Sie sind durch
einen Gehalt von 10 bis 80 % Phosphatiden, 10 bis 80 % Fett-
15 säuren, die vorwiegend in gebundener Form vorliegen, sowie
weiteren biogenen Inhaltsstoffen - Sterolen, fettlöslichen
Coenzymen und Vitaminen - gekennzeichnet, die im mikrobiell
nicht verwerteten Anteil der KW-Fraktion gelöst sind.
Von den biogenen Inhaltsstoffen sind das Ergosterol und die
Ubichinone von besonderem Interesse. Ergosterol kann als
20 Ausgangsprodukt für die Gewinnung von Vitamin D₂ oder Steroid-
hormonen genutzt werden. Ubichinone haben insbesondere als
Coronartherapeutika Bedeutung erlangt.

Verfahren zur Gewinnung von Ergosterol und/oder Ubichinonen aus Lipid-KW-Extrakten sind bekannt. Diese Verfahren sind alle mit Stoffwandlungsprozessen verbunden. In DD-PS 115 899 wird über ein Verfahren zur gleichzeitigen Gewinnung von Ergosterol

- und Ubichinon-45 aus Lipidextrakten mikrobieller Herkunft berichtet. Aus dem Lipidextrakt werden nach einer alkalisch-ethanolischen Verseifung in Gegenwart eines Reduktionsmittels die unverseifbaren Bestandteile isoliert und daraus durch
- 5 Kühlung Ergosterol sowie chromatographisch an Al_2O_3 Ubichinon-45 abgetrennt. Das angeführte Verfahren weist wesentliche Nachteile auf, wenn der Gehalt an KW im Lipidextrakt $> 10 \%$ beträgt und sich die KW gleichzeitig aus ggf. sehr unterschiedlichen KW-Typen, z. B. der Siedelage 240 bis 380 °C
- zusammensetzen. Verseifung, Extraktion der Seifenlösung sowie die Isolierung des Ergosterols und der Ubichinone aus dem Unverseifbaren erfordern durch die Anwesenheit der KW einen wesentlich höheren Aufwand an Chemikalien, Arbeitszeit und Energie als üblicherweise für die Isolierung dieser biologisch
- 5 aktiven Verbindungen aus Lipidfraktionen notwendig ist. Darüber hinaus ist bei KW-Anteilen $> 50 \%$ im Lipidextrakt und Ergosterolkonzentrationen $< 0,5 \%$ die Gewinnung von Ergosterol nur noch mit ungenügenden Ausbeuten oder gar nicht mehr möglich. In DD-PS 151 007 wird deshalb vorgeschlagen, zur Gewinnung des Ergosterols aus dem Unverseifbaren eine adsorptive Anreicherung mittels Silicagel vorzunehmen. Die nach der Desorption des Silicagels gewonnene Lipidfraktion enthält neben dem Ergosterol und anderen Lipiden noch als weitere Hauptkomponente KW, bei denen die Aromaten dominieren. Auf Grund
- 5 der ähnlichen chemischen Strukturen werden diese Aromaten gleichzeitig mit dem Ergosterol bevorzugt am Silicagel adsorbiert (Aromatengehalt der KW-Fraktion $\sim 63 \%$, Aromatengehalt des Erdöldestillats $\sim 30 \%$), so daß für die nachfolgende Reinigung des Ergosterols ein hoher Aufwand erforderlich ist.
- 8 Besonders nachteilig ist ein KW-Gehalt $> 10 \%$ in der Lipidfraktion für die Isolierung des Ubichinons aus dem Unverseifbaren. Eine Trennung des Ubichinons von den KW kann lediglich adsorptionschromatographisch erfolgen. Die dafür benötigten Mengen an Adsorptionsmaterialien und Lösungsmitteln sowie der
- 5 zeitliche Aufwand für die Elution sind außerordentlich hoch.

In DD-PS 154 448 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem ein Teil der KW destillativ entfernt wird. Nach einer 2-stufigen Dünnschichtdestillation einer acetonlöslichen Fraktion, die 63 % KW enthält, wird dabei ein Sumpfprodukt erhalten, das
5 noch ~ 30 % KW aufweist und bei der weiteren Aufarbeitung ebenfalls noch einen wesentlich höheren Aufwand erfordert im Vergleich zur Gewinnung aus einem KW-freien Lipidextrakt.

Ziel der Erfindung

10 Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zu entwickeln, das die einfache und kostengünstige Gewinnung von Ergosterol und Ubichinonen aus Lipid-KW-Extrakten mit KW-Anteilen > 10 % ermöglicht.

Darstellung des Wesens der Erfindung

15 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Ergosterol und Ubichinone aus Lipid-KW-Extrakten unter Nutzung von Unterschieden in der Haftfestigkeit an Adsorbentien anzureichern und gleichzeitig von den KW abzutrennen, bevor die Isolierung der biologisch aktiven Verbindungen vorgenommen wird. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß aus dem Lipid-KW-
20 Extrakt oder der acetonlöslichen Fraktion des Lipid-KW-Extraktes adsorptionschromatographisch an Silicagel Ergosterol und Ubichinone angereichert und von den KW weitgehend getrennt werden.

Im einzelnen wird dabei wie folgt verfahren: Der Lipid-KW-
25 Extrakt oder die acetonlösliche Fraktion des Lipid-KW-Extraktes werden im 3-fachen Volumen eines KW bzw. eines KW-Gemisches vorzugsweise der Siedelage 50 bis 160 °C gelöst und mit Silicagel behandelt. Das Verhältnis von Silicagel zu Lipid-KW-Extrakt beträgt dabei 1 Gew.-Teil zu 2 bis 4 Gew.-Teilen.
30 Nach Dekantieren wird das Silicagel nochmals mit dem gleichen Lösungsmittel gewaschen. Die vereinigten Fraktionen weisen nach Abdestillieren des Lösungsmittels eine gegenüber dem Ausgangsprodukt nur unwesentlich veränderte Zusammensetzung auf. Die Desorption der am Silicagel adsorbierten Verbin-

dungen erfolgt mit einem polaren Lösungsmittelgemisch, beispielsweise einem Gemisch aus Hexan/Methanol (60 : 40) oder Hexan/Ethanol/Wasser (60 : 20 : 20). Der Rückstand enthält Ergosterol und Ubichinone in mindestens 5-facher Konzentration im Vergleich zum Einsatzprodukt und ist weitgehend frei von KW. Die Gewinnung des Ergosterols und der Ubichinone kann aus der KW-freien Fraktion in bekannter Weise durch Kristallisation oder Adsorptionschromatographie erfolgen. Das Silicagel kann nach der Regenerierung erneut eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren weist eine Reihe von Vorteilen auf. Ergosterol und Ubichinone werden von den KW, die einen Hauptbestandteil der Lipid-KW-Extrakte darstellen, und weitgehend von den anderen lipophilen Bestandteilen abgetrennt sowie auf mindestens das 5-fache angereichert. Dadurch wird der Aufwand an Chemikalien, Lösungsmitteln, Energie und Arbeitszeit für die Isolierung und Reinigung des Ergosterols und der Ubichinone entscheidend gesenkt. Darüber hinaus ist es möglich, Ergosterol auch aus solchen Lipid-KW-Extrakten zu gewinnen, die Ergosterolgehalte $< 0,5\%$ bei gleichzeitig hohem KW-Anteil aufweisen.

Der nach der adsorptiven Entfernung des Ergosterols und der Ubichinone zurückbleibende Lipid-KW-Extrakt bzw. die acet unlösliche Fraktion wird keinem Stoffwandlungsprozeß unterworfen und enthält im wesentlichen die gleichen Bestandteile wie vor der Abtrennung der biologisch aktiven Verbindungen und kann in bekannter Weise, z. B. in Trennölen oder Flotationshilfsmitteln Verwendung finden.

Das Verfahren gemäß der Erfindung wird durch folgende Beispiele erläutert:

Ein Lipid-Kohlenwasserstoff-Extrakt wurde aus einem Kohlenwasserstoffverwertenden Stamm der Hefe *Lodderomyces elongisporus* gewonnen. Die Hefe wurde in Gegenwart eines im Bereich von 240 bis 380 °C siedenden, als Kohlenstoffquelle dienenden Erdöldestillats in kontinuierlicher Fermentation kultiviert.

- 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.	35	Gew.-%
	unverseifbare Bestandteile		
	Phosphatide	29	Gew.-%
	freie Fettsäuren und Glyceride	34	Gew.-%
10	Ubichinon-45	0,24	Gew.-%
	Ergosterol	0,8	Gew.-% 1)
	Nichtlipide	1,0	Gew.-%

1) Ergosterolester < 10 %

Beispiel 1

- 15 30 g Extrakt werden mit 100 ml Hexan versetzt und nach Zugabe von 15 g Silicagel (Korngröße 32 bis 100 μ) 10 Minuten geschüttelt. Es wird dekantiert und noch 3mal mit 50 ml Hexan jeweils 5 Minuten geschüttelt. Die Hexanfraktionen werden vereinigt und eingeeengt.
- 20 Die Hexanfraktion ähnelt in ihrer Zusammensetzung dem Ausgangsprodukt. Zur Desorption wird das Silicagel zunächst 10 Minuten und anschließend 5 Minuten jeweils mit 100 ml Hexan/Ethanol/Wasser (60 : 20 : 20) geschüttelt.
- 25 Die Fraktionen werden vereinigt, die wäßrige Phase abgetrennt und die organische Phase nach dem Trocknen über Natriumsulfat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Ausbeute: 3,2 g
- Die angereicherte Fraktion weist folgende Zusammensetzung auf:

	Ergosterol	4,91	Gew.-%
	Ubichinon	1,25	Gew.-%
30	Kohlenwasserstoffe	2,4	Gew.-%
	Phosphatide	2,20	Gew.-%
	weitere Lipide	>85,0	Gew.-%
	(Glyceride, Fettsäuren)		

Nach Verseifung der angereicherten Fraktion wird aus dem Unverseifbaren das Ergosterol durch Kristallisation gewonnen und das Ubichinon durch Säulenchromatographie an Silicagel isoliert.

5 Ausbeute: Ergosterol 117 mg
Ubichinon 34 mg

Beispiel 2

Das im Beispiel 1 nach Hexanbehandlung erhaltene Silicagel wird zur Desorption sämtlicher Stoffe 2mal mit 100 ml Hexan/
0 Methanol (60 : 40) versetzt und geschüttelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 4,0 g

Die angereicherte Fraktion setzt sich wie folgt zusammen:

Ergosterol: 4,4 Gew.-%
5 Ubichinon: 1,4 Gew.-%
Kohlenwasserstoffe: 3,5 Gew.-%
Phosphatide: 5,3 Gew.-%
weitere Lipide: >85 Gew.-%
(Glyceride, Fettsäuren)

0 Aus der angereicherten Fraktion wird das Ergosterol direkt durch Kristallisation gewonnen. Das Ubichinon wird nach Verseifung und Säulenchromatographie des Unverseifbaren isoliert.

Ausbeute: Ergosterol 115 mg
Ubichinon 48 mg

6 Beispiel 3

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

	Kohlenwasserstoffe u. a. unverseifbare Bestandteile	52	Gew.-%
	Phosphatide	4,0	Gew.-%
	freie Fettsäuren und Glyceride	42	Gew.-%
5	Ergosterol	1,23	Gew.-%
	Ubichinon	0,29	Gew.-%

Die acet unlösliche Fraktion wird weiterbehandelt wie es im Beispiel 1 für Extrakt beschrieben wurde.

Ausbeute: 3,15 g

- 10 Die erhaltene angereicherte Fraktion hat folgende Zusammensetzung:

	Ergosterol	6,22	Gew.-%
	Ubichinon	1,29	Gew.-%
	Kohlenwasserstoffe	3,40	Gew.-%
15	Phosphatide	2,50	Gew.-%
	weitere Lipide	> 85	Gew.-%

Aus der angereicherten Fraktion wird Ubichinon und Ergosterol isoliert, wie es im Beispiel 1 beschrieben wurde.

Ausbeute: Ergosterol 147 mg

20 Ubichinon 35 mg

Das Silicagel kommt nach Regenerierung wieder zum Einsatz.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung von Ergosterol und Ubichinonen aus Lipid-KW-Extrakten, die durch Extraktion von mikrobiell auf KW-Basis erzeugten Biomassen erhalten wurden, dadurch gekennzeichnet, daß aus dem Lipid-KW-Extrakt oder der acetonlöslichen Fraktion des Lipid-KW-Extraktes Ergosterol und Ubichinone adsorptiv unter Verwendung von Silicagel angereichert und gleichzeitig von den Kohlenwasserstoffen abgetrennt werden.
2. Verfahren nach Pkt. 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Anreicherung von Ergosterol und Ubichinonen bei einem Verhältnis von 1 Gew.-Teil Silicagel zu 2 bis 4 Gew.-Teilen Lipid-KW-Extrakt bzw. acetonlöslicher Fraktion erfolgt.
3. Verfahren nach Pkt. 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß Silicagel der Korngröße 30 bis 500 μ , vorzugsweise 30 bis 100 μ , verwendet wird.
4. Verfahren nach Pkt. 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Adsorption am Silicagel aus einem KW bzw. einem KW-Gemisch vorzugsweise der Siedelage 50 bis 160 °C erfolgt.