



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **276 875 A1**

5(51) C 07 J 9/00
C 12 P 33/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 07 J / 302 518 8 (22) 07.05.87 (44) 14.03.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Patentabteilung, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Sieron, Reinhard, Dipl.-Chem.; Forberg, Wolfgang, Dr. rer. nat.; Birke, Michael, Dipl.-Pharm.; Ose, Dieter;
Mühlig, Peter, Dipl.-Phys., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Steroidsuspensionen

(55) mikrobielle Transformation, Steroidsuspension, Zusatzstoffe, Tonminerale, Bentonit, Dispergierung
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von stabilen, hochdispersen, hitzesterilisierbaren Suspensionen aus Steroiden bzw. Steroidgemischen mit einem Gehalt $\leq 90\%$ für die mikrobielle Transformation durch Zusatz eines pulverisierten, porösen, wasserunlöslichen Feststoffs mit Adsorptionseigenschaften, vorzugsweise eines Tonminerals wie Bentonit, und nachfolgende Dispergierung des Gemisches. Es werden dadurch für den Fermentationsprozeß sehr gut handhabbare Präparationen erhalten, die in einen lagerfähigen Zustand versetzt werden können und die mikrobiologische Transformationen mit hohen Ausbeuten gewährleisten.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Steroidsuspensionen für die mikrobiologische Transformation, **gekennzeichnet durch** den Zusatz eines pulverisierten, porösen, wasserunlöslichen Feststoffs mit Adsorptionseigenschaften zum Steroidsubstrat und nachfolgende Dispergierung des Gemisches, wobei die erhaltene Suspension sofort oder zur Herstellung lagerfähiger, resuspendierbarer, pulveriger Produkte durch Abtrennung der Feststoffe von der wäßrigen Phase und anschließende Trocknung des Feuchtprodukts eingesetzt werden kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** Verwendung eines silikatischen Feststoffs als Zusatzstoff, vorzugsweise eines Bentonits.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet durch** Zusatz der 0,2- bis 2fachen Menge an Feststoff bezogen auf die Steroidsubstratmenge, vorzugsweise im Verhältnis von 1:1.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet durch** den Einsatz von Sterolen als Steroidsubstrat, vorzugsweise von β -Sitosterol oder Cholesterol.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **gekennzeichnet durch** den Einsatz von Sterolgemischen als Steroidsubstrat, vorzugsweise von β -Sitosterol-Campesterol-Stigmasterol-Gemischen.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, **gekennzeichnet durch** Verwendung von Sterolen oder Sterolgemischen mit einem Gesamtsterolgehalt $\geq 50\%$ als Steroidsubstrat, vorzugsweise mit einem Gesamtsterolgehalt von 70% bis 90%.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von hochdispersen Suspensionen wasserunlöslicher Steroide bzw. Steroidgemische, vorzugsweise Sterole. Die Erfindung ist damit für die Biotechnologie, insbesondere für die mikrobielle Transformation zur Gewinnung von Steroidwirkstoffen bzw. von Zwischenprodukten zur Herstellung von Wirkstoffen von Bedeutung.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß die Ausbeuten von mikrobiologischen Steroidtransformationsverfahren entscheidend durch die Feinverteilung des Substrats in der Fermentationslösung verbessert wird. Zur Herstellung solcher Suspensionen werden folgende Verfahren verwendet:

Die Eintragung des in organischen Lösungsmitteln gelösten Steroids in eine wäßrige Phase, wobei das Lösungsmittel Alkohole, Ketone (Herzog, H. L., C. C. Payne, M. T. Hughes, N. J. Gentles, E. B. Hershberg, A. Nobile, W. Charney, C. Federbush, D. Sutter, P. L. Perlman: Microbiological transformation of steroids - X. 1-Dehydroanalogs of cortical steroids; Tetrahedron 18, 581-589, [1962]), aliphatische Säureamide bzw. deren N-Ethyllderivate (Dulaney, E. L., E. O. Stapley: Studies on the transformation of 11-Deoxy-17-hydroxycorticosterone to Hydrocortisone with a strain of *Curvularia lunata*; Appl. Microbiology 7, 276-284, [1959]) verwendet werden, führt zwar zu hochdispersen Verteilungen, hat aber den Nachteil, daß aufgrund der Toxizität des in wäßriger Phase verbleibenden Lösungsmittels gegenüber dem Mikroorganismus nur relativ wenige Substratkonzentrationen erreichbar sind.

Hohe Substratkonzentrationen sind erzielbar, wenn das Steroidsubstrat in einem organischen, aus wäßriger Phase abdestillierbaren Lösungsmittel aufgenommen und die Lösung bei gleichzeitigem Abdestillieren des Lösungsmittels in eine wäßrige Phase eingedüst wird. (US-Pat. 4 124 607) Nachteilig wirkt sich hierbei die geringe Lagerbeständigkeit aus. Zudem fördert der zur Stabilisierung der Suspension notwendige Zusatz von Tensiden die Schaumbildung. Darüber hinaus sind nur Steroidsubstrate mit einem Steroidgehalt $\geq 50\%$ einsetzbar, da sonst stark aggregierte Suspensionen mit Flotationsneigung erhalten werden.

Ähnliche Substratkonzentrationen werden bei der Herstellung von Steroidsuspensionen durch Naßvermahlung des Substrats in Kugelmühlern (Harold, E. A., H. E. Kenney, M. E. Wall: Effect of concentration on the microbiological hydroxylation of Progesterone; Appl. Microbiology 8, 345-348 [1960]), oder durch Mikronisierung (US-Pat. 3 201 324) erreicht. Auch diese Suspensionen weisen eine geringe Lagerbeständigkeit auf, zeigen aufgrund der Tensidzusätze eine erhöhtes Schäumungsverhalten und sind nur aus Substraten mit einem Steroidgehalt $\geq 90\%$ herstellbar, da sonst eine Vermahlung bzw. Mikronisierung nur schwer oder nicht durchführbar ist.

Durch Versprühen von in einem organischen Lösungsmittel gelösten Steroiden in einem Heißluftstrom werden zwar hochfeine Pulver mit guter Lagerbeständigkeit und guter Suspendierbarkeit erhalten (DD 232 166), jedoch wirken sich auch hier die zur Suspendierung notwendigen hohen Tensidzusätze negativ auf das Schaumverhalten aus. Besonders bei diesem Verfahren werden hochreine Steroidsubstrate benötigt, da sonst die Suspendierbarkeit des hochdispersen Pulvers nicht gewährleistet ist.

Insbesondere bei Sterolsubstraten mit einem Gehalt von 80%, welche aus Abprodukten der Verarbeitung von tierischen bzw. pflanzlichen Fetten und Ölen hergestellt werden, treten bei Suspensionen, die nach den bisher beschriebenen Verfahren hergestellt werden, während der Hitzesterilisation starke Aggregationerscheinungen und Entmischungseffekte in der Fermentationslösung auf, wodurch eine mikrobiologische Transformation unmöglich wird.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Gewinnung von stabilen, hitzesterilisierbaren, hochdispersen Steroidsuspensionen mit geringem Schaumverhalten aus Substraten mit Steroidgehalten $\leq 90\%$, insbesondere für die mikrobiologische Transformation.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, unter Verwendung von leicht verfügbaren, ökonomisch günstigen Hilfsstoffen ein technologisch einfaches Verfahren zu entwickeln, welches unter Vermeidung der Nachteile der bekannten technischen Lösungen die Herstellung von stabilen, hitzesterilisierbaren, hochdispersen Suspensionen aus Substraten mit Steroidgehalten $\leq 90\%$ gestattet, welche für mikrobiologische Transformationen verwendbar sind und hohe Ausbeuten ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch den Zusatz eines pulverisierten, porösen, wasserunlöslichen Feststoffs mit Adsorptionseigenschaften zum Steroidsubstrat und nachfolgender Dispergierung des Gemisches, wobei die erhaltenen Suspensionen sofort oder zur Herstellung lagerfähiger, resuspendierbarer, pulveriger Produkte durch Abtrennung des Feststoffanteils von der wäßrigen Phase und anschließende Trocknung des Feuchtprodukts eingesetzt werden können, indem als Zusatzstoff ein silikatisches Material, vorzugsweise ein Bentonit Verwendung findet, dessen Zusatz dem 0,2- bis 2fachen der Steroidsubstratmenge, vorzugsweise dem Verhältnis 1:1 entspricht und als Steroidsubstrat Sterole, vorzugsweise β -Sitosterol oder Cholesterol, oder Sterolgemische, vorzugsweise β -Sitosterol-Campersterol-Stigmasterol-Gemische verwendet werden, deren Gesamtsterolgehalt $\geq 50\%$, vorzugsweise 70% bis 90% beträgt.

Zur Dispergierung werden das Steroidsubstrat in einer Konzentration von 200 g/l bis 400 g/l und der Feststoff in einer Konzentration von 500 g/l bis 1000 g/l getrennt in Wasser suspendiert, anschließend gemischt und nachfolgend durch Naßvermahlung oder Mikronisierung, vorzugsweise durch Naßvermahlung in einer Kolloidmühle, homogenisiert. Derartige Suspensionen werden auch erzielt, indem zunächst das Steroidsubstrat in einem aus wäßriger Phase abdestillierbaren organischen Lösungsmittel, vorzugsweise einem Chlorkohlenwasserstoff wie Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff bzw. Trichlorethylen oder einem Keton wie Azeton, in einer Konzentration von 100 g/l bis 500 g/l aufgenommen und daneben die entsprechende Menge Feststoff in einer Wassermenge von 10 l/kg bis 20 l/kg Steroidsubstrat suspendiert wird. Danach wird die Suspension auf Siedetemperatur des Lösungsmittels der Steroidlösung erhitzt und unter Rühren die Steroidlösung bei gleichzeitigem Abdestillieren des Lösungsmittels eingedüst.

Die Herstellung lagerfähiger, resuspendierbarer Produkte aus der Suspension erfolgt problemlos durch Abtrennung der wäßrigen Phase mittels Separation oder Filtration und schonender Trocknung des anfallenden feuchten Feststoffs. Es sind nach diesem Verfahren, bei dem erstmals ein Feststoff als Dispergierhilfsmittel zur Steroidsubstratpräparation eingesetzt wird, Suspensionen aus Substraten mit geringeren Steroidgehalten herstellbar, welche auch nach Hitzesterilisation eine hochdisperse Feinverteilung aufweisen. Zudem sind solche Präparationen, im Gegensatz zu tensidhaltigen Suspensionen, gut handhabbar, da sie keine Schaumbildung verursachen. Darüber hinaus beeinträchtigt das Dispergierhilfsmittel das Wachstum des Mikroorganismus nicht.

Ausführungsbeispiele

1. 2 kg Rohsterolgemisch aus Abprodukten der Ölgewinnung mit einem Gehalt von 80% werden in 6 l Wasser eingequollen und grob homogenisiert. Daneben werden 2 kg Bentonit, natriumaktiviert, in 4 l Wasser suspendiert. Anschließend werden beide Suspensionen miteinander vermischt und in einer Kolloidmühle bei feiner Einstellung homogenisiert. Es werden 14,7 kg einer Sterol-Bentonit-Präparation erhalten.
2. 2 kg Rohsterolgemisch aus Abprodukten der Ölgewinnung mit einem Gehalt von 50% werden in 20 l Trichlorethylen gelöst. 4 kg Bentonit, natriumaktiviert, werden in 4 l Wasser eingequollen und in einer Kolloidmühle homogenisiert. Anschließend wird die Suspension mit Wasser auf 40 l aufgefüllt, unter Einleiten von Direktampf auf 90–95°C erhitzt, die Sterollösung unter Rühren in die wäßrige Suspension eingedüst und gleichzeitig das Lösungsmittel über Kopf abdestilliert. Danach wird die Suspension zur restlosen Entfernung des Lösungsmittels noch eine Stunde bei dieser Temperatur belüftet und gerührt. Nach Abkühlung wird die Suspension separiert und das Feuchtprodukt schonend in einem Wirbelschichttrockner getrocknet. Es werden 5,8 kg eines pulverigen, gut suspendierbaren Produkts erhalten.
3. 1 kg β -Sitosterol mit einem Gehalt von 90% wird in 3 l Wasser eingequollen und grob homogenisiert. Daneben werden 0,2 kg Bentonit, natriumaktiviert, in 0,2 l Wasser suspendiert. Anschließend werden beide Suspensionen miteinander vermischt und in einer Kolloidmühle bei feiner Einstellung homogenisiert. Es werden 4,5 l einer Sterol-Bentonit-Präparation erhalten.
4. 20 g Cholesterol mit einem Gehalt von 90% werden in 0,2 l Azeton gelöst. 20 g Bentonit, natriumaktiviert, werden in 300 ml Wasser suspendiert und homogenisiert. Anschließend wird die Suspension auf 90°C erhitzt. Unter Rühren wird die azetonische Sterollösung in die wäßrige Suspension eingedüst und gleichzeitig das Azeton über Kopf abdestilliert. Danach wird die Suspension zur restlosen Entfernung des Lösungsmittels noch eine Stunde bei dieser Temperatur belüftet und gerührt. Nach Abkühlung wird die Suspension auf 200 ml aufgefüllt. Es wird eine Sterol-Bentonit-Präparation mit einer Konzentration von 100 g/l erhalten.