(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4603220号
(P4603220)
(45)発行日　平成22年12月22日(2010.12.22)　(24)登録日　平成22年10月8日(2010.10.8)

(51)Int.Cl.　F I
C12P 33/20 (2006.01)　C12P 33/20

請求項の数 5　(全 4 頁)

(21)出願番号	特願2001-500795 (P2001-500795)	(73)特許権者	397068654
(86)(22)出願日	平成12年5月29日 (2000.5.29)		インデナ・ソチエタ・ペル・アチオニ
(65)公表番号	特表2003-501044 (P2003-501044A)		イタリア・ミラノ・ビアレオルトレス１２
(43)公表日	平成15年1月14日 (2003.1.14)	(74)代理人	100078662
(86)国際出願番号	PCT/EP2000/004873		弁理士　津国　肇
(87)国際公開番号	WO2000/073483	(74)代理人	100075225
(87)国際公開日	平成12年12月7日 (2000.12.7)		弁理士　篠田　文雄
審査請求日	平成19年5月17日 (2007.5.17)	(72)発明者	ポンツォーネ，セサーレ
(31)優先権主張番号	MI99A001222		イタリア国、イ－２０１３９　ミラノ、ヴィアレ・オルトレス　１２
(32)優先日	平成11年6月1日 (1999.6.1)	(72)発明者	デ・ロサ，マリオ
(33)優先権主張国	イタリア(IT)		イタリア国、イ－８０１３１　ナポリ、ヴィア・エ・ニコラーディ　１８８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】酵素的加水分解によるＲｕｓｃｕｓ　ａｃｕｌｅａｔｕｓステロイド配糖体の誘導体の製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒから抽出された加水分解酵素に基づく粗製酵素調製物による、ラシン、デスグルコラシンおよびラスコシドからなる群より選ばれるラスコサポニンの酵素的部分加水分解工程を含み、該酵素調製物が同時にβ－グルコピラノシダーゼおよびα－ラムノピラノシダーゼ活性を有し、かつ、β－グルコシド残基、続いて、α－ラムノシド残基を逐次的に除去することを特徴とする、デスグルコデスラムノラシンの製造方法。

【請求項２】

加水分解を、水溶液中ｐＨ５で、または、３０容量％までのエタノールを含む水－エタノール混合物中で行う、請求項１記載の方法。

【請求項３】

ラスコサポニンの濃度が、５～４０％（ｗ/ｖ）の範囲にある、請求項１または２に記載の方法。

【請求項４】

加水分解を、２０～４０℃の温度で３～７日間行う、請求項１ないし３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】

最終生成物を、遠心分離およびメタノール洗浄によって回収する、請求項１ないし４のいずれか１項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【０００１】
本発明は、Ｒｕｓｃｕｓ　ａｃｕｌｅａｔｕｓステロイド配糖体（ラスコサポニン（ｒｕｓｃｏｓａｐｏｎｉｎ））の誘導体の製造方法に関する。
【０００２】
より詳細には、本発明は、ラシン（ｒｕｓｃｉｎ）、デスグルコラシン（ｄｅｓｇｌｕｃｏｒｕｓｃｉｎ）またはラスコシド（ｒｕｓｃｏｓｉｄｅ）の部分的な酵素的加水分解によるデスグルコデスラムノラシン（ｄｅｓｇｌｕｃｏｄｅｓｒｈａｍｎｏｒｕｓｃｉｎ）の製造方法に関する。
【０００３】
Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒから抽出された加水分解酵素に基く粗製酵素調製物を使用して、本発明による酵素的加水分解を行う。上記調製物は市販されており、ワイン業界および食物産業で使用されている。Ｇｉｓｔ　ＢｒｏｃａｄｅｓからＣｙｔｏｌａｓｅ　ＰＣＬ５の商標で市販されている調製物を使用することが特に好ましい。
【０００４】
上記酵素調製物は、同時にβ－グルコピラノシダーゼ活性およびα－ラムノピラノシダーゼ活性を有し、従って、β－グルコシド残基の逐次的除去に続いて、α－ラムノシド残基を除去することにより所望の生成物をもたらす。
【０００５】
酵素的加水分解は、ｐＨ５に緩衝化された水溶液中または約３０容量％までのエタノールを含む水中で行う。実際には、エタノールの存在は、酵素活性に悪影響を及ぼさないことが確認されており、β－グルコピラノシダーゼ活性はエタノールの存在下で増大し、その一方で、α－ラムノピラノシダーゼ活性は僅かに低下するが、それでも、本発明の反応に影響を及ぼさない程度までである。デスグルコラシンを完全に溶解するためには、約３０％（ｖ/ｖ）のエタノールのパーセンテージが必要であるが、ラスコシドの場合、約１７％（ｖ/ｖ）という、より低いパーセンテージが必要である。従って、後者は特別な前処理を必要とせず、且つその界面活性特性により、酵素的加水分解の第１の工程の結果生じるデスグルコラシンを可溶化し、次いで、より効率よくα－ラムノピラノシダーゼに転換することができるために、後者の使用が好ましい場合もある。
【０００６】
ラスコサポニンの濃度は、約５～約４０％（ｗ/ｖ）の範囲であってもよく、加水分解は、２０～５０℃の範囲の温度で、３～７日の範囲の期間、行う。
【０００７】
生物学的変換工程の終わりに、反応系に溶解しない、最終的なデスグルコデスラムノラシン生成物は、遠心分離およびその後のメタノール洗浄によって容易に回収することができる。さらに、本発明の方法は、使用する酵素の安定性のおかげで、一定の時間に加水分解生成物を除去し、新たな基質を連続的に加えることにより、連続的に実施することができる。この目的のためには、インヒビターおよび変性分子の蓄積を避けるために、限外濾過膜を備えたバイオリアクターを使用することが好ましい。
【０００８】
以下の実施例は、本発明をさらに詳細に説明するものである。
【０００９】
実施例
変性剤およびインヒビターを除去するために、ＸＭ膜（カットオフ５０ｋＤａ）を備えたＡｍｉｃｏｎ装置で、酵素調製品Ｃｙｔｏｌａｓｅ　ＰＣＬ５（Ｇｉｓｔ　Ｂｒｏｃａｄｅｓ）を、使用前に、０．１Ｍクエン酸－リン酸緩衝液、ｐＨ５に対してダイアフィルトレーションした。
【００１０】
以下の順序で加えることにより、インキュベーション混合物を調製した：基質（デスグルコラシンまたはラスコシド）、０．１Ｍクエン酸－リン酸緩衝液　ｐＨ５．０、Ｃｙｔｏ

ｌａｓｅ　ＰＣＬ５、およびゆっくり、攪拌しながら、エタノール。基質濃度は、５％（ｗ/ｖ）から４０％（ｗ/ｖ）まで変化させ、エタノール濃度は０％（ｖ/ｗ）から３０％（ｖ/ｗ）まで変化させた。反応に続いて、溶離剤として酢酸エチル/メタノール/水　１００：１５：１０を使用して、シリカゲルプレート（６０　Ｆ２５０　Ｍｅｒｃｋ）を用いたＴＬＣを実施した。酵素調製品の活性化は、インキュベーション混合物１ml当たりβ－グルコピラノシダーゼ３８単位およびα－ラムノピラノシダーゼ２．３単位であった。

【００１１】

生物学的変換を２５℃の温度で実施した。デスグルコデスラムノラシンへの転換は、デスグルコラシンから出発して約７２時間で完了し、ラスコシドから出発して約９６時間で完了した。

【００１２】

次いで、インキュベーション混合物を、４℃にて３０分間、１２，１００ｇで遠心分離した。沈澱物をメタノールで洗浄し、上記と同様の条件で、再度遠心分離した。この工程を５回繰り返し、上清をプールした。次いでメタノール溶液を真空下で蒸発させ、生じた生成物を磨砕して、デスグルコデスラムノラシン２０％を含む暗黄色の微粉末を得た（ＨＰＬＣアッセイ）。

フロントページの続き

(72)発明者　モラナ，アレッサンドラ
イタリア国、イ－８０１３１　ナポリ、ヴィア・エッフェ・ネッティ　５５
(72)発明者　ディ・ラッツァロ，アントネッラ
イタリア国、イ－８００５５　ポルティツィ、ヴィア・リベルタ　２１８／ビス

審査官　福間　信子

(56)参考文献　英国特許第０１３８０２５３（ＧＢ，Ｂ）
PEREPELITSA E D, PRIKLADNAYA BIOKHIMIYA I MIKROBIOLOGIYA, 1975, Vol.11 No.6, P.901-905

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12P 1/00-41/00
CA/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)