(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 30 711 T2** 2007.09.20

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 180 161 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 30 711.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/04873**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 935 137.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/073483**
(86) PCT-Anmeldetag: **29.05.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **07.12.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.02.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **13.09.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.09.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12P 33/00*** (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
MI991222 01.06.1999 IT

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Indena S.p.A., Mailand/Milano, IT

(74) Vertreter:
PFENNING MEINIG & PARTNER GbR, 80339 München

(72) Erfinder:
PONZONE, Cesare, I-20139 Milano, IT; DE ROSA, Mario, I-80131 Napoli, IT; MORANA, Alessandra, I-80131 Napoli, IT; DI LAZZARO, Antonella, I-80055 Portici, IT

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON STEROID-GLYCOSIDERIVAN AUS RUSCUS ACULEATUS DURCH ENZYMATISCHE HYDROLYSE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Derivaten von Ruscus aculeatus Steroidglycosiden (Ruscosaponin).

[0002] Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Desglucodesrhamnoruscin durch enzymatische Teilhydrolyse von Ruscin, Desglucoruscin oder Ruscosid.

[0003] In DE2202393 wird Desglucodesrhamnoruscin aus Desglucoruscin durch Erhitzen in Essigsäure erhalten.

[0004] Perepelitsa et al. (1975) PRIKLADNAYA BIOKHIMIYA I MIKROBIOLOGIYA, 11, 901–905, verwenden Hydrolasen von A. niger, um Dioscin und Trillin und Protodioscin durch Spaltung von Glucose-Rhamnose-Bindungen zu erhalten.

[0005] Die erfindungsgemäße enzymatische Hydrolyse wird mit Hilfe von rohen Enzymzubereitungen, die auf Hydrolasen basieren, welche aus Aspergillus niger extrahiert wurden, ausgeführt. Die Zubereitungen sind kommerziell erhältlich und werden in der Wein- und Ernährungsindustrie verwendet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung der von Gist Brocades unter der Handelsmarke Cytolase PCL5 erhältlichen Zubereitung.

[0006] Die Enzymzubereitungen haben gleichzeitig β-Glucopyranosidase- und α-Rhamnopyranosidase-Aktivitäten und stellen deshalb die aufeinander folgende Entfernung des β-Glucosidrests, gefolgt von Entfernung des α-Rhamnosidrests zu dem gewünschten Produkt bereit.

[0007] Die enzymatische Hydrolyse wird in wässriger Lösung, gepuffert auf pH 5, oder in Wasser, das bis zu etwa 30 Volumenprozent Ethanol enthält, ausgeführt. Es wurde beobachtet, dass in der Praxis das Vorliegen von Ethanol die enzymatische Aktivität nicht negativ beeinflusst: die β-Glucopyranosidase-Aktivität erhöht sich in Gegenwart von Ethanol; wohingegen andererseits die α-Rhamnopyranosidase-Aktivität leicht sinkt, jedoch bis zu einem Grad, der in keiner Weise die Reaktion der Erfindung beeinflusst. Ein Prozentsatz von etwa 30% Volumen/Volumen Ethanol ist für die vollständige Solubilisierung von Desglucoruscin notwendig; wohingegen niedrigere Prozentsätze von etwa 17% Volumen/Volumen für das Ruscosid erforderlich sind. Die Verwendung von Letzterem kann deshalb manchmal auch dahingehend bevorzugt sein, dass keine besonderen Vorbehandlungen erforderlich sind, und aufgrund seiner oberflächenaktiven Eigenschaften solubilisiert das aus dem ersten Schritt der enzymatischen Hydrolyse erhaltene Desglucoruscin, welches sich dann wirksamer in α-Rhamnopyranosidase überführen lässt.

[0008] Die Konzentration von Ruscosaponin kann im Bereich von etwa 5 bis etwa 40% Gewicht/Volumen liegen und die Hydrolyse wird bei Temperaturen im Bereich von 20 bis 50°C für Zeiten im Bereich von 3 bis 7 Tagen ausgeführt.

[0009] Am Ende des Bioumwandlungsverfahrens kann das End-Desglucodesrhamnoruscinprodukt, das in dem Reaktionssystem unlöslich ist, leicht durch Zentrifugierung und anschließendes Waschen mit Methanol entfernt werden. Weiterhin kann das erfindungsgemäße Verfahren kontinuierlich ausgeführt werden, wobei das hydrolysierte Produkt zu festen Zeiten entfernt und dank der Stabilität der verwendeten Enzyme kontinuierlich frisches Substrat Zugegeben wird. Für diesen Zweck wird vorzugsweise ein mit einer Ultrafiltrationsmembran ausgestatteter Bioreaktor verwendet, um die Akkumulation von Inhibitoren und denaturierenden Molekülen zu vermeiden.

[0010] Das nachstehende Beispiel erläutert die Erfindung genauer.

Beispiel

[0011] Die enzymatische Zubereitung, Cytolase PCL5 (Gist Brocades), wurde vor der Verwendung gegen 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5, in einer Amicon-Apparatur, die mit einer XM-Membran (cut-off 50 kDa) ausgestattet ist, diafiltriert, um die denaturierenden Mittel und Inhibitoren zu entfernen.

[0012] Das Inkubationsgemisch wurde durch Zugabe in der nachstehenden Reihenfolge hergestellt: Substrat (Desglucoruscin oder Ruscosid), 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0, Cytolase PCL5, und langsam unter Rühren Ethanol. Die Substratkonzentration variierte von 5 bis 40% (Gewicht/Volumen) und die Ethanolkonzentration von 0 bis 30% (Volumen/Gewicht). Die Reaktion wurde durch DC an Kieselgelplatten (60 F250 Merck), mit Essigsäureethylester/Methanol/Wasser 100 : 15 : 10 als Elutionsmittel, verfolgt. Die Aktivität der enzymatischen Zubereitung war 38 Einheiten β-Glucopyranosidase und 2,3 Einheiten α-Rhamnopyranosidase pro ml Inkubationsgemisch.

[0013] Die Bioumwandlung wurde bei einer Temperatur von 25°C ausgeführt. Die Transformation in Desglucodesrhamnoruscin wurde in etwa 72 Stunden, ausgehend von Desglucoruscin, und in etwa 96 Stunden, ausgehend von Ruscosid, vervollständigt.

[0014] Das Inkubationsgemisch wurde dann bei 12 100 g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit Methanol gewaschen und unter den gleichen Bedingungen wie vorstehend erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt und die Überstände wurden vereinigt. Die Methanollösung wurde dann unter Vakuum verdampft und das

erhaltene Produkt wurde verrieben, um ein feines, dunkelgelbes Pulver zu erhalten, das 20% Desglucodesrhamnoruscin (HPLC-Assay) enthält.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Desglucodesrhamnoruscin, das eine enzymatische Teilhydrolyse von Ruscin, Desglucoruscin oder Ruscosid (Ruscosaponinen) mit Hilfe von rohen Zubereitungen, die auf Hydrolasen, welche aus Aspergillus niger extrahiert wurden, basieren, umfasst, wobei die Enzymzubereitungen gleichzeitig β-Glucopyranosidase- und α-Rhamnopyranosidase-Aktivitäten aufweisen, und die aufeinander folgende Entfernung des β-Glucosidrests, gefolgt von Entfernung des α-Rhamnosidaserests bereitstellen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Hydrolyse in wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 5 oder in einem Wasser-Ethanol-Gemisch, das bis zu 30 Volumenprozent Ethanol enthält, ausgeführt wird.

3. Verfahren nach Ansprüchen 1–2, wobei die Konzentration an Ruscosaponinen im Bereich von 5 bis 40% Gewicht/Volumen liegt.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Hydrolyse bei Temperaturen von 20 bis 40°C für Zeiträume von 3 bis 7 Tagen ausgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Endprodukt durch Zentrifugierung und Waschen mit Methanol gewonnen wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen