

P0201300

7915

A2

**ELJÁRÁS RUSCUS ACULEATUS SZTEROID GLIKOZID-
-SZÁRMAZÉKAINAK ELŐÁLLÍTÁSÁRA**

K I V O N A T

A találmány értelmében a dezglükodezramnoruszkint úgy állítják elő, hogy a *Ruscus aculeatus* szteroid glikozidokat (ruszkoszaponineket) a fenti glikozidokat tartalmazó szubsztrát *Aspergillus niger* fajba tartozó gombák segítségével történő fermentálásával hidrolizálják.

[Handwritten signature]
2002.05.01.

[Handwritten signature]

95766-4023 SI

ELJÁRÁS RUSCUS ACULEATUS SZTEROID GLIKOZID- -SZÁRMAZÉKAINAK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

A találmány tárgya eljárás *Ruscus aculeatus* szteroid glükozidok (ruszkoszaponinok) származékainak előállítására.

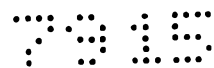
Közelebbről a találmány dezglükodezramnoruszkin előállítására vonatkozik ruszkozid és/vagy dezglükoruszkozid fermentációs úton történő hidrolízisével.

A dezglükoramnoruszkin, és a megfelelő szabad aglikonok, a ruszkogenin és a neoruszkogenin, amelyek savas hidrolízissel egyszerűen előállíthatók dezglükodezramnoruszkinből, értékes, gyógyászatilag hatékony anyagok, amelyek gyulladásgátló és kötőszövet-védő aktivitással rendelkeznek.

A fenti hatóanyagok kémiai előállítása azonban ruszkozidból vagy dezglükoruszkozidból kiindulva problematikus, mivel drasztikus körülményekre van szükség, például erős savakkal végzett hidrolízisre, és bonyolult műveleti lépésekre, amelyek a köztitermékek és termékek nagyon heterogén elegyét eredményezik.

Ezért volt igény olyan eljárás kidolgozására a dezglükodezramnoruszkin előállítására, amellyel kiküszöbölhetők az ismert kémiai eljárásokkal kapcsolatos fent említett hátrányok.

A fenti igények kielégítésére a találmány tárgya eljárás dezglükodezramnoruszkin előállítására oly módon, hogy a *Ruscus*



aculeatus szteroid glükozidokat (ruszkoszaponinok) hidrolizáljuk a fenti glükozidokat tartalmazó szubsztrát *Aspergillus niger* fajhoz tartozó gombákkal történő fermentálásával.

A tenyészelvet alkalmazzuk rendszerint tápanyagban gazdag szubsztrátként.

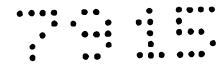
A fermentálást általában 25 - 30 °C-on, előnyösen 27 °C-on végezzük, keverés és levegőztetés közben, amellyel $\geq 50\%$ pO₂ értéket biztosítunk.

A kiindulási szteroid glikozidok koncentrációja rendszerint 5 - 15 vegyes%, előnyösen 5 - 10 vegyes%, és a tenyészlé pH-ja 4 - 6, előnyösen 4,5 - 5,5.

A találmány szerinti biotechnológiai eljárással a teljes reakciósorozatot egyetlen fermentációs lépésben tudjuk végrehajtani, mivel a megfelelő mikrobiológiai módszerekkel szelektált mikroorganizmus a kiindulási komplex heteroglikozidtól a monoglikozidig vagy az aglikon végtermékig képes az összes transzformációs reakció lejátszatásához szükséges enzimaktivitás expresszálására. A fenti hidrolázos átalakítások valójában az eljárás során egymást követően felszabaduló köztitermékek β -glükozidázos és α -ramnozidázos reakcióinak sorozatát foglalják magukban. A szabad aglükont (ruszkogenin) egy további; α -arabinozidázos reakcióval kapjuk.

A fenti megközelítés teljesen új, mivel a fenti termékek előállítására a fenti eljárás alkalmazása szakirodalomból nem ismert.

A találmány szerinti átalakítások végrehajtására megfelelő mikroorganizmusokat szintetikus vagy félszintetikus táptalajon történő szelektálással kapjuk, amelyek az átalakítandó

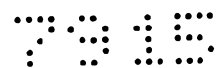


szubsztrátokkal vannak adalékolva a szokásos szénforrások (glükóz, szacharóz és hasonló) helyett, vagy azok mellett. A szóbanforgó szubsztrátok (ruszkozid, dezglükoruszkozid) ebben az esetben még nagy koncentrációkban (például 90 - 100 g/l koncentrációban) is hozzáadhatók. Az agaros izoláló tápközeg mikrobiológiai alkalmazásra szokásos összetételű, például maláta agar vagy Czapek agar, vagy hasonló összetétel, ahol a nitrogénforrást peptonok, karbamid, ammónium-nitrát és hasonlók biztosítják, míg a szokásos szénforrások (glükóz, szacharóz) ruszkoziddal vagy dezglükoruszkoziddal vannak helyettesítve vagy kiegészítve. A fenti közeg adalékanyagként tartalmazhat továbbá kálium-, magnézium-, mangán-, cink-, stb. ásványi sókat, például foszfátokat, szulfátokat és/vagy kloridokat. Az izoláló közeg pH-ja 4 - 6, előnyösen 4,5 - 5,5.

A kívánt biotranszformációra alkalmas mikroorganizmusokat sorozathigitással, és a minták vizes szuszpenzióinak talajra, humuszra, növényi extraktumokra vagy egyéb hasonló szerves forrásra történő szélesztésével nyerhetjük ki.

A fentiek szerint szelektált mikróbatenyészeteket azonos összetételű tenyészközeget tartalmazó mikrobiológiai kémcsövekben izoláljuk, és a ruszkozid és dezglükoruszkozid biotranszformálására alkalmazzuk, amelyeket nagy koncentrációban (egészen 100 g/l-ig) adunk az izolálásra szolgáló tápközegben alkalmazott nitrogénforrásokat, például karbamidot vagy peptont, foszfátok és egyéb fent említett ásványi sókat tartalmazó folyékony tápközeghez, pH 4 - 6, előnyösen 4,5 - 5,5 értéken.

A fent ismertetett eljárás eredményeként azt találtuk, hogy



az *Aspergillus niger* szelektált tenyészetei képesek a ruszkozid és dezglükoruszkozid a ruszkogeninek közvetlen prekursorát képviselő dezglükodezramnoruszkinná történő transzformálására, egymást követő enzimatis β -glükozidáz és α -ramnozidáz reakciókkal.

Ezt követően egy α -arabinozidáz reakcióval kapjuk a szaponint aglikon formában (ruszkogenin - neoruszkogenin).

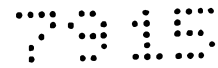
A fenti átalakításokra képes szelektált tenyészetet kontrollált (termosztált) körülmények között, optimális hőmérséklettartományban, 25 °C - 30 °C-on tenyésztjük rotációs rázógépen (200 - 300 fordulat/perc) történő keverés közben. A fenti fermentálást eltérő léptékben megfelelő bioreaktorban is végrehajthatjuk, a kívánt szaponin-származékok ipari előállítására.

A fenti biotranszformációra alkalmazott mikroorganizmusok katalitikus aktivitásuk állandó értéken tartására képesek, még ismételt fermentációs ciklusokban is, szakaszos vagy folyamatos eljárásban.

A találmány szerinti eljárás jelentős előnyöket biztosít, például az elválasztáshoz és a termék kinyeréséhez kevésbé bonyolult lépések szükségesek, és az eljárás egyszerűen kivitelezhető és gazdaságos.

A szelektált mikroorganizmusok hosszú időn keresztül tároláshoz lefagyaszthatók kriokonzerválószerrel, például glicerinnel, peptonnal és hasonlókkal dúsított szuszpenziókban -80 °C és -196 °C (cseppfolyós nitrogén) közötti hőmérsékleten, vagy fagyasztva szárításos kezelésnek vethetők alá.

A biokonverzió lefolyását TLC és HPLC analízissel követhetjük nyomon a tenyészleiben, az alábbi analitikai módszerek



alkalmazásával:

TLC analízis

- szilikagél lemez (60 F250 Merck)
- eluensek:
 - A) 9:1 arányú etil-acetát/metanol
 - B) 100:15:10 arányú etil-acetát/metanol/víz
- detektálás: 10%-os kénsavval történő reagáltatás, és melegítés 120 °C-on 5 percen keresztül, majd detektálás látható és UV tartományban.

HPLC analízis

- oszlop: Supelcosil LC18, 250 x 4,6 mm, 5 µm
- eluens: 60:40 arányú acetonitril/víz
- hullámhossz: 200 nm
- injektált térfogat: 10 µl
- átfolyási sebesség: 1 ml/min.

A biotranszformáció végtermékei, például a dezglükodezramnoruszkin, a tenyészlé n-butanollal történő extrahálásával, majd klórozott oldószerekkel (például triklóretánnal) és szilikagélen történő kromatográfiával történő tisztítással nyerhetők ki. Végül a terméket különféle oldószerekből, például izopropanolból, etil-acetátból, kloroformból, acetonból, metanolból kristályosíthatjuk. A fő terméken kívül C-2 helyzetben például 2-hidroxi-3-metilpentánsavval észterezett dezglükodezramnoruszkinok is előállíthatók.

A szaponinokat aglikon formában (ruszkogeninek) a fenti fermentációs termékek savas hidrolízisével állíthatjuk elő.

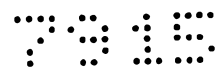
A találmányt részletesen az alábbi példák szemléltetik.

1. példa

Lombikonként 250 ml maláta cseppfolyós tenyésztőközeget tartalmazó 2 lombikot maláta agaron nevelt *Aspergillus niger* tenyészetből származó spórákkal inokulálunk, a fenti tenyészetet 2% ruszkoziddal adalékolt, módosított agar maláta tápközegen szelektáltuk. A lombikokat 48 órán keresztül 27 °C-on inkubáljuk orbitális keverőgépen, 250 fordulat/perc mellett. Az inkubálás végén az előtenyészetet bioreaktorba visszük át, amely körülbelül 7 l steril R090 cseppfolyós tenyésztőközeget tartalmaz, és összetétele az alábbi (1 liter ionmentes vízre vonatkoztatva): 90 g ruszkozid száraz extraktum, 1 g karbamid, 1 g pepton, 5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g KCl, 1 g KH_2PO_4 , 0,2 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,1 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 ml P2000 habzágátló, pH ~ 5.

A fermentációt az oldott oxigén százaléka (pO_2) alapján a keverési sebesség és a levegőáram progresszív növelésével úgy hajtottuk végre, hogy 50%-nál nagyobb pO_2 értéket kapjunk. A biokonverzió lefolyását HPLC és TLC analízissel követtük nyomon. A fermentáció 27 °C-on 5 nap inkubálás után befejeződött. A tenyészlé TLC és HPLC analízise azt mutatta, hogy a ruszkozid elfogyott, miközben fő terméként dezglükodezramnoruszkín keletkezett, nyomokban ruszkogeninekkel.

A tenyészlévet n-butanollal kimerítően extaháltuk. A butanolos extraktumot vákuumban +60 °C-on szárazra pároltuk, 70%-os metanolban újra oldottuk, és triklór-etánnal visszaextraháltuk. A klórozott oldatot vákuumban szárazra pároltuk. A terméket kloroform/metanol elegyben újra oldottuk, és oszlop-kromatográfián (Kieselgel, Merck) tisztítottuk, eluensként 9:1



arányú etil-acetát/kloroform elegy alkalmazásával. A frakciókat TLC vagy HPLC analízissel ellenőriztük. A tisztított termékfrakciókat vákuumban koncentráltuk, majd acetonban újra oldottuk, és kristályosítottuk. Metanolból történő újabb kristályosítással körülbelül 7 g terméket kaptunk, amelyet spektroszkópiás analízissel dezglükodezramnoruszként azonosítottunk. A főtermék mellett C-2' helyzetben 2-hidroxi-3-metilpentánsavval észterezett dezglükodezramnoruszkint is kaptunk kis mennyiségben (körülbelül 80 mg).

A fentiekben ismertetett fermentációs termékek savas hidrolízisével kapjuk a szaponineket aglikon formában (ruszkogéninek).

2. példa

Az 1. példában leírt fermentorban dolgozva lejátszatjuk az első biotranszformációs ciklust, és ezután a tenyészlé 90%-át extrahálva kapjuk a terméket; a fennmaradó 10% fermentációs közeget körülbelül 7 l végtérfogatra egészítjük ki friss R090 közeggel. A második fermentációs ciklust a fent ismertetett paraméterek és analitikai kontrollok alkalmazásával hajtjuk végre. A fermentálás 27 °C-on körülbelül 5 nap elteltével teljes.

A két fermentációs ciklusból kapott tenyészleveket az 1. példában leírtak szerint kezelve extraháljuk és nyerjük ki a terméket. Az utolsó lépés végén körülbelül 14 g dezglükodezramnoruszkint kapunk.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás dezglükodezramnoruszkin előállítására, **azzal jellemezve**, hogy a *Ruscus aculeatus* szteroid glikozidokat (rusz-koszaponineket) a fenti glikozidokat tartalmazó szubsztrát *Aspergillus niger* fajba tartozó gombákkal történő fermentálásával hidrolizáljuk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a szubsztrátként egy folyékony tenyészlévet alkalmazunk.
3. A 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a fermentálást 25 - 30 °C hőmérsékleten, keverés és levegő átfúvatás mellett végezzük, amellyel $\geq 50\%$ pO₂ nyomást biztosítunk.
4. A 3. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a hőmérséklet 27 °C.
5. A 3. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a szteroid glikozidok kiindulási koncentrációja 5 - 15 vegyes%.
6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a koncentráció 8 - 10 vegyes%.
7. A 2-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tenyészlé pH-ja 4-6.
8. A 7. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tenyészlé pH-ja 4,5 - 5,5.

A meghatalmazott:
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
dr. Kiss Ildikó
szabadalmi ügyvivő

Aktaszámunk: 95766-4023 SI

2022.07.28