(12) **PATENT**

(19) NO (11) **326846** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl.
C12P 33/00 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
C12R 1/685 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20015823	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.05.29 PCT/EP00/04873
(22)	Inng.dag	2001.11.29	(85)	Videreføringsdag	2001.11.29
(24)	Løpedag	2000.05.29	(30)	Prioritet	1999.06.01, IT, MI99A001222
(41)	Alm.tilgj	2001.11.29			
(45)	Meddelt	2009.03.02			

(73) Innehaver Indena SpA, Viale Ortles, 12, 20132 MILANO, IT
(72) Oppfinner Mario de Rosa, Napoli, IT
Alessandra Morana, Napoli, IT
Antonella di Lazzaro, Portici, IT
Cesare Ponzone, c/o Indena Spa, Viale Ortles, 12, 20132 MILANO, IT
(74) Fullmektig Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av desglukodesrhamnoruscin ved enzymatisk hydrolyse med hydrolaser fra Aspergillus niger**

(56) Anførte publikasjoner
GB 1380253 A
PEREPELITSA, E. D. ET AL, "Usloviya passhepleniya fermentnim preparatom Aspergillus niger BKMt-33 protodiostsina-osnobnogo glikozida iz Tribulus terrestris L.", Prikladnaya biokhimiya i mikrobilogiys, vol. 11, nr. 6, 1975, s. 901-905,

(57) Sammendrag

Fremgangsmåte for fremstilling av desglukodesrhamnoruscin som omfatter den enzymatiske hydrolyse av Ruscus aculeatus steroid glykosider (ruscosaponiner) ved hjelp av ubearbeidede hydrolaser fra Aspergillus niger.

Foreliggende oppfinnelse omhandler en fremgangsmåte for fremstilling av desglukodesrhamnoruscin av Ruscus aculeatus steroid glykosider (ruscosaponin), hvor fremgangsmåten omfatter de trekk som er angitt i krav 1 og hvor fremgangsmåten gir desglukodesrhamnoruscin ved delvis enzymatisk hydrolyse av ruscin, desglukoruscin eller ruscosid.

Det er tidligere kjent fra GB-A-1380253 å fremstille blant annet desglukodesrhamnoruscin ved enzymatisk hydrolyse av Ruscus aculeatus saponiner, dog ikke med protease fra Aspergillus niger. Fra en artikkel av Perepelitsa E.D. et al., Prihladnaya biokhimiya i mikrobilogiys, vol. 11, nr 6, 1975 er det kjent å anvende et enzymatisk ekstrakt fra Aspergillus niger for å hydrolysere steroidsaponiner fra Tribulus terrestris, men ikke saponiner fra Ruscus aculeatus.

Den partielle enzymatiske hydrolyse ifølge oppfinnelsen utføres ved hjelp av ubearbeidede enzympreparater basert på hydrolaser ekstrahert fra Aspergillus niger. Preparatene er kommersielt tilgjengelig og anvendes i vin- og næringsmiddelindustriene. Spesielt foretrukket er anvendelsen av preparatet som er kommersielt tilgjengelig fra Gist Brocades under varemerket Cytolase PCL5.

Nevnte enzympreparater har samtidig β-glykopyranosidase og α-rhamnopyranosidaseaktiviteter og tilveiebringer derfor den sekvensielle fjerning av β-glukosidresiduen fulgt av fjerningen av α-rhamnosidresiduen til det ønskede produkt.

Den enzymatiske hydrolyse blir utført i vandig oppløsning bufret til pH 5 eller i vann inneholdende opp til 30 vol-% etanol. Det har blitt observert at i praksis påvirker ikke nærværet av etanol ugunstig den enzymatiske aktivitet: β-glukopyranosidaseaktiviteten øker i nærvær av etanol mens, på den andre side, α-rhamnopyranosidaseaktiviteten synker svakt, men til en grad som uansett ikke påvirker reaksjonen ifølge oppfinnelsen. En omkring 30% v/v etanolprosentandel

er nødvendig for den fullstendige solubilisering av desglukoruscin, mens lavere prosentandeler, på omkring 17% v/v, er nødvendig for ruscosidet. Anvendelsen av sistnevnte kan derfor noen ganger være foretrukket også fordi det ikke krever noen spesifikke forbehandlinger, og på grunn av sine overflateaktive egenskaper solubiliserer desglukoruscinen hvilket resulterer fra det første trinnet av hydrolysen enzymatisk, som deretter mer effektivt kan transformeres til α-rhamnopyranosid.

Konsentrasjonen av ruscosaponin kan spenne fra omkring 5 til omkring 40% w/v, og hydrolysen utføres ved temperaturer som spenner fra 20 til 50°C over tider som spenner fra 3 til 7 dager.

Ved slutten av bioomformingsprosessen, kan slutt-desglukodesrhamnoruscinproduktet, som er uløselig i reaksjonssystemet, lett gjenvinnes ved sentrifugering og etterfølgende vasking med metanol. Videre kan prosessen ifølge oppfinnelsen utføres kontinuerlig ved å fjerne det hydrolyserte produktet ved faste tidspunkter og kontinuerlig tilsette ferskt substrat, takket være stabiliteten av de anvendte enzymer. For dette formål, vil en bioreaktor utstyrt med en ultrafiltreringsmembran, for å unngå akkumuleringen av inhibitorer og denaturerende molekyler, foretrukket anvendes.

Det følgende eksempel illustrerer oppfinnelsen i større detalj.

Eksempel

Det enzymatiske preparat Cytolase PCL 5 (Gist Brocades) ble diafiltrert før bruk mot 0,1 M citratfosfatbuffer pH 5 i Amicon apparatur utstyrt med en XM membran ("cut-off" 5 kDa) for å fjerne denaturerende midler og inhibitorer.

Inkuberingsblandingen ble fremstilt ved å tilsette i den følgende rekkefølge: substrat (desglukoruscin eller ruscosid), 0,1 M citratfosfatbuffer pH 5,0, Cytolase PCL5 og sakte, under røring, etanol. Substratkonsentrasjonen varierte fra 5 til 40% (w/v) og etanolkonsentrasjonen fra 0 til 30% (v/w). Reaksjonen ble fúlgt ved TLC på silikagelplater (60 F250 Merck) med etylacetat/metanol/vann 100:15:10 som eluent. Aktiveringen av det enzymatiske preparat var av 38 enheter β-glukopyranosidase og av 2,3 enheter α-rhamnopyranosidase per ml inkuberingsblanding.

Bioomformingen ble utført ved en temperatur på 25°C. Transformasjonen til desglukodesrhamnoruscin ble fullført i løpet av omkring 72 timer ved å starte fra desglukoruscin og i løpet av omkring 96 timer ved å starte fra ruscosid.

Inkuberingsblandingen ble deretter separert ved 12.100 g i 30 minutter ved 4°C. Bunnfallet ble vasket med metanol og vasket igjen i de samme betingelsene som over. Dette trinnet ble repetert fem ganger og supernatantene ble slått sammen. Metanoloppløsningen ble deretter dampet inn under vakuum og det resulterende produkt ble trituert for å oppnå et fint mørkegult pulver, inneholdende 20% desglukodesrhamnoruscin (HPLC analyse).

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for fremstilling av desglukodesrhamnoruscin,
karakterisert ved at det omfatter partiell enzymatisk hydrolyse av ruscin, desglukoruscin eller ruscosid (ruscosaponiner) ved hjelp av ubearbeidede preparater basert på hydrolaser ekstrahert fra *Aspergillus niger*, hvilke enzympreparater har samtidig β-glukopyranoisdase- og α-rhamnopyranosidaseaktiviteter og som gir sekvensiell fjerning av β-glukosidresiduet fulgt av fjerning av α-rhamnosidresiduet.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at hydrolysen utføres i vandig oppløsning ved pH 5 eller i vann-etanol-blanding inneholdende opp til 30 volum% etanol.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 - 2,
karakterisert ved at konsentrasjonen av ruscosaponiner spenner fra 5 til 40% w/v.

4. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 - 3,
karakterisert ved at hydrolysen blir utført ved temperaturer fra 20 til 40°C over tidsrom fra 3 til 7 dager.

5. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 - 4,
karakterisert ved at sluttproduktet blir gjenvunnet ved sentrifugering og vasking med metanol.