



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 286**

51 Int. Cl.:
C12P 33/00 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00935137 .0**
86 Fecha de presentación : **29.05.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1180161**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2002**

54 Título: **Un procedimiento para la preparación de derivados de glicósidos esteroideos *Ruscus aculeatus* mediante hidrólisis enzimática.**

30 Prioridad: **01.06.1999 IT MI99A1222**

73 Titular/es: **INDENA S.p.A.**
Viale Ortles, 12
20139 Milano, IT

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

72 Inventor/es: **Ponzone, Cesare;**
De Rosa, Mario;
Morana, Alessandra y
Di Lazzaro, Antonella

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un procedimiento para la preparación de derivados de glicósidos esteroides *Ruscus aculeatus* mediante hidrólisis enzimática.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de derivados de glicósidos esteroides *Ruscus aculeatus* (ruscosaponina).

De forma más particular, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de desglucodesramnoruscina mediante hidrólisis enzimática parcial de ruscina, desglucoruscina o ruscósido.

En el documento DE2202393 se obtiene desglucodesramnoruscina de la desglucoruscina mediante calentamiento en ácido acético.

Perepelitsa y col. (1975) PRIKLADNAYA BIOKIMIYA I MIKROBIOLOGIYA, 11, 901 a 905 usan hidrolasas de *A. niger* para obtener dioscina y trilina y protodioscina mediante escisión de enlaces glucosaramnosa.

La hidrólisis enzimática de acuerdo con la invención se lleva a cabo por medio de preparaciones de enzima brutas basadas en hidrolasas extraídas de *Aspergillus niger*. Dichas preparaciones se encuentran comercialmente disponibles y se usan en las industrias del vino y alimentación. Se prefiere de forma particular el uso de la preparación comercialmente disponible de Gist Brocades con el nombre comercial Cytolase PCL5.

Dichas preparaciones de enzimas tienen al mismo tiempo actividades de β -glucopiranosidasa y α -ramnopiranosidasa y por tanto proporcionan la eliminación secuencial del residuo β -glucósido seguido de eliminación del residuo α -ramnosida hasta el producto deseado.

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo en solución acuosa tamponada a pH 5 o en agua que contiene hasta aproximadamente el 30% en volumen de etanol. Se ha observado que en la práctica la presencia de etanol no afecta de forma adversa la actividad enzimática: la actividad de la β -glucopiranosidasa aumenta en presencia de etanol mientras que, por otro lado, la actividad de α -ramnopiranosidasa disminuye ligeramente, pero en un grado que no afecta en modo alguno a la reacción de la invención. Aproximadamente es necesario un 30% en relación v/v de porcentaje de etanol para la solubilización completa de desglucoruscina, mientras que se requieren porcentajes inferiores, de aproximadamente el 17% en relación v/v, para el ruscósido. Por tanto, el uso de esta última puede ser preferido a veces también porque no requiere pre-tratamientos específicos y debido a que sus propiedades tensioactivas solubilizan la desglucoruscina resultante de la primera etapa de la hidrólisis enzimática, que se puede transformar luego en α -ramnopiranosidasa de forma más eficiente.

La concentración de ruscosaponina puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 40% en relación p/v, y la hidrólisis se lleva a cabo a temperaturas que varían de 20 a 25°C durante periodos que varían de 3 a 7 días.

Al final del procedimiento de bioconversión, el producto de desglucodesramnoruscina final, insoluble en el sistema de reacción, se puede recuperar fácilmente mediante centrifugación y subsiguiente lavado con metanol. Además, el procedimiento de la invención se puede llevar a cabo de forma continua, eliminando el producto hidrolizado en momentos de tiempo fijados y añadiendo de forma continua sustrato fresco, gracias a la estabilidad de los enzimas usados. Para este fin se usará preferiblemente un biorreactor equipado con una membrana de ultrafiltración, para evitar la acumulación de inhibidores y moléculas de desnaturalización.

El siguiente ejemplo ilustra la invención con mayor detalle.
Ejemplo

La preparación enzimática Cytolase PCL5 (Gist Brocades) se diafiltró antes de uso junto a tampón citrato-fosfato 0,1 M pH 5 en equipo Amicon equipado con una membrana XM (corte a 50 kDa) con el fin de eliminar los agentes de desnaturalización e inhibidores.

La mezcla de incubación se preparó mediante adición en el siguiente orden de: sustrato (desglucoruscina o ruscósido), tampón citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0, Cytolase PCL5 y lentamente, con agitación, etanol. La concentración de sustrato varió de 5 a 40% (en relación p/v) y la concentración de etanol de 0 a 30% (en relación v/p). La reacción fue seguida por TLC (cromatografía en capa fina) sobre placas de gel de sílice (60 F250 Merck) con acetato de etilo/metanol/agua 100:15:10 como eluyente. La activación de la preparación enzimática fue de 38 unidades de β -glucopiranosidasa y de 2,3 unidades de α -ramnopiranosidasa por ml de mezcla de incubación.

La bioconversión se llevó a cabo a una temperatura de 25°C. La transformación en desglucodesramnoruscina fue completada en aproximadamente 72 horas partiendo de desglucoruscina y en aproximadamente 96 horas partiendo de ruscósido.

La mezcla de incubación se centrifugó luego a 12.100 g durante 30 minutos a 4°C. Se lavó el precipitado con metanol y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones que anteriormente. Esta etapa se repitió cinco veces y se reunieron los sobrenadantes. Se evaporó luego la solución de metanol a vacío y se trituró el producto resultante para obtener un polvo amarillo oscuro fino, que contiene el 20% de desglucodesramnoruscina (ensayo por HPLC, cromatografía líquida de alta resolución).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de desglucodesramnoruscina, que comprende la hidrólisis enzimática parcial de ruscina, desglucoruscina o ruscósido (ruscosaponinas) por medio de preparaciones brutas basadas en hidrolasas extraídas de *Aspergillus niger*, presentando dichas preparaciones de enzima al mismo tiempo actividades de β -glucopiranosidasa y α -ramnopiranosidasa y proporcionando la eliminación secuencial del residuo β -glucósido seguido de la eliminación del residuo α -ramnosidasa.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la hidrólisis se lleva a cabo en solu-

ción acuosa a pH 5 o en mezcla de agua-etanol que contiene hasta el 30% del volumen de etanol.

3. Un procedimiento como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 2, en el que la concentración de ruscosaponinas varía de 5 a 40% en relación p/v.

4. Un procedimiento como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la hidrólisis se lleva a cabo a temperaturas de 20 a 40°C durante periodos de tiempo de 3 a 7 días.

5. Un procedimiento como se reivindica en una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en el que el producto final se recupera mediante centrifugación y lavado con metanol.