(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C12P 33/00 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년02월22일
(11) 등록번호 10-0685529
(24) 등록일자 2007년02월14일

(21) 출원번호	10-2001-7015366	(65) 공개번호	10-2002-0011427
(22) 출원일자	2001년11월29일	(43) 공개일자	2002년02월08일
심사청구일자	2005년05월17일		
번역문 제출일자	2001년11월29일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP2000/004873	(87) 국제공개번호	WO 2000/73483
국제출원일자	2000년05월29일	국제공개일자	2000년12월07일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탐, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 세르비아앤 몬테네그로, 짐바브웨, 시에라리온,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 MI99A001222 1999년06월01일 이탈리아(IT)

(73) 특허권자
인데나 에스피아
이탈리아공화국, 20139 밀라노, 12 비아 오틀스

(72) 발명자
폰존,세사르
이탈리아공화국,I-20139밀라노,12,비아오틀스

디로사,마리오
이탈리아공화국,I-80131나포리,188,비아이.니콜라르디

모라나,알레산드라
이탈리아공화국,I-80131나포리,55,비아에프.네티

디라짜로,안토넬라
이탈리아공화국,I-80055토티씨,218/비스,비아리버타

(74) 대리인 김재천

심사관 : 양인수

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 효소 가수분해에 의한 루스쿠스 아쿨레아투스 스테로이드배당체 유도체의 제조방법

(57) 요약

아스퍼길루스 니게르(Aspergillus niger)에서 얻어진 생 가수분해효소를 사용한 루스쿠스 아쿨레아투스 (Ruscus aculeatus) 스테로이드 배당체 (루스코사포닌, ruscosaponins)를 효소 가수분해 시키는 것으로 구성되어 있는 데스글루코데스람노루신(desglucodesrhamnoruscin)의 제조방법.

특허청구의 범위

청구항 1.

아스퍼길루스 니게르(Aspergillus niger)에서 얻어진 가수분해효소에 기초를 둔 생 효소제제(crude enzyme preparations)를 사용하여 루신(ruscin), 데스글루코루신(desglucoruscin) 또는 루스코사이드(ruscoside)(루스코사포닌, ruscosaponins)를 부분적인 효소 가수분해시키는 것으로 구성되며, 상기 효소제제는 β-글루코피라노스분해효소(β-glucopyranosidase) 및 α-람노피라노스분해효소(α-rhamnopyranosidase)의 활성을 동시에 갖고, β-글루코스배당체(β-glucoside) 잔기의 제거 후 α-람노스배당체(α-rhamnoside) 잔기를 연속적으로 제거하는, 데스글루코데스람노루신(desglucodesrhamnoruscin)의 제조방법.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

제1항에 있어서, 가수분해가 pH 5의 수용액에서 또는 부피 대비 30%까지의 에탄올을 함유한 물-에탄올 혼합액에서 수행되는 제조방법.

청구항 4.

제1항과 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 루스코사포닌(ruscosaponin)이 중량/부피(w/v) 대비 5 내지 40%의 농도범위 내에서 사용되는 제조방법.

청구항 5.

제1항과 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 가수분해가 섭씨 20 내지 40도의 온도에서 3 내지 7일 동안 반응시켜 수행되는 제조방법.

청구항 6.

제1항과 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 최종생성물이 원심분리로 회수되고 메탄올로 세척하는 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

본 발명은 루스쿠스 아쿨레아투스 (Ruscus aculeatus) 스테로이드 배당체 유도체 (루스코사포닌, ruscosaponin)의 제조방법에 관한 것이다.

특히, 본 발명은 루신(ruscin), 데스글루코루신(desglucoruscin), 또는 루스코사이드(ruscoside)의 부분적인 효소 가수분해에 의한 데스글루코데스람노루신(desglucodesrhamnoruscin)의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 효소 가수분해는 아스퍼길루스 니게르(Aspergillus niger)로부터 추출된 가수분해효소를 사용한 생 효소 제제에 의해 수행된다. 상기 제제는 현재 상품화되어 있고 포도주 및 식품업계에서 사용되고 있다. 특히 바람직하게는 기스트 부로카데스(Gist Brocades)사로부터 상품명 싸이토라제(Cytolase) PCL5로 판매되는 제제를 사용하는 방법이다.

상기 효소 제제는 β-글루코피라노스분해효소(β-glucopyranosidase) 및 α-람노피라노스분해효소(α-rhamnopyranosidase)의 활성도 동시에 가지고 있어서 β-글루코스배당체(β-glucoside) 잔기를 떼어내고 이어서 α-람노스배당체(α-rhamnoside) 잔기를 떼어내어 목적물을 얻을 수 있게 해준다.

그러한 효소 가수분해는 pH 5로 버퍼화된 수용액에서 또는 부피 대비 약 30%까지의 에탄올을 함유한 물에서 수행된다. 에탄올의 존재는 효소 활성에 부정적인 영향을 주지 않는다는 것이 실험에서 관찰되었다: β-글루코피라노스분해효소는 에탄올 존재하에 활성이 증가한 반면, α-람노피라노스분해효소는 활성이 약간 감소하였지만 본 발명의 반응에 영향을 줄 만한 정도는 아니다. 부피(v/v) 대비 약 30%의 에탄올은 데스글루코루신(desglucoruscin)을 완전히 용해시키는데 필요한 반면, 부피(v/v) 대비 약 17%정도의 낮은 에탄올 함량은 루스코사이드(ruscoside)의 용해에 필요하다. 따라서 후자인 17%의 에탄올 함량은 또한 특별한 전처리가 필요 없다는 점에서 그리고 효소가수분해의 첫 단계에서 만들어진 후 α-람노피라노스분해효소에 더 효과적으로 반응하는 데스글루코루신(desglucoruscin)을 표면활성 성질로 인하여 용해시킬 수 있다는 점에서 가끔 더 바람직할 수 있다.

루스코사포닌(ruscosaponin)은 중량/부피(w/v) 대비 약 5 내지 약 40%의 농도범위 내에서 사용될 수 있고, 가수분해는 섭씨 20 내지 50도의 온도범위 내에서 3 내지 7일의 시간범위동안 반응시켜 수행된다.

이 생체변환(bioconversion) 과정의 마지막에는 최종생성물로 반응계 내에서 불용성인 데스글루코데스람노루신(desglucodesrhamnoruscin)이 원심분리 후 메탄올로의 세척에 의해 용이하게 얻어질 수 있다. 또한, 사용되는 효소가 안정한 결과로 인하여 본 발명의 과정은 연속적으로 수행될 수 있는데, 일정시간 동안 가수분해시킨 다음 생성물을 분리하고 이어서 연속적으로 새로운 반응물을 가하여 반응을 계속시킬 수 있다. 이러한 목적을 달성하기 위하여는 반응 억제제 및 변성유발 분자의 축적을 막기 위하여 한외여과 막을 장치한 생체반응기의 사용이 바람직할 것이다.

다음 실시예에서 본 발명을 더 구체적으로 설명한다.

실시예

변성유발제 및 반응억제제를 제거하기 위한 목적으로 XM막(차단제한 50 kDa)을 갖춘 아미콘(Amicon) 장치내에서 효소제제 싸이토라제(Cytolase) PCL5 (Gist Brocades사)가 사용 전에 pH 5의 0.1 M 구연산-인산 버퍼를 사용하여 투석여과되었다.

배양혼합물은 다음과 같은 순서로 가하여 제조되었다: 반응물질 (데스글루코루신 또는 루스코사이드), 0.1 M 구연산-인산 버퍼 pH 5, 싸이토라제(Cytolase) PCL5, 교반하에 에탄올 적가. 반응물질 농도는 중량/부피(w/v) 대비 5 내지 40%의 범위 내에서 그리고 에탄올 농도는 부피/중량(v/w) 대비 0 내지 30%의 범위 내에서 사용되었다. 반응완료 후에 전개액으로 100:15:10의 에틸아세테이트/메탄올/물 혼합액을 사용하여 실리카겔 판(60 F250 Merck)에서 TLC 분리를 수행하였다. 효소제제의 활성화 정도는 배양혼합물 1 mL당 β-글루코피라노스분해효소는 38 단위 그리고 α-람노피라노스분해효소는 2.3 단위이었다.

생체변환은 섭씨 25도의 온도에서 수행되었다. 데스글루코데스람노루신으로의 변환은 데스글루코루신으로부터는 약 72시간 내에 그리고 루스코사이드로부터는 약 96시간 내에 완결되었다.

이러한 배양혼합물은 섭씨 4도의 온도에서 30분 동안 12,100 g에서 원심분리되었다. 침전물을 메탄올로 세척하고 상기와 동일한 조건하에서 다시 원심분리하였다. 이 과정을 다섯 번 반복하고 상등액을 보관하였다. 메탄올 용액을 감압 증류하여 얻어진 생성물을 분말화하여 20%의 데스글루코데스람노루신(HPLC 분석)을 함유한 진황색 분말을 얻었다.