



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2001132330/13, 29.05.2000

(24) Дата начала действия патента: 29.05.2000

(30) Приоритет: 01.06.1999 IT MI99A001222

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2003

(45) Опубликовано: 27.03.2005 Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: DE 2202393 A, 28.09.1972. FR 2104911, 28.04.1972. ПЕРЕПЕЛИЦА Э.Д., и др., Условия расщепления ферментным препаратом *Aspergillus niger* ВКМт-33 протодиосцина - основного гликозида из *Tribulus terrestris*. 1. Прикладная биохимия и микробиология, №11, 1975, с.901-905.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 29.11.2001

(86) Заявка РСТ:
EP 00/04873 (29.05.2000)

(87) Публикация РСТ:
WO 00/73483 (07.12.2000)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры",
пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

ПОНДЗОНЕ Чезаре (IT),
ДЕ РОЗА Марио (IT),
МОРАНА Алессандра (IT),
ДИ ЛАЦЦАРО Антонелла (IT)

(73) Патентообладатель(ли):

ИНДЕНА С.П.А. (IT)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ RUSCUS ACULEATUS МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения производных стероидных гликозидов *Ruscus aculeatus* (рускосапонинов). Способ получения десглюкодесрамнорусцина включает

ферментативный гидролиз стероидных гликозидов *Ruscus aculeatus* (рускосапонинов) с помощью неочищенных гидролаз из *Aspergillus niger*. Способ позволяет получить десглюкодесрамнорусцин с высокой степенью эффективности. 5 з.п. ф-лы.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 249 042** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 P 33/00, 19/44//C 12 P**
33/00, C 12 R 1:685)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2001132330/13, 29.05.2000**

(24) Effective date for property rights: **29.05.2000**

(30) Priority: **01.06.1999 IT MI99A001222**

(43) Application published: **10.10.2003**

(45) Date of publication: **27.03.2005 Bull. 9**

(85) Commencement of national phase: **29.11.2001**

(86) PCT application:
EP 00/04873 (29.05.2000)

(87) PCT publication:
WO 00/73483 (07.12.2000)

Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):

PONDZONE Chezare (IT),
DE ROZA Mario (IT),
MORANA Alessandra (IT),
DI LATsTsARO Antonella (IT)

(73) Proprietor(s):

INDENA S.P.A. (IT)

(54) **METHOD FOR PREPARING DERIVATIVES OF STEROID GLYCOSIDES FROM RUSCUS ACULEATUS BY METHOD OF ENZYMATIC HYDROLYSIS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, biochemistry, natural compounds.

SUBSTANCE: invention relates to a method for preparing derivatives of steroid glycosides from the plant *Ruscus aculeatus* (ruscosaponins). Method for preparing desglucodesrhamnoruscin involves

enzymatic hydrolysis of steroid glycosides from *Ruscus aculeatus* (ruscosaponins) with crude hydrolases from *Aspergillus niger*. Method provides preparing desglucodesrhamnoruscin with the high degree of effectiveness.

EFFECT: improved preparing method.
6 cl, 1 ex

Настоящее изобретение относится к способу получения производных стероидных гликозидов *Ruscus aculeatus* (рускосапонинов).

Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу получения десглюкодесрамнорусцина неполным ферментативным гидролизом русцина, десглюкорусцина или рускозида.

Известен способ получения десглюкодесрамнорусцина из сапонинов *Ruscus aculeatus* путем ферментативного гидролиза такадиастазой (DE 2202393 A). Такадиастазу получают гидролизом из *Aspergillus oryzae*, причем в данном источнике не упоминается фермент целлюлаза.

В соответствии с настоящим изобретением ферментативный гидролиз проводят с помощью неочищенных ферментных препаратов на основе гидролаз, экстрагированных из *Aspergillus niger*. Указанные препараты представляют собой коммерчески доступные материалы, которые применяются в виноделии и пищевой промышленности. Особенно предпочтительно использовать препарат коммерчески доступный от Gist Brocades под торговой маркой Cytolase PCL5.

Указанные ферментативные препараты одновременно обладают β -глюкопиранозидазной и α -рамнопиранозидазной активностями и вследствие этого обеспечивают последовательное удаление β -глюкозидного и α -рамнозидного остатков с получением желаемого продукта.

Ферментативный гидролиз проводят в водном растворе, забуференном до pH 5, или в воде, содержащей до 30 об.% этанола. Было установлено, что на практике присутствие этанола не оказывает нежелательного влияния на ферментативную активность: в присутствии этанола наблюдается увеличение β -глюкопиранозидазной активности, и хотя α -рамнопиранозидазная активность несколько уменьшается, такое падение активности никоим образом не влияет на реакцию настоящего изобретения. Для полного растворения десглюкорусцина необходимо присутствие около 30% об./об. этанола, тогда как для рускозида требуются более низкие количества, порядка 17% об./об. В связи с этим применение последнего из указанных веществ в некоторых случаях более предпочтительно, поскольку оно не требует специальных предварительных обработок, а также в связи с тем, что поверхностно-активные свойства этого вещества обеспечивают растворение десглюкорусцина, образующегося на первой стадии ферментативного гидролиза, причем последующая трансформация в α -рамнопиранозидазу осуществляется более эффективно.

Концентрация рускосапонины может иметь значение в интервале 5-40% мас./об., причем реакцию гидролиза проводят при температурах в интервале 20-50°C в течение времени от 3 до 7 дней.

По окончании процесса биопревращения конечный продукт - десглюкодесрамнорусцин, не растворимый в реакционной системе, может быть легко выделен центрифугированием и последующей промывкой метанолом. Кроме этого, благодаря стабильности используемого фермента способ согласно изобретению может осуществляться непрерывно, с удалением в определенное время гидролизованного продукта и непрерывным добавлением свежего субстрата. Для этой цели с тем, чтобы исключить накопление ингибиторов и денатурированных молекул, предпочтительно использовать биореактор, снабженный ультрафильтрационной мембраной.

Следующий ниже пример более подробно иллюстрирует настоящее изобретение.

Пример

Ферментный препарат Cytolase PCL5 (Gist Brocades) перед применением подвергали диалитической протации против 0,1М цитрат-фосфатного буфера с pH 5 в аппарате Amicon, снабженном мембраной XM (отсечение 50 кДа) с целью удаления денатурирующих агентов и ингибиторов.

Смесь для инкубации готовили добавлением в указанный порядок следующих материалов: субстрата (десглюкорусцин или рускозид), 0,1М цитрат-фосфатного буфера с pH 5, Cytolase PCL5 и при медленном перемешивании этанола. Концентрация субстрата

может изменяться в интервале 5-40% (мас./об.), а концентрация этанола в интервале 0-30% (об./мас.). Ход реакции контролировали методом ТСХ на силикагелевых пластинах (60 F250 Merck), используя смесь этилацетат/метанол/вода в соотношении 100:15:10, в качестве элюента. Активность ферментативного препарата составляла 38
5 единиц β -глюкопиранозидазы и 2,3 единицы α -рамнопиранозидазы в расчете на мл инкубационной смеси.

Биопревращение проводили при температуре 25°C. Трансформация в десглюкодесрамнорусцин завершалась за 72 часа при использовании десглюкорусцина в качестве исходного вещества и за 96 часов при использовании рускосида в качестве
10 исходного материала.

После этого инкубационную смесь центрифугировали с нагрузкой в 12100 г в течение 30 минут при 4°C. Осадок промывали метанолом и снова центрифугировали при указанных выше условиях. Указанную стадию повторяли пять раз и супернатанты сливали. Затем метанольный раствор выпаривали в вакууме и полученный в результате продукт растирали
15 в порошок с получением тонкоизмельченного темно-желтого порошка, содержащего 20% десглюкодесрамнорусцина (анализ методом ВЭЖХ).

Формула изобретения

1. Способ получения десглюкодесрамнорусцина, включающий ферментативный гидролиз стероидных гликозидов *Ruscus aculeatus* (рускосапонинов) с помощью
20 неочищенных гидролаз из *Aspergillus niger*.

2. Способ по п.1, в котором неочищенная гидролаза представляет собой препарат Cytolase PCL5.

3. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором гидролиз осуществляют в водном растворе с pH 5, или в водно-этанольной смеси, содержащей до 30 об.% этанола.
25

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором концентрация рускосапонина составляет 5-40% мас./об.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором гидролиз проводят при температурах в интервале 20-40°C в течение времени от 3 до 7 дней.
30

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором конечный продукт выделяют центрифугированием и промывкой метанолом.