

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/59143 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P 19/02, 19/60
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/01447
- (22) Internationales Anmeldedatum:
9. Februar 2001 (09.02.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 06 147.8 11. Februar 2000 (11.02.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter
Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **OHREM, Hans-Leon-
hard** [DE/DE]; Gutenbergstrasse 6 a, 64342 Jugenheim
(DE). **SCHWÄMMLE, Achim** [DE/DE]; Holzstrasse 1,
64283 Darmstadt (DE).
- (74) Anwalt: **GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR
& SCHWANHÄUSSER**; Maximilianstrasse 58, 80538
München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.



WO 01/59143 A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING MONOGLYCOSIDATED FLAVONOIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON MONOGLYCOSIDIERTEN FLAVONOIDEN

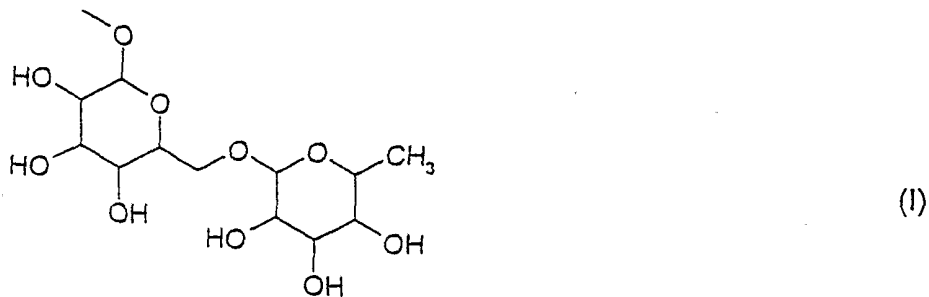
(57) Abstract: The invention relates to a method for producing monoglycosidated flavonoids by enzymatic hydrolysis of rutinoides, using an enzyme immobilized on a carrier for the enzymatic hydrolysis. The inventive method reduces the costs for the enzymes, and simultaneously provides for a high degree of automation associated and an optimized space/time yield.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoglycosidierten Flavonoiden durch enzymatische Hydrolyse von Rutinosiden, wobei für die enzymatische Hydrolyse ein Enzym, das auf einem Träger immobilisiert ist, verwendet wird. Durch dieses Verfahren können hohe Enzymkosten vermieden werden, und es wird gleichzeitig ein hoher Automatisierungsgrad verbunden mit einer hohen Raum/Zeitausbeute erreicht.

Verfahren zur Herstellung von monoglycosidierten Flavonoiden

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoglycosidierten Flavonoiden durch enzymatische Hydrolyse von Rutinosiden. Dabei wird der Rhamnoseresest der Rutinoside enzymatisch abgespalten.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden als Rutinoside solche Verbindungen bezeichnet, die einen zuckerfreien Bestandteil enthalten, an welchen ein Rest der Formel (I)



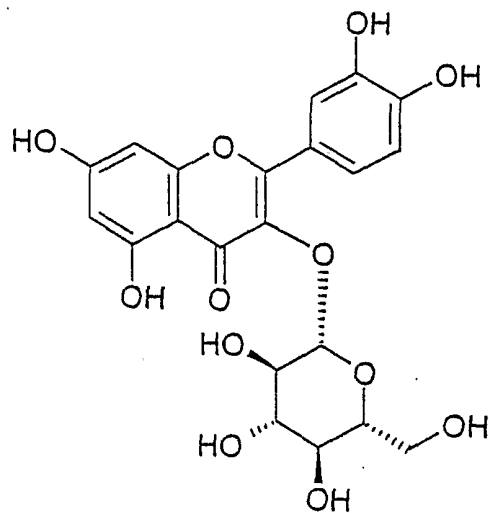
über eine glycosidische Bindung gebunden ist. Beispielsweise handelt es sich bei den Rutinosiden um Flavonoide mit der in Formel (I) dargestellten bisglycosidischen Einheit. Rhamnose und/oder die entsprechenden Glucopyranoside können aus den Rutinosiden gewonnen werden. Die Glucopyranoside leiten sich von den Rutinosiden dadurch ab, dass sie anstelle des Rests der Formel (I) einen Rest der Formel (I*)



enthalten, der an den zuckerfreien Bestandteil gebunden ist. Beispielsweise können aus Rutin sowohl Rhamnose als auch Isoquercetin gewonnen werden.

Rhamnose ist ein Monosaccharid, welches in der Natur weit verbreitet, allerdings zu-
meist nur in geringen Mengen vorkommt. Eine wichtige Quelle für Rhamnose sind z.B.
die glycosidischen Reste natürlicher Flavonoide, wie Rutin, aus welchen die Rhamnose
durch Glycosidspaltung gewonnen werden kann. Rhamnose spielt beispielsweise eine
wichtige Rolle als Ausgangsstoff für die Darstellung von künstlichen Aromastoffen,
wie Furaneol.

Isoquercetin ist ein monoglycosidiertes Flavonoid der folgenden Strukturformel (II)



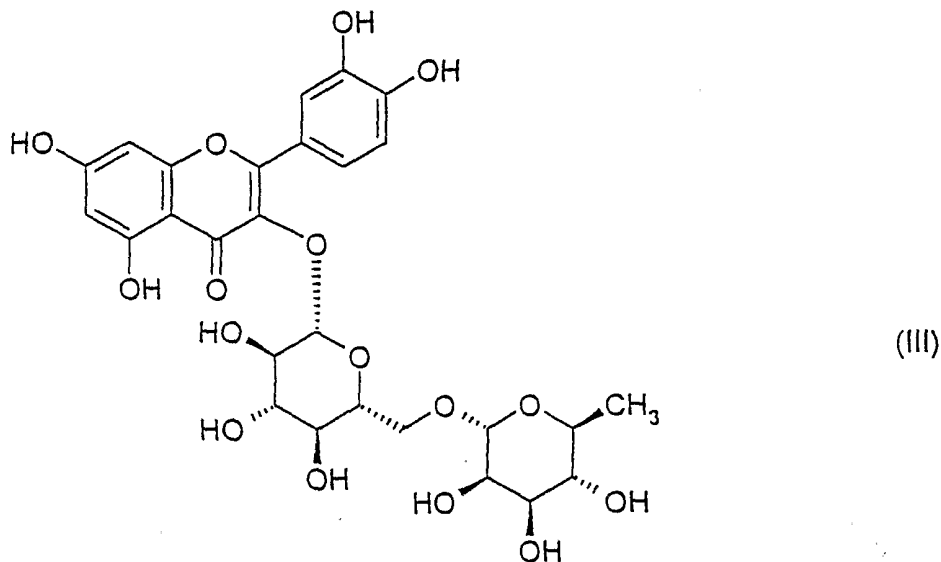
(II)

Als Flavonoide (lat. flavu = gelb), die in Pflanzen weit verbreitete Farbstoffe sind, werden
z.B. Glycoside von Flavonen, denen das Grundgerüst des Flavons (2-Phenyl-4H-1-
benzopyran-4-on) gemeinsam ist, bezeichnet.

Der zuckerfreie Bestandteil der Flavonoide ist das sogenannte Aglykon. Isoquercetin ist
beispielsweise ein Glycosid des Aglykons Quercetin (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-
trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on), welches sich von Flavon durch das Vorhandensein
von fünf Hydroxylgruppen unterscheidet. Im Isoquercetin ist der Kohlenhydratrest Glu-
cose an die Hydroxylgruppe in Position 3 des Quercetins gebunden. Isoquercetin wird
z.B. als Quercetin-3-O- β -D-glucopyranosid oder 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3-(β -D-
glucopyranosyloxy)-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on bezeichnet. Es ist aber
beispielsweise auch unter dem Namen Hirsutrin bekannt.

Flavonoide bzw. Flavonoidgemische werden beispielsweise in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie verwendet und gewinnen dort zunehmend an Bedeutung. Besonders monoglycosidierte Flavonoide, wie z.B. Isoquercetin, zeichnen sich durch eine gute Aufnahmefähigkeit im menschlichen Körper aus.

Ein Beispiel für ein natürlich vorkommendes Flavonoid mit bisglycosidischer Einheit ist Rutin, welches folgende Strukturformel (III) besitzt:



Rutin ist wie Isoquercetin ebenfalls ein Glycosid des Aglykons Quercetin, wobei der Kohlenhydratrest Rutinose an die Hydroxylgruppe in Position 3 des Quercetins gebunden ist. Der Kohlenhydratrest im Rutin besteht aus einer in 1- und 6-Stellung verknüpften Glucose- und einer terminal gebundenen Rhamnose- bzw. 6-Deoxymannose-Einheit. Rutin wird z.B. als Quercetin-3-O- β -D-rutinosid oder 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3- $\{$ [6-O-(6-deoxy- α -mannopyranosol)- β -D-glucopyranosyl]oxy $\}$ -5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on bezeichnet. Es ist jedoch beispielsweise auch unter den Namen Sophorin, Birutan, Rutabion, Taurutin, Phytomelin, Melin oder Rutosid bekannt.

Rutin bildet mit drei Molekülen Kristallwasser blassgelbe bis grünliche Nadeln. Wasserfreies Rutin hat die Eigenschaft einer schwachen Säure, wird bei 125°C braun und zersetzt sich bei 214-215°C. Rutin, das in vielen Pflanzenarten - häufig als Begleiter

des Vitamins C - vorkommt, z.B. in Zitrusarten, in gelben Stiefmütterchen, Forsythien-, Akazienarten, verschiedene Solanum- und Nicotiana-Arten, Kapern, Lindenblüten, Johanniskraut, Tee usw., wurde 1842 aus der Gartenraute (*Ruta graveolens*) isoliert. Rutin kann auch den Blättern des Buchweizens und der ostasiatischen Färberdroge Wei-Fa (*Sophora japonica*, Fabaceae), die 13-27% Rutin enthält, gewonnen werden.

Es ist wünschenswert, sowohl Rhamnose als auch monoglycosidierte Flavonoid aus natürlichen Rohstoffen, beispielsweise aus Flavonoiden mit einer bisglycosidischen Einheit, herzustellen. In diesem Zusammenhang ist z.B. die Spaltung von Rutinosiden zu Rhamnose und den entsprechenden Glucopyranosiden interessant.

Enzymatisch katalysierte Darstellungen von Rhamnose sind in der Literatur beschrieben. Beispielsweise sind in der EP-A-0317033 ein Verfahren zur Herstellung von L-Rhamnose beschrieben, wobei die rhamnosidische Bindung von Glycosiden, die Rhamnose in terminaler Position gebunden halten, durch enzymatische Hydrolyse erreicht wird. Bei dieser Spaltung wird das Substrat üblicherweise als Suspension in einem wässrigen Medium durchgeführt. Jedoch sind diese Reaktionen zumeist wenig selektiv. Beispielsweise entsteht aufgrund der bisglycosidischen Struktur des Kohlenhydratrestes im Rutin oft eine Mischung der beiden Monosaccharide Glucose und Rhamnose. Zudem entstehen zumeist hohe Anteile am Aglykon Quercetin sowie weitere unerwünschte Nebenprodukte.

Weiterhin werden enzymatisch katalysierte Spaltungen von Rutin auch in der JP-A-01213293 beschrieben. Allerdings verlaufen derartige in wässrigen Medien durchgeführte Reaktionen zumeist ebenfalls wenig selektiv.

Diese vorstehend beschriebenen Verfahren verwenden das Enzym in Lösung, d.h. nativ. Dabei wird das Enzym direkt der Reaktionslösung zugegeben. Obwohl diese Verfahren im Labormaßstab durchführbar sind, sind sie für eine technische Anwendung nicht praktikabel, da das Enzym aus der Reaktionslösung zur erneuten Verwendung nicht zurückgewonnen werden kann. Der einmalige Gebrauch dieser teuren Enzyme ist jedoch bei einer technischen Anwendung nicht wirtschaftlich.

Es ist bekannt, dass Enzyme technisch einsetzbar sind, indem sie an einen Träger gebunden werden. Dieses Verfahren wird als „Immobilisieren“ bezeichnet. Unter dem Begriff „immobilisierte Enzyme“ werden durch die European Federation of Biotechnology (1983) alle Enzyme zusammengefasst, „... die sich in einem Zustand befinden, der ihre Wiederverwendung erlaubt“ (Helmut Uhlig, Technische Enzyme und ihre Anwendung, Carl Hanser Verlag, München/Wien 1991, S. 198). Trotz dieses Vorteils ist eine Immobilisierung jedoch nicht für alle Enzymprozesse geeignet und hat sich bisher auch nur begrenzt durchgesetzt. Insbesondere finden nur zwei immobilisierte Enzyme großtechnisch Anwendung: Die Glucoseisomerisierung mit immobilisierter Glucoseisomerase und die Penicillin-G-Spaltung mit immobilisierter Penicillinamidase. Oft können immobilisierte Enzymverfahren nicht gegenüber den freien Enzymen oder chemischen Verfahren bestehen. Oft sind auch die Enzyme oder die Reaktionsbedingungen für eine Immobilisierung nicht geeignet. Es gibt also keine Universalmethode für das Immobilisieren, und jedes Enzym muss individuell betrachtet werden.

Beispielsweise kommt es in wässrigen Systemen, wie sie für die Funktionstüchtigkeit von Enzymen wichtig sind, zu Löslichkeitsproblemen bei Rutinosiden, die bei der enzymatischen Hydrolyse als Substrat dienen. Diese Reaktion wird deshalb vorzugsweise mit einer übersättigten Substratlösung, d.h. als Rutinosidsuspension, durchgeführt. Bei einer übersättigten Lösung, in der das Substrat als Feststoff vorliegt, ist jedoch eine Anwendung der Immobilisierungstechniken unmöglich. Es mangelt dabei an der Selektivität zwischen Rohstoff und Produktpartikeln und feststoffgebundenem Enzym.

Es ist deshalb die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von monoglycosidierten Enzymen zur Verfügung zu stellen, das im technischen Maßstab angewendet werden kann, wobei hohe Enzymkosten vermieden werden und gleichzeitig ein hoher Automatisierungsgrad verbunden mit einer hohen Raum/Zeit-Ausbeute und einer hohen Produktivität und Selektivität erreicht wird.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung von monoglycosidierten Flavonoiden durch enzymatische Hydrolyse von Rutinosiden, worin für die enzymatische Hydrolyse ein Enzym, das auf einem Träger immobilisiert ist, verwendet wird.

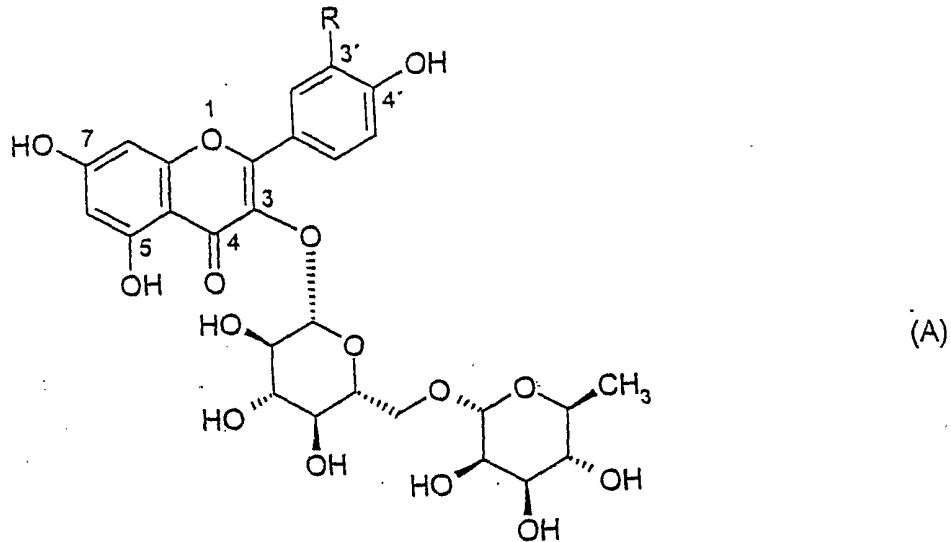
Überraschend wurde gefunden, dass trotz einer geringen Löslichkeit von Rutinosiden eine enzymatische Hydrolyse mit einem immobilisierten Enzym möglich ist. Durch die Immobilisierung kann das Verfahren kontinuierlich oder diskontinuierlich und mit einer hohen Effektivität im Vergleich zu der Reaktion mit dem nativen Enzym durchgeführt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass eine hohe Automatisierung des gesamten Verfahrens einschließlich der Rückführung des Lösungsmittels sowie der Überwachung der Enzymaktivität möglich ist.

In Abbildung 1 wird als Beispiel des erfindungsgemäßen Verfahrens die kontinuierliche Herstellung von Isoquercetin aus Rutin dargestellt.

Geeignete Rutinoside für das erfindungsgemäße Verfahren sind jene, die als zuckerfreien Bestandteil oder Aglykon einen 2-Phenyl-4H-1-benzopyran-4-on-Grundkörper enthalten, der in der Position 3 einen Rest der Formel (I) trägt und dessen Phenylgruppen, abgesehen von der Position 3, auch ein- oder mehrfach durch -OH oder $-O(CH_2)_n-H$, wobei n 1 bis 8 bedeutet, substituiert sein können. n bedeutet vorzugsweise 1.

Die Substitution des 2-Phenyl-4H-1-benzopyran-on-Grundkörpers durch -OH und/oder $-O(CH_2)_n-H$ tritt bevorzugt in den Positionen 5, 7, 3' und/oder 4' auf.

Besonders bevorzugt werden Rutinoside verwendet, die durch die Formel (A) dargestellt werden:



worin R H, OH oder OCH₃ darstellt.

Die Verbindung, worin R H darstellt, wird als Kämpferolrutinosid bezeichnet; das Rutinosid, worin R OCH₃ darstellt, ist als Isorhamnetinrutinosid bekannt. Die Verbindung, worin R OH bedeutet, wird als Rutin bezeichnet. Demzufolge können gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren aus Kämpferolrutinosid Rhamnose und Kämpferolglucosid, aus Rutin Rhamnose und Isoquercetin und aus Isorhamnetinrutinosid Rhamnose und Isorhamnetinglycosid erhalten werden.

Besonders bevorzugt wird das Rutinosid Rutin verwendet.

Als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren können die Rutinoside in reiner Form oder auch als Gemische von Rutinosiden eingesetzt werden. Ebenfalls können die Rutinoside mit anderen Flavonoiden oder mit Rückständen aus der Rutinosidproduktion verunreinigt sein, ohne dass die Reaktion negativ beeinflusst wird.

Als Enzyme für die enzymatische Hydrolyse der Rutinoside können übliche Hydrolasen verwendet werden, die in der Lage sind, den Rhamnoseresest der Rutinoside abzuspalten. Vorzugsweise werden Hydrolasen, die aus dem Stamm *Penicillium decumbens*

gewonnen werden, verwendet. Besonders bevorzugt werden als Enzyme α -L-Rhamnosidasen verwendet, da diese eine hohe Selektivität für die Hydrolyse des Rhamnoseresestes besitzen. Geeignete α -L-Rhamnosidasen sind beispielsweise Hesperidinase, Naringinase, sowie jene, die in Kurosawa et al. (1973), J. Biochem., Bd.. 73: 31-37 beschrieben werden. Es ist besonders bevorzugt, das Enzym Hesperidinase zu verwenden.

Sowohl die Rutinoside als auch die Enzyme für das erfindungsgemäße Verfahren können als Handelsprodukte erworben werden. Ebenfalls ist es möglich, die Ausgangsstoffe und Enzyme nach allgemein bekannten Methoden zu gewinnen oder herzustellen.

Das Enzym wird auf einem geeigneten Träger immobilisiert. Dabei können übliche Träger, wie Kieselgel, beispielsweise handelsübliche sphärische oder handelsübliche gebrochene Kieselgele, z.B. Lichrosorb[®], Lichroprep[®], Lichrospher[®] und Trisoperl[®], und handelsübliche polymere Träger, z.B. Eupergit[®], Fractogel[®], insbesondere Fractogel epoxy[®], und Fractoprep[®], zum Einsatz kommen. Kieselgel gilt als bevorzugtes Trägermaterial.

Alternativ können auch magnetische Partikel als Träger verwendet werden. Vorzugsweise handelt es sich dabei um Trägermaterialien mit einem magnetischen Kern. Dieser Kern ist üblicherweise von einem anorganischen Oxid umhüllt. Das anorganische Oxid ist vorzugsweise Kieselgel. Beispiele derartiger magnetischer Träger umfassen *MagneSil[™]* (Promega Corp., Madison, Wisconsin, US), *MagPrep[™]* (Merck) und *AGOWAmag[™]* (AGOWA GmbH, Berlin, DE). Als magnetische Träger können aber auch magnetische Glaspartikel (z.B. *MPG* (CPG Inc., Lincoln Park, New Jersey, US)), sowie magnetit haltige Pigmente (z.B. *Microna Matte*, *Mica Black*, *Colorona Blackstar* (alle Merck)) eingesetzt werden. Besonders gut eignen sich unporöse magnetische Partikel (wie *MagPrep*), da es bei diesen nicht zu einer Porenverblockung kommen kann, wodurch sich die Enzymaktivität drastisch verschlechtern würde.

Der Enzymträger besitzt üblicherweise die folgenden Eigenschaften: Die Teilchengröße des Trägers beträgt vorzugsweise 0,005 bis 1 mm, noch bevorzugter 0,01 bis 0,5 mm.

Der Porendurchmesser liegt üblicherweise im Bereich von 10 bis 4000 nm, wobei ein Porendurchmesser von 30 bis 100 nm besonders bevorzugt ist. Durch eine ausreichend große Porengröße kann sichergestellt werden, dass das Enzym ohne Aktivitätsverlust auf dem Träger Platz findet. Die Partikeloberfläche beträgt vorteilhafterweise 40 bis 100 m²/g, und das Porenvolumen wird vorzugsweise aus einem Bereich von 0,5 bis 3 ml/g ausgewählt. In manchen Fällen kann auch ein sehr großer Porendurchmesser von 2 bis 20 µm geeignet sein.

Das Enzym kann kovalent oder adsorptiv gekuppelt werden. Generell ist eine kovalente Kupplung vorzuziehen. Beispiele einer kovalenten Kupplung beinhalten eine Epoxidierung, eine Carbodiimidmethode, Silanisierung, eine Bromcyanmethode, eine Glutaraldehydvernetzung oder eine Dicyesylchloridmethode (siehe *Biotransformations and Enzyme Reactions*, Bommarius, A.S., *Biotechnology* (2. Aufl.), Bd.3, S. 427-465, zusammengestellt von Stephanopoulos, G., VCH Weinheim, Deutschland 1993, Walt, D.R. et al., *trends in analytical chemistry*, Bd. 13, Nr. 10, 1994, N.H. Park, H.N. Chang; *J. Ferment. Technol.*, Bd. 57 (4), 310-316, 1979, M. Puri et al.; *Enz. Microb. Technol.*, 18, 281-285, 1996 und H-Y. Tsen; *J. Ferment. Technol.*, 62 (3), 263-267, 1984). Zur Durchführung dieser Verfahren ist es notwendig, dass der Träger mit entsprechenden funktionellen Gruppen oberflächenmodifiziert wird. Die funktionelle Gruppe kann am Träger entweder durch Copolymerisation mit funktionellen Monomeren oder durch Polymeranalogumsetzung vollzogen werden. Besonders bevorzugt ist eine Oberflächenmodifikation mit Aminoresten, Aldehydgruppen, Epoxygruppen, oder eine Diolmodifizierung. An diese Gruppen können dann die Enzyme kovalent gebunden werden.

Die enzymatische Hydrolyse findet in einem geeigneten Reaktor statt. Für eine kontinuierliche Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eignet sich insbesondere eine handelsübliche Säule. Im kleinen Maßstab kann beispielsweise eine Säule, wie sie für die präparative HPLC verwendet wird, eingesetzt werden. Der Reaktor, insbesondere die Säule, sollte einen hohen hydraulischen Wirkungsgrad aufweisen. Dies kann durch die Zahl der theoretischen Böden quantifiziert werden. Deshalb ist es von Vorteil, dass es zu einem intensiven Kontakt der Rohstofflösung mit der Oberfläche des Immobilisats kommt, um die wirksame Nutzung des Enzyms zu gewährleisten und eine hohe Produktivität zu erreichen. Die erwähnte präparative HPLC-Säule erfüllt diese Anforder-

rungen und ist ebenfalls mit der entsprechenden Technik mit Peripherie (Pumpen, Ventile, Steuerung) ausgestattet. Es ist ebenfalls von Vorteil, dass hierfür bereits Detektionstechniken, wie UV- oder RI-Detektionstechniken entwickelt wurden, so dass, wenn erwünscht, die Messung und Regelung des Umsatzgrades der Reaktion automatisiert durchgeführt werden kann.

Werden bei der kontinuierlichen Fahrweise magnetische Trägermaterialien eingesetzt, werden üblicherweise Rohrreaktoren mit einer Vorrichtung eingesetzt, die die magnetischen Partikel stabil in Schwebelage halten, z.B. elektromagnetische Spulen, die im Strömungsröhre ein weitgehend homogenes Magnetfeld erzeugen, dessen Feldlinien parallel zur Strömungsrichtung verlaufen (Helmholtz-Magnetfeld). In solchen magnetisch stabilisierten Wirbelschicht- oder Fließbett-Reaktoren (*Magnetically stabilized fluidized bed (MSFB)*) können wesentlich höhere Strömungsgeschwindigkeiten erreicht werden als in konventionellen Wirbelschichten oder Fließbettkolonnen, die aber auch für diese Zwecke geeignet sind. Diese Technologie kann auch vorteilhaft für Katalysereaktionen in viskosen Reaktionsmedien eingesetzt werden.

Für eine diskontinuierliche Durchführung des Verfahrens eignet sich ein üblicher Behälter, der vorzugsweise mit einer Rührvorrichtung ausgestattet ist. So kann im kleinen Maßstab ein Rundkolben mit Rührer und im großen Maßstab ein Rührkessel eingesetzt werden.

Das Immobilisat wird vor der Reaktion auf übliche Weise in den Reaktor gepackt.

Das umzusetzende Rutinosid wird in den Reaktor, z.B. eine Säule, wie eine Festbettaule, üblicherweise in Form einer Lösung oder Suspension gespeist. Handelt es sich bei dem Reaktor um einen Festbettreaktor sollte die Rutinosidlösung vollkommen feststofffrei sein. Es ist dabei von Vorteil, das Rutinosid mit dem Lösungsmittel in einem Tank, vorzugsweise unter Rühren und/oder Erwärmen, vorzulösen, um eine optimale Löslichkeit zu erreichen. Wenn notwendig, kann außerdem eine Vorfiltration der Lösung durchgeführt werden, um mögliche Feststoffe zu entfernen. Das Lösungsmittel ist vorzugsweise ein wässriges System, um die Enzymaktivität zu gewährleisten und mögliche Denaturierungen zu verhindern. Um die Lösung der Rutinoside zu gewährleisten, kön-

nen zusätzlich weitere Lösungsmittel zugegeben werden. Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren in Gegenwart eines Lösungsmittelgemisches aus Wasser und mindestens einem organischen Lösungsmittel durchgeführt.

Das oder die zusätzlich vorhandenen organischen Lösungsmittel umfassen sowohl organische Lösungsmittel, die mit Wasser mischbar sind, als auch organische Lösungsmittel, die nicht mit Wasser mischbar sind.

Geeignete Lösungsmittel für das erfindungsgemäße Verfahren sind Nitrile, wie Acetonitril, Amide, wie Dimethylformamid, Ester, wie Essigsäureester, insbesondere Essigsäuremethylester oder Essigsäureethylester, Alkohole, wie Methanol oder Ethanol, Ether, wie Tetrahydrofuran oder Methyl-tert-butylether und Kohlenwasserstoffe, wie Toluol. Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren in Gegenwart eines oder mehrerer der organischen Lösungsmittel Essigsäureester, Methanol, Ethanol, Methyl-tert-butylether oder Toluol durchgeführt. Besonders bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren in Gegenwart eines oder mehrerer Essigsäureester, insbesondere in Gegenwart von Essigsäuremethylester, zusätzlich zu Wasser durchgeführt.

Geeignete Volumenverhältnisse von Wasser zu organischem Lösungsmittel für das erfindungsgemäße Verfahren sind Verhältnisse von 1:99 bis 99:1. Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren mit Volumenverhältnissen von Wasser zu organischem Lösungsmittel von 20:80 bis 80:20, insbesondere mit Volumenverhältnissen von 50:50 bis 70:30 durchgeführt.

Die Menge an Rutinosid in dem Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch für das erfindungsgemäße Verfahren ist abhängig von der Löslichkeit des Rutinosids in dem Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch. Zur optimalen Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sollte das Rutinosid gut löslich sein. Deshalb wird vorzugsweise mit einer untersättigten Lösung gearbeitet. Üblicherweise beträgt die Menge an Rutinosid im Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch 0,001 bis 5 g/l, vorzugsweise 0,05 bis 2 g/l, noch bevorzugter 0,1 bis 1,5 g/l.

Das Verhältnis von Rutinosid zu Immobilisat bzw. Enzym hängt von der Lebensdauer des Enzyms in der Säule und seiner Aktivität in immobilisierter Form ab.

Die Reaktion wird üblicherweise bei einer Temperatur von 15 bis 80°C durchgeführt. Bevorzugt ist eine Temperatur von 30 bis 60°C, insbesondere ist eine Temperatur von 40 bis 50°C von Vorteil, um einer möglichen Zerstörung des Enzyms entgegenzuwirken und gleichzeitig eine hohe Löslichkeit des Rutinosids zu gewährleisten

Wenn die Reaktionstemperatur zu niedrig ist, läuft die Reaktion durch absinkende Enzymaktivität mit einer unangemessenen langsamen Reaktionsgeschwindigkeit ab. Außerdem verringert sich die Löslichkeit des Rutinosids derart, dass unnötig hohe Lösungsmittelmengen notwendig werden. Wenn die Reaktionstemperatur dagegen zu hoch ist, wird das Enzym, welches ein Protein ist, denaturiert und somit deaktiviert.

Wenn das erfindungsgemäße Verfahren bei einer erhöhten Temperatur durchgeführt werden soll, kann der Reaktor mit einer Temperiereinrichtung versehen werden. Übliche Temperiereinrichtungen beinhalten ein Heizschlangensystem oder Doppelmantel. Es ist weiterhin von Vorteil, wenn das umzusetzende Rutinosid und insbesondere die Rutinosidlösung vor Eintritt in den Reaktor temperiert wird. Zu diesem Zweck ist es üblich, dass die Rutinosidlösung aus einem temperierten Tank, der auf die für die Reaktion gewünschte Temperatur eingestellt ist, gespeist wird. Alternativ kann die einzuspeisende Lösung durch einen beheizbaren Schlauch geleitet werden, um die gewünschte Temperatur vor Eintritt in den Reaktor einzustellen. Durch die Temperierung können ebenfalls mögliche Auskristallisierungen des Rutinosids vermieden werden.

Geeignete pH-Werte für das erfindungsgemäße Verfahren sind pH-Werte zwischen 3 und 8. Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren bei pH-Werten von 3 bis 7 durchgeführt, insbesondere bei pH-Werten von 3 bis 6. Weiterhin bevorzugte pH-Werte können jedoch je nach verwendetem Enzym innerhalb der gegebenen Grenzen variieren. Beispielsweise sind pH-Werte von 3,8 bis 4,3 bei Verwendung des Enzyms Hesperidinase ganz außerordentlich bevorzugt.

Vorzugsweise wird das Verfahren derart ausgeführt, dass der pH-Wert mit Hilfe eines Puffersystems eingestellt wird. Prinzipiell können alle gängigen Puffersysteme, die zur Einstellung der obengenannten pH-Werte geeignet sind, verwendet werden. Bevorzugt wird jedoch wässriger Citratpuffer verwendet.

Das Rutinosidgemisch, das in Form einer Lösung oder einer Suspension vorliegen kann, wird in den Reaktor, der das Immobilisat enthält, gegeben, um die enzymatische Hydrolyse durchzuführen. Diese Reaktion kann batchweise, d.h. diskontinuierlich, oder kontinuierlich durchgeführt werden.

Wird die Reaktion diskontinuierlich durchgeführt, dann wird üblicherweise eine Rutinosid-suspension in den Reaktor gegeben. Der Umsatzgrad wird durch die Menge an Rutinosid und Immobilisat bestimmt. Üblicherweise liegt das Verhältnis von Rutinosid zu Immobilisat bei 100:1 bis 1:1000, vorzugsweise 10:1 bis 1:100, noch bevorzugter 1:1 bis 1:20. Das Verhältnis des Immobilisats zum Gesamtvolumen der Suspension beträgt üblicherweise 1:1000 bis 1:1, vorzugsweise 1:100 bis 1:2, noch bevorzugter 1:50 bis 1:5. Die Verweilzeit im Reaktor beträgt normalerweise 1h bis 10 Tage, vorzugsweise 8 h bis 4 Tage, noch bevorzugter 1 bis 2 Tage.

Wird die Reaktion kontinuierlich durchgeführt, dann wird eine Rutinosidlösung üblicherweise permanent und kontinuierlich mit einer geeigneten Pumpe durch den Reaktor, vorzugsweise eine Säule oder MSFB-Reaktor, gefördert. Durch die entsprechende Einstellung der Fließgeschwindigkeit kann ein beliebig hoher Umsatzgrad erreicht werden. Normalerweise wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,001 bis 1 mm/s, bezogen auf den leeren Rohrquerschnitt der Säule, gearbeitet.

Die Aktivität des Enzyms in dem System nimmt erfahrungsgemäß mit der Zeit ab. Es ist deshalb notwendig, dass das Immobilisat in regelmäßigen Abständen ganz oder teilweise erneuert wird. Um einen Aktivitätsverlust der Enzyme auszugleichen, ist es vorteilhaft, den Umsatzgrad durch UV- oder RI-Detektion auszuwerten, so dass bei einer Änderung der Zusammensetzung eine Steuerung über die Pumpenleistung der Änderung entgegensteuert.

Nach Austritt der Reaktionslösung kann das erhaltene Produkt getrennt werden. Nach beendeter Reaktion besteht das Reaktionsgemisch hauptsächlich aus Lösungsmittel, nichtumgesetztem Rutinosid, Rhamnose, dem gewünschten monoglycosidierten Flavonoid und möglicherweise weiteren Zusätzen, wie Puffer. Üblicherweise fällt das monoglycosidierte Flavonoid aus, sobald die Löslichkeitsgrenze erreicht ist und reichert sich nach und nach als Feststoff an.

Bei einer diskontinuierlichen Fahrweise mit magnetischen Trägermaterialien kann das immobilisierte Enzym nach beendeter Reaktion auf einfache Weise mit Hilfe einer magnetischen Abscheidevorrichtung von der Produktsuspension abgetrennt werden. Im Labormaßstab kann dazu ein starker Permanentmagnet in Plattenform verwendet werden. Es gibt aber auch größere Separatoren, die für verschiedenste industrielle Anwendungen entwickelt wurden und meist nach dem HGMS-Prinzip arbeiten (*High gradient magnetic separation*). Eine solche Anlage kann z.B. aus einem senkrecht stehenden Strömungsrohr bestehen, das eine Packung aus feinen Edelstahldrähten enthält. Mittels geeignet angeordneter elektromagnetischer Spulen werden an den Drähten hohe Magnetfeldgradienten erzeugt und dadurch eine sehr effektive Abtrennung selbst kleinster Partikel im Größenbereich von Nanometern erzielt. Sofern die Magnetpartikel superparamagnetisch sind, d.h. in Abwesenheit eines äußeren Magnetfeldes keine Remanenzmagnetisierung aufweisen, können sie nach Abschalten des Magnetfeldes durch wiederholtes Spülen mit Wasser problemlos wieder vollständig aus dem Separator entfernt werden.

Die Isolierung des gewünschten Reaktionsprodukts erfolgt nach gängigen Methoden bei üblicher Aufarbeitung.

Vorzugsweise wird das Produkt bei Aufkonzentrierung ausgefällt. Wenn das Lösungsmittel ein Lösungsmittelgemisch, enthaltend mindestens ein organisches Lösungsmittel, enthält, ist es bevorzugt, dass das organische Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert wird. Das auskristallisierende monoglycosidierte Flavonoid wird üblicherweise vom restlichen Reaktionsgemisch durch eine Fest/Flüssigtrennung, wie Absaugen bzw. Filtration unter vermindertem Druck oder durch Abschleudern der ausgefallenen

Kristalle, getrennt. Anschließend wird der Feststoff gewaschen, vorzugsweise mit Wasser und danach getrocknet.

Alternativ kann zunächst der gesamte Reaktorinhalt abfiltriert werden. Der Filterkuchen, der das Produkt enthält, wird anschließend mit einem Lösungsmittel oder einem Puffer-Lösungsmittelgemisch behandelt, in dem das Produkt löslich ist. Dabei wird das Reaktionsprodukt aus dem Filterkuchen extrahiert.

Bei einer diskontinuierlichen Fahrweise bleibt der in diesem Gemisch der unlösliche Katalysator, das Immobilisat, zurück. Dafür ist es notwendig, dass sich das Lösungsmittel oder das Puffer-Lösungsmittelgemisch nicht nachteilig auf das Enzym auswirken. Es hat sich gezeigt, dass das immobilisierte Enzym, z.B. Naringinase oder Hesperidinase, in bestimmten Lösungsmittel-Puffergemischen oder unter mäßig alkalischen Bedingungen zwar keinerlei oder nur einen Bruchteil der ursprünglichen Aktivität besitzt, dass aber die Aktivität praktisch vollständig wiederhergestellt werden kann, wenn das Enzym anschließend sorgfältig mit einem Puffer im pH-Bereich 4-6 gespült wird; es handelt sich also um einen vorübergehenden Aktivitätsverlust, nicht um eine irreversible Denaturierung des Enzyms.

Für diese Prozedur sehr gut geeignete Extraktionsmittel sind Tetrahydrofuran-Puffer-Gemische – vorzugsweise mit einem Tetrahydrofuran-Anteil von 10-25%, insbesondere auch bei leicht erhöhter Temperatur. Andere geeignete Extraktionsmittelkomponenten sind z.B. 1-Propanol, 2-Propanol, 1,4-Dioxan und Methylacetat. Das Produkt lässt sich aus dem Extrakt sehr leicht zurückgewinnen, indem man das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abdestilliert und die wässrige Produktlösung anschließend auf 0 bis 10°C abkühlt. Das Reaktionsprodukt kristallisiert aus der Mutterlauge in sehr hoher Reinheit aus.

Alternativ zu Lösungsmittel/Puffer-Gemischen kann auch eine verdünnte Ammoniak- oder Sodalösung als Extraktionsmittel eingesetzt werden, da das Reaktionsprodukt phenolische OH-Gruppen besitzt, welche bereits in schwach basischem Medium deprotoniert werden; das Anion des Reaktionsproduktes ist vergleichsweise gut löslich, allerdings auch sehr oxidationsempfindlich, was sich durch eine allmähliche Verfärbung

des Extraktes von gelb nach braun bemerkbar macht. Daher sollte bei dieser Variante zügig gearbeitet werden, d.h. die Extraktion sollte innerhalb von 10 min bis 6 h, vorzugsweise 20 min bis 2 h abgeschlossen sein. Vorzugsweise ist unter einer Schutzgasatmosphäre zu arbeiten.

Auch durch die Behandlung mit schwach basischen Extraktionsmitteln, wie wässrigen Lösungen von Alkali- oder Ammoniumsalzen der Essigsäure, Oxalsäure, Citronensäure, Phosphorsäure, Borsäure oder Kohlensäure, oder wässrigen Lösungen von Alkylaminen, Piperidin oder Pyridin, geht die Enzymaktivität nicht verloren. Durch Ansäuern des Extrakts und Abkühlung auf 0-10°C kann das Reaktionsprodukt wieder ausgefällt werden.

Die Reinheit des erhaltenen monoglycosidierten Flavonoids bei Einsatz von reinem Rutinosid ist normalerweise größer als 94%. Zur weiteren Reinigung kann das Endprodukt beispielsweise aus geeigneten Lösungsmitteln umkristallisiert werden, z.B. aus Wasser oder aus Lösungsmittelgemischen, bestehend aus Toluol und Methanol oder Wasser und Essigsäuremethylester.

Die anfallende Menge an Lösungsmittel nach der Reaktion wird vorzugsweise zurückgewonnen, um die Wirtschaftlichkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens zu gewährleisten. Diese Rezirkulation erfolgt üblicherweise kontinuierlich und automatisiert. Hierfür bieten sich handelsübliche Verdampferanlagen mit entsprechender Steuerung an. Handelt es sich bei dem einzusetzenden Lösungsmittel um ein Lösungsmittelgemisch aus Wasser und mindestens einem organischen Lösungsmittel, ist es in der Regel nicht möglich, das Destillat sofort wieder für das Verfahren einzusetzen, da sich die Lösungsmittelverhältnisse durch das Abdestillieren des organischen Lösungsmittels verändert haben. Durch automatische Qualitätsmessung und Korrektur kann das gewünschte Lösungsmittelverhältnis dabei wiederhergestellt werden und das Lösungsmittel somit rückgeführt werden.

Weiterhin können bei der Aufkonzentrierung Membranprozesse oder Nanofiltration durchgeführt werden. Bei diesen Verfahren wird das Lösungsmittelgemisch ohne Änderung der Zusammensetzung abgetrennt.

Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung verdeutlichen. Sie sind jedoch keinesfalls als beschränkend zu betrachten.

Beispiel 1

Immobilisierung des Enzyms Hesperidinase auf einem Kieselgelträger

1) Trägeroberflächenkonditionierung zur Immobilisierung

1.1) Eigenschaften des Trägermaterials

Kieselgel LiChrospher

Durchmesser = 15 - 40 μm

Porendurchmesser = 300 \AA

Partikeloberfläche = 80 m^2/g

Porenvolumen = 0,73 ml/g

Dichte = 2 g/ml

1.2) Kieselgel-Aktivierung

250 g Kieselgel werden mit genügend HCl (7%) in einer 1 L-Flasche vermengt und über Nacht stehen gelassen, um das Kieselgel zu befeuchten.

Anschließend wird die Kieselgelsuspension mit VE-Wasser chloridfrei gewaschen. Dazu muss man nach jeder Waschung den Überstand mit Salpetersäure und Silbernitrat testen. Die Waschung wird wegen der Eigenschaften der Kieselgelpartikel auf einem ca. 24 cm-Durchmesser-Keramiktrichter durchgeführt.

1.3) Oberflächenmodifikation mit Aminogruppen

Das säurebehandelte Kieselgel wird in einem 2 L-Dreihalskolben, der mit einem Rückflußkühler sowie einem Tropftrichter ausgestattet ist, zusammen mit genügend Wasser gemischt, so dass es rührfähig wird. Bei Raumtemperatur und guter Durchmi-

schung tropft man 1 mmol/g Träger des 3-Aminopropyltrimethoxysilans (für 250 g Kieselgel braucht man 135 ml Lösung) mit einer Geschwindigkeit von ca. 5 Tropfen/s zu der Kieselgelsuspension zu. Anschließend wird die Suspension 2 Stunden bei 90°C gerührt. Danach wird die Suspension mit Eis gekühlt.

Der Überstand muss mittels pH-Wert Messung auf mögliche Reste von 3-Aminopropyltrimethoxysilan überprüft werden. Die Beadsuspension wird mit VE-Wasser so lange gewaschen, bis der pH-Wert konstant bleibt.

1.4) Glutardialdehydbelegung

Zu der erhaltenen Kieselgelsuspension wird Glutardialdehyd (GDA) in einer Konzentration von 1 mmol/g Träger (für 250 g Träger braucht man 13 ml 50%-ige GDA-Lösung) zugegeben. Die Suspension (plus etwas Wasser) wird 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer 1 L-Flasche gerollt. Am Anfang ist die Suspension gelb gefärbt, und am Ende wird sie dunkelrot.

Anschließend wird der Überstand von jedem Waschen durch eine Fällungsreaktion mit Dinitrophenylhydrazin auf Glutardialdehydreste überprüft. Die Suspension wird sorgfältig gewaschen, bis der Test negativ ist.

2) Immobilisierung

2.1) Hesperidinase

Erste Proteinzugabe

3,8 g Hesperidinase werden in 500 ml Citrat/Phosphatpuffer (pH = 6,0) gerührt. Zum besseren Lösen werden 300 µl Tenside (Tween 20) zugegeben. Anschließend wird die Enzymlösung filtriert.

In einer 1 L-Flasche werden ca. 230 g der unter 1.4) erhaltenen Kieselgelsuspension mit der Enzymlösung vermengt. Anschließend wird die Enzym-Trägersuspension ca. 40 Stunden bei Raumtemperatur gerollt.

Zweite Proteinzugabe

ca. 0,76 g Hesperidinase (Amano) werden in 120 ml Citrat/Phosphatpuffer (pH = 6,0) mit 60 µl Tensiden gerührt und später filtriert.

Die Enzymlösung wird in die vorstehend genannte 1 L-Flasche gegossen, und die Enzymlösung wird bei Raumtemperatur gerollt.

2.2) BSA (für den Trennungstest)

0,3 Biomex BSA (Rinderserumalbumin-Pulver) werden in 100 ml Citrat/Phosphatpuffer (pH = 6,0) gerührt. In einer 0,5 L-Flasche werden ca. 20 g der unter 1.4) erhaltenen Kieselgelsuspension mit der Proteinlösung vermengt, und 60 µl ProClin300 werden zugegeben.

3) Proteinmengen- und Aktivitätsbestimmung

3.1) Proteinmenge (mg Protein/ml)

Der Proteingehalt einer Lösung wird mittels Bradford-Test bestimmt. Es wird das Standard-Assay durchgeführt. Dabei werden 20 µl Probe in 1 ml Bradford-Farbstoff-Reagenz (1:5 verdünnt) gemischt und nach 15 min im Photometer bei 595 nm gemessen.

Bei sehr geringen Proteinkonzentrationen muss das Microassay durchgeführt werden. Dabei werden 0,8 ml Probe in 0,2 ml Bradford-Farbstoff-Reagenz (konzentriert) gemischt und nach 15 min im Photometer bei 595 nm gemessen.

3.2) Aktivität

Die Aktivität einer Lösung wird durch die Reaktion mit einem Ersatzsubstrat gemessen.
Für jede Probe nimmt man:

88 μ l Citrat/Phosphatpuffer (pH = 4,0)

100 μ l Probe

20 μ l Probe

20 μ l Ersatzsubstrat: p-Nitrophenyl- α -L-Rhamnosid (Rhamnosidase-Aktivität)

p-Nitrophenyl- α -L-Glucosid (Glucosidase-Aktivität)

Diese 1 ml Lösung wird in einem Eppendorfreaktionsgefäß vermischt. Nach einer Inkubationszeit von je 2 und 5 min bei 40°C im Schüttler, werden je 100 μ l des Reaktionsgemisches mit 1 ml 1 M-Sodalösung vermischt. Dann wird die Konzentration von p-Nitrophenol im Photometer bei 400 nm gemessen. Die Aktivität errechnet sich durch Konzentrationsänderung von p-Nitrophenol pro Zeit.

Die Aktivität eines Enzyms wird in Units (U) (= μ mol umgesetztes Substrat je Minute) angegeben.

4) Ergebnisse

PROTEINGEHALT und AKTIVITÄTSWERTE
(FREIE HESPERIDINASE)

Probe ¹	Proteinmenge (Standard-Assay)		Aktivität (Ersatzsubstrat)		
	mg	mg/ml Probe	U	U/ml Probe	U/mg Protein
<i>Hesp0</i>	740	1,48	48000	96	65
1	15	0,03	7	0,014	0,47
2	20	0,04	4	0,008	0,2
<i>Hesp1</i>	326	2,72	11400	95	35
3	56	0,09	1450	2,33	26
4	28	0,045	361	0,58	13
5	22	0,035	95	0,15	4,3
6	20,5	0,033	11	0,018	0,54

¹Hesp0: erste Proteinzugabe

Hesp1: zweite Proteinzugabe

Proben 1-6: Überstand

PROTEINGEHALT und AKTIVITÄTSWERTE
(IMMOBILISIERTE HESPERIDINASE)

* Proteingehalt des Trägers \cong 1,045 g gebundenes Protein

* Auf den Träger sind 4,7 mg Protein/g Träger

* 2% des zugegebenen Proteins wurden nicht gebunden

Beispiel 2

Herstellung von Isoquercetin aus Rutin durch enzymatische Hydrolyse unter Verwendung eines Immobilisats.

In einem heizbaren 4,5 m³-Rührkessel (1) werden 3200 l VE-Wasser und 800 l 1-Propanol vorgelegt. Über die Dampfzufuhr (2) wird das Gemisch auf ca. 50-60°C erwärmt. Unter starkem Rühren wird der Lösung 8000 g Rutin, DAB zugegeben. Die Mischung wird solange gerührt, bis sich das Rutin vollständig gelöst hat. Über eine Kreislaufpumpe und ein in die Leitung montiertes pH-Meter (3a) wird anschließend der pH-Wert kontrolliert und ggf. auf pH 4,0 - 4,5 eingestellt (mit H₃PO₄ und NaOH). Über das manuelle Ventil (4) kann auch zur Kontrolle und Konzentrationsbestimmung eine Probe entnommen werden.

Zum Start der Reaktion wird die Lösung über einen Beutelfilter (5) und einen Kerzenfilter (6) der Kolbendosierpumpe (7) zugeführt. Der Beutelfilter hat dabei die Aufgabe, die größere Menge an ungelösten Bestandteilen aufzuhalten, während der Kerzenfilter die Lösung mit einer Feinheit von 0,2 µm reinigt.

Die Kolbendosierpumpe (7) fördert die Lösung durch einen heizbaren Schlauch, welcher die Lösung über ein Thermometer auf eine Temperatur von 40°C am Eingang der Säule einstellt, mit einem Fluss von 1 l/min in die Säule (9) (100x400 mm). Die Säule enthält 1,5 kg Immobilisat. Da der elektrisch beheizte Schlauch die Lösung nicht kühlen kann, ist die Temperatur im Rührkessel (1) so zu wählen, dass die Abkühlung auf dem Weg bis zur Pumpe bei maximalem Pumpenfluss bis 40°C führt.

Über ein manuelles Ventil (10) kann der Lösung nach Durchlaufen der Säule eine Probe entnommen werden, womit nochmals die Temperatur und der Umsatzgrad der Reaktion off-line gemessen werden können. Ist der gemessene Umsatzgrad geringer als gefordert, wird die Flussrate der Pumpe entsprechend verringert.

Nach Durchlaufen der Säule ist die Reaktion vollständig abgelaufen, so dass die Lösung in das Auffanggefäß (11) geführt werden kann. Dort wird der Lösung über einen Kon-

densator (12) ca. 10-20% des Volumens entzogen. Dadurch wird der Gehalt an Propanol deutlich gesenkt, wodurch die Löslichkeit des Isoquercetins stark sinkt. Durch nachträgliche Abkühlung sinkt die Löslichkeit weiter, so dass das Produkt ausfällt und im Beutefilter (13) abgetrennt werden kann. Von dort wird es zur weiteren Trocknung in einen Trockenschrank (14) überführt. Die Mutterlauge und das abdestillierte Kondensat werden gemeinsam zum erneuten Ansatz in den Rührkessel (1) zurückgeführt.

Beispiel 3

1. Modifizierung von Kieselgelpartikeln mit Aldehydgruppen und Immobilisierung von Naringinase auf diesen Partikeln

250 g Kieselgel (z.B. LiChrospher SI 300, Merck, Darmstadt) wurden in einem verschließbaren Gefäß mit 400 ml 10%iger HCl übergossen, 10 min lang mit Ultraschall entgast, und 24 h bei RT stengelassen. Anschließend wurde das Kieselgel abfiltriert und mit mehreren Litern demin. Wasser gewaschen, bis der pH-Wert >4.5 betrug und im Filtrat keine Chloridionen mehr nachweisbar waren (Tüpfelreaktion mit essigsaurer AgNO₃-Lösung).

Anschließend wurde das säurebehandelte feuchte Kieselgel in einen 4 l Dreihalskolben – ausgestattet mit KPG-Rührer, Rückflußkühler und 100 ml Tropftrichter – überführt und mit 3 l VE-Wasser aufgeschlämmt. Unter Rühren wurden über den Tropftrichter innerhalb 15 min 100 ml Aminopropyltrimethoxysilan (ABCR, Karlsruhe) zugegeben. Anschließend wurde die Suspension erwärmt und 90 min lang bei 90°C gerührt. Die abgekühlte Suspension wurde filtriert und achtmal mit jeweils 1 l demin. Wasser gewaschen.

Das aminoaktivierte Kieselgel wurde in einem 4 l Dreihalskolben – ausgestattet mit KPG-Rührer und 100 ml Tropftrichter – in 3 l mittels Ultraschall entgastem Wasser suspendiert; der pH-Wert wurde mit einigen Tropfen 2 M Essigsäure auf 8.0 gesenkt. Anschließend wurden 100 ml 50%ige Glutardialdehydlösung (Merck, Darmstadt) innerhalb 1 h zugetropft und die Suspension weitere 2,5 h bei RT gerührt. Das aktivierte Kieselgel wird erneut filtriert und so lange mit eiskaltem demin. Wasser gewaschen, bis im

Waschwasser kein Glutaraldehyd mehr nachgewiesen werden konnte (Tüpfelreaktion mit schwefelsaurer 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung).

Das mit Aldehydgruppen modifizierte Kieselgel wurde in 500 ml demin. Wasser in einem 4 l Kolben durch Rühren mit einem KPG-Rührer suspendiert. 13 g Naringinase (Sigma, Deisenhofen) wurden in 2,5 l 0,25 M Phosphatpuffer, pH 8,0, gelöst. Die Enzymlösung wurde in die Kieselgelsuspension gegeben und 96 h lang bei RT gerührt. Anschließend wurde das Immobilisat abfiltriert und mehrfach zunächst mit 0,2 M Natriumchloridlösung, dann mit 50 mM Citratpuffer, pH 4,0, gewaschen. Die Rhamnosidaseaktivität des Immobilisats wurde mit *p*-Nitrophenyl-L- α -rhamnopyranosid (Sigma, Deisenhofen) als Substrat nach der Methode von Kurosawa bestimmt; sie betrug 120 U/g.

2. Immobilisierung von Hesperidinase auf Eupergit™ C

50 g Eupergit (Röhm, Weiterstadt) wurden in einer verschraubbaren 500 ml Glasflasche mit 300 ml 0,8 M Kaliumphosphatpuffer, pH 8,5, vermischt und 30 min lang stehen gelassen. Anschließend wurden 5,0 g Hesperidinase (Amano) zugegeben und der Ansatz 120 h lang bei RT auf einem Rollenmischer bewegt. Das Eupergit wurde mittels einer Glasfritte abfiltriert und mehrmals zunächst mit 0,2 M Natriumchloridlösung, anschließend zweimal mit je 1 l 0,1 M Citratpuffer, pH 4,0, gewaschen. Die Rhamnosidaseaktivität des Immobilisats wurde mit *p*-Nitrophenyl-L- α -rhamnopyranosid (Sigma, Deisenhofen) als Substrat nach der Methode von Kurosawa bestimmt; sie betrug 15 U/g, bezogen auf trockenes Immobilisat, bzw. 4,2 U/g, bezogen auf feuchtes Immobilisat.

3. Umsetzung von Rutin zu Isoquercetin mit auf Eupergit immobilisierter Hesperidinase im Rührkesselreaktor und anschließende Extraktion des Produkts mit einer Tetrahydrofuran/Puffer-Mischung

In einem 2000 ml Rundkolben wurden 1000 ml 50 mM Citratpuffer, pH 4,0, 100 g (Feuchtgewicht) auf Eupergit immobilisierte Naringinase mit einer Aktivität von 4,2 U/g, sowie 10 g Rutin (Merck, Darmstadt) bei 40°C mit einem KPG-Rührer gerührt; der Grad des Umsatzes wurde laufend durch HPLC-Analyse bestimmt. Nach insgesamt 96 h

wurde der Reaktorinhalt über einen Büchnertrichter abfiltriert. Der Filterkuchen wurde wieder in den Rundkolben zurück gegeben und 30 min lang in einer Mischung aus 400 ml 50 mM Citratpuffer, pH 4,0, und 100 ml Tetrahydrofuran bei 40°C gerührt, wobei sich der größte Teil des Isoquercetins löste. Das Gemisch wurde warm filtriert und der Filterkuchen erneut 30 min lang mit 500 ml Puffer-Tetrahydrofuran-Gemisch extrahiert. Nach der Filtration wurden die beiden Isoquercetin-Extrakte mit dem ersten Filtrat vereinigt und das Tetrahydrofuran mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Um das Produkt vollständig auszufällen wurde die wässrige Isoquercetinlösung auf 4°C abgekühlt. Nach Filtration und Trocknung im Exsikkator wurde eine Ausbeute von 5,8 g Produkt erhalten, das sich aus 98% Isoquercetin und 2% Rutin zusammensetzte.

Das feuchte Eupergit wurde einmal mit kaltem Tetrahydrofuran-Puffergemisch gewaschen, danach wiederholt mit 50 mM Citratpuffer, pH 4,0, bis der Geruch von Tetrahydrofuran nur noch schwach wahrzunehmen war. Die Aktivität des Enzyms betrug noch 3,6 U/g, das entspricht einem Aktivitätsverlust von 14%.

4. Umsetzung von Rutin zu Isoquercetin mit auf Eupergit immobilisierter Hesperidinase im Rührkesselreaktor und anschließende Extraktion des Produkts mit einer alkalischen Pufferlösung

In einem 2000 ml Rundkolben wurden 1000 ml 50 mM Citratpuffer, pH 4,0, 100 g auf Eupergit immobilisierte Naringinase mit einer Aktivität von 4,2 U/g (Feuchtgewicht), sowie 10 g Rutin (Merck, Darmstadt) bei 40°C mit einem KPG-Rührer gerührt; der Grad des Umsatzes wurde laufend durch HPLC-Analyse bestimmt. Nach insgesamt 96 h wurde der Reaktorinhalt über einen Büchnertrichter abfiltriert. Der feuchte Filterkuchen wurde wieder in den Rundkolben zurück gegeben und bei RT 5 min lang in 300 ml 50 mM Natriumcarbonatpuffer, pH 10,0, gerührt, wobei sich ein Teil des Isoquercetins mit intensiv gelber Farbe löste. Die Suspension wurde filtriert und der Filterkuchen sofort erneut mit Carbonatpuffer extrahiert. Nach insgesamt 7 Extraktionszyklen war das Eupergit weitgehend farblos und das Isoquercetin praktisch vollständig gelöst. Die Extrakte wurden vereinigt, mit verdünnter Salzsäure vorsichtig angesäuert, bis der pH ungefähr bei 3 lag und anschließend auf 4°C gekühlt. Nach Filtration und Trocknung im Exsikka-

tor wurde eine Ausbeute von 4,9 g Produkt erhalten, das sich aus 98% Isoquercetin und 2% Rutin zusammensetzte.

Das feuchte Eupergit wurde zweimal mit 50 mM Citratpuffer gewaschen und war danach wieder für weitere Umsetzungen einsatzbereit. Die Aktivität des Enzyms betrug noch 3,9 U/g, das entspricht einem Aktivitätsverlust von 7%.

Beispiel 4

1. Modifizierung von magnetischen Silicapartikeln mit Aldehydgruppen und Immobilisierung von Naringinase auf diesen Partikeln

In einem 1 l Dreihalskolben – ausgestattet mit KPG-Rührer, Tropftrichter und Rückflusskühler – wurde eine Suspension von 30 g magnetischen Silicapartikeln (MagPrep, Merck, Darmstadt) in 600 ml Wasser vorgelegt. Eine Mischung von 20 ml Aminopropyltriethoxysilan (ABCR, Karlsruhe) und 20 ml Isopropanol wurde innerhalb 30 min unter Rühren zugetropft. Anschließend wurde das Gemisch auf 85°C erhitzt und 1 h lang bei dieser Temperatur gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension in ein Becherglas überführt, die Partikel mittels eines starken Permanentmagneten am Boden des Gefäßes gesammelt und der Überstand dekantiert. Die Partikel wurden wiederholt mit demin. Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Waschwassers konstant blieb. Anschließend wurden die Partikel in 600 ml Wasser resuspendiert und der pH-Wert mit einigen Tropfen Essigsäure auf einen Wert von ca. 8 eingestellt; nach Zugabe von 24 ml 50%iger Glutardialdehydlösung wurde die Suspension 4 h lang bei RT gerührt und die Partikel danach so lange mit demin. Wasser gewaschen, bis im Waschwasser kein Glutaraldehyd mehr nachgewiesen werden konnte (Tüpfelreaktion mit schwefelsaurer 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung).

Die aldehyd-derivatisierten Partikel wurden in einem 1 l Rundkolben in 600 ml 0,2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 9, resuspendiert. Nach Zugabe einer Lösung von 1 g Naringinase (Sigma, Deisenhofen) in 100 ml 50 mM Natriumchloridlösung wurde die Mischung mit einem KPG-Rührer 2 Tage bei RT gerührt. Anschließend wurden die Partikel mit Hilfe eines Permanentmagneten abgetrennt und wiederholt zunächst mit 0,2 M Nat-

riumchloridlösung, dann mit 50 mM Citratpuffer, pH 4,0, gewaschen. Die Rhamnosida-sektivität des Immobilisats wurde mit *p*-Nitrophenyl-L- α -rhamnopyranosid (Sigma, Deisenhofen) als Substrat nach der Methode von Kurosawa bestimmt (Kurosawa, Ikeda, Egami, *J. Biochem.* 73, 31-37 (1973): α -L-Rhamnosidasen of the liver of *Turbo cornutus* and *Aspergillus niger*); sie betrug 162 U/g.

2. Modifizierung von magnetischen Silicapartikeln mit Epoxygruppen und Immobilisierung von Naringinase auf diesen Partikeln

In einem 1 l Dreihalskolben – ausgestattet mit KPG-Rührer, Tropftrichter und Rückflusskühler – wurde eine Suspension von 30 g magnetischen Silicapartikeln (MagPrep, Merck, Darmstadt) in 600 ml 50 mM Natriumacetatlösung vorgelegt. Eine Mischung von 20 ml (3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilan (ABCR, Karlsruhe) und 20 ml Isopropanol wurde innerhalb 30 min unter Rühren zugetropft, anschließend das Gemisch auf 85°C erhitzt und 1 h lang bei dieser Temperatur gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension in ein Becherglas überführt, die Partikel mittels eines starken Permanentmagneten am Boden des Gefäßes gesammelt und der Überstand dekantiert. Die Partikel wurden wiederholt mit demin. Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Waschwassers konstant blieb. Zur quantitativen Bestimmung der Epoxygruppen wurde eine Probe von ca. 0,5 g des Materials wiederholt mit Methanol gewaschen und anschließend bei ca. 70°C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Bestimmung der Epoxygruppen nach der Methode von Pribyl (Pribyl, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 303, 113-116 (1980): Bestimmung von Epoxydendgruppen in modifizierten chromatographischen Sorbentien und Gelen) ergab 250 μ mol/g.

150 ml einer 20%igen (w/v) Suspension epoxy-derivatisierter Magnetpartikel wurden in einem 1 l Rundkolben mit 350 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 9,0, vermischt. Nach Zugabe einer Lösung von 1,5 g Naringinase (Sigma, Deisenhofen) in 15 ml 50 mM Natriumchloridlösung wurde die Mischung mit einem KPG-Rührer 16 h bei 40°C gerührt. Anschließend wurden die Partikel mit Hilfe eines Permanentmagneten abgetrennt und wiederholt zunächst mit 0,2 M Natriumchloridlösung, dann mit 50 mM Citratpuffer, pH 4,0, gewaschen. Die Rhamnosidaseaktivität des Immobilisats wurde mit *p*-Nitrophenyl-L-

α -rhamnopyranosid (Sigma, Deisenhofen) als Substrat nach der Methode von Kurosawa bestimmt; sie betrug 102 U/g.

3. Modifizierung von magnetischen Silicapartikeln mit Carboxylgruppen und Immobilisierung von Naringinase auf diesen Partikeln

In einem 1 l Dreihalskolben – ausgestattet mit KPG-Rührer, Tropftrichter und Rückflusskühler – wurde eine Suspension von 30 g magnetischen Silicapartikeln (MagPrep, Merck, Darmstadt) in 600 ml Wasser vorgelegt. Eine Mischung von 28 ml 3-(Triethoxysilyl)propylsuccinylanhydrid (ABCR, Karlsruhe) und 28 ml Isopropanol wurde innerhalb 30 min unter Rühren zugetropft und anschließend der pH-Wert der Reaktionsmischung durch tropfenweise Zugabe einer 10%igen Natronlauge auf 9,0 eingestellt. Das Gemisch wurde auf 80°C erhitzt und 2 h lang bei dieser Temperatur gerührt. Dabei wurde in regelmäßigen Abständen der pH kontrolliert und ggf. durch Zugabe von Alkali korrigiert. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension in ein Becherglas überführt, die Partikel mittels eines starken Permanentmagneten am Boden des Gefäßes gesammelt und der Überstand dekantiert. Die Partikel wurden dreimal mit demin. Wasser, einmal mit einer 2 M Essigsäurelösung und dann wiederholt so lange mit demin. Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Waschwassers konstant blieb.

150 ml einer 20%igen (w/v) Suspension carboxyl-derivatisierter Magnetpartikel wurden in einem 1 l Rundkolben mit 300 ml 0,4 M Kaliumphosphatpuffer, pH 5,0, und einer Lösung von 1,5 g Naringinase (Sigma, Deisenhofen) in 150 ml 50 mM Natriumchloridlösung vermischt. Nach Zugabe von 8 ml einer 1%igen (w/v) Lösung von EDC (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid, Merck, Darmstadt) in Wasser wurde das Gemisch 20 h lang bei RT gerührt. Anschließend wurden die Partikel mit Hilfe eines Permanentmagneten abgetrennt und wiederholt zunächst mit 0,2 M Natriumchloridlösung, dann mit 50 mM Citratpuffer, pH 4,0, gewaschen. Die Rhamnosidaseaktivität des Immobilisats wurde mit *p*-Nitrophenyl-L- α -rhamnopyranosid (Sigma, Deisenhofen) als Substrat nach der Methode von Kurosawa bestimmt; sie betrug 71 U/g.

4. Modifizierung von magnetischen Glimmerpigmenten mit Aldehydgruppen und Immobilisierung von Hesperidinase auf diesen Partikeln

In einem 1-l-Dreihalskolben – ausgestattet mit KPG-Rührer, Tropftrichter und Rückflusskühler – wurde eine Suspension von 30 g magnetischen Glimmerpigmenten ("Colorona Blackstar Green", Merck, Darmstadt) in 300 ml Wasser vorgelegt. Eine Mischung von 20 ml Aminopropyltriethoxysilan (ABCR, Karlsruhe) und 20 ml Isopropanol wurde innerhalb 30 min unter Rühren zugetropft. Anschließend wurde das Gemisch auf 85°C erhitzt und 1 h lang bei dieser Temperatur gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension in ein Becherglas überführt, die Partikel mittels eines Permanentmagneten am Boden des Gefäßes gesammelt und der Überstand dekantiert. Die Partikel wiederholt mit demin. Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Waschwassers konstant blieb. Anschließend wurden die Partikel in 300 ml Wasser resuspendiert und der pH-Wert mit einigen Tropfen Essigsäure auf einen Wert von ca. 8 eingestellt; nach Zugabe von 25 ml 50%iger Glutardialdehydlösung wurde die Suspension 4 h lang bei RT gerührt und die Partikel danach so lange mit demin. Wasser gewaschen, bis im Waschwasser kein Glutaraldehyd mehr nachgewiesen werden konnte (Tüpfelreaktion mit schwefelsaurer 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung).

30 g aldehyd-derivatisierten Glimmerpigmente "Colorona Blackstar Green" wurden in einem 1 l Rundkolben in 300 ml 0,2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, resuspendiert. Nach Zugabe einer Lösung von 1 g Hesperidinase (Amano) in 20 ml 0,2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, wurde die Mischung mit einem KPG-Rührer 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend wurden die Partikel mit Hilfe eines Permanentmagneten abgetrennt und wiederholt zunächst mit 0,2 M Natriumchloridlösung, dann mit 50 mM Citratpuffer, pH 4,0, gewaschen. Die Rhamnosidaseaktivität des Immobilisats wurde mit p-Nitrophenyl-L- α -rhamnopyranosid (Sigma, Deisenhofen) als Substrat nach der Methode von Kurosawa bestimmt; sie betrug 10 U/g.

5. Umsetzung von Rutin zu Isoquercetin mit immobilisierter Naringinase im Rührkesselreaktor und Abtrennung des magnetischen Biokatalysators mit einem Permanentmagneten

In einem 500 ml Doppelmantel-Rührreaktor wurden 400 ml 50 mM Citratpuffer, pH 5,0, 20 g auf magnetischen Silicapartikeln immobilisierte Naringinase mit einer Aktivität von 102 U/g und 10 g Rutin (Merck, Darmstadt) bei 40°C miteinander verrührt; der Grad des Umsatzes wurde in Abständen durch HPLC-Analyse bestimmt. Nach 24 h wurde der Reaktorinhalt in ein Becherglas gepumpt und der Katalysator mit Hilfe eines Plattenmagneten (Bakker, 200 mT) am Boden des Gefäßes gesammelt. Der Überstand wurde sofort mit Hilfe einer Pumpe abgesaugt und die Magnetpartikel mehrmals mit jeweils 100 ml Puffer gewaschen, um die letzten Reste an anhaftendem festem Isoquercetin abzuspielen. Das gesammelte Isoquercetin wurde abfiltriert, mehrmals mit geringen Portionen Eiswasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute betrug 6,5 g. Eine HPLC-Analyse ergab eine Zusammensetzung von 96% Isoquercetin, 2% Quercetin und 2% Rutin. Die Aktivität des Immobilisats betrug nach der Umsetzung noch 92 U/g. Dies entspricht einem Aktivitätsverlust von 10%.

6. Umsetzung von Rutin zu Isoquercetin mit immobilisierter Naringinase im Rührkesselreaktor und Abtrennung des magnetischen Biokatalysators mit einem elektromagnetischen Separator (Abb.1)

In einem 500 ml Doppelmantel-Rührreaktor wurden 300 ml 50 mM Citratpuffer, pH 5,0, 10 g auf magnetischen Silicapartikeln immobilisierte Naringinase mit einer Aktivität von 102 U/g und 5 g Rutin (Merck, Darmstadt) bei 40°C miteinander verrührt; der Grad des Umsatzes wurde laufend durch HPLC-Analyse bestimmt. Nach 24 h wurde der Reaktorinhalt mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe mit einer Flussrate von 25 ml/min durch eine elektromagnetische HGMS-Anlage geleitet, wodurch die Magnetpartikel vollständig an der Drahtmatrix abgeschieden wurden (Technische Daten der Abscheideanlage: Glasrohr mit Innendurchmesser 20 mm und 200 mm Länge, Leervolumen 65 ml, Gewicht der Drahtpackung aus SS-Legierung 15 g, 4 Spulen in Serie geschaltet, Strom-

stärke 6 A, magnet. Feldstärke des Helmholtzfeldes 25 mT). Anschließend wurden zweimal jeweils 100 ml Citratpuffer bei eingeschaltetem Magnetfeld durch die Säule gepumpt, um die Magnetpartikel zu spülen. Die vereinigten Produktsuspensionen wurden filtriert, das Isoquercetin mit Eiswasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute betrug 3,1 g. Eine HPLC-Analyse ergab eine Zusammensetzung von 97% Isoquercetin, 2% Quercetin und 1% Rutin.

Zur Rückgewinnung des Katalysators wurden 10 min lang bei abgeschaltetem Magnetfeld 100 ml Citratpuffer, pH 5,0, mit einer Durchflussrate von 100 ml/min im Kreislauf durch die Abscheideanlage gepumpt, wobei die Flussrichtung mehrmals gewechselt wurde. Anschließend wurde die Katalysatorsuspension zurück in den Rührkessel gepumpt und die im Abscheider verbliebene restliche Menge an Katalysator erneut zweimal mit jeweils 100 ml Citratpuffer abgespült. Die Aktivität des Immobilisats betrug nach der Umsetzung noch 94 U/g. Dies entspricht einem Aktivitätsverlust von 8%.

7. Umsetzung von Rutin zu Isoquercetin mit auf Glimmerpartikeln immobilisierter Hesperidinase im Rührkesselreaktor und Abtrennung des magnetischen Biokatalysators mit einem Plattenmagneten

In einem 500 ml Doppelmantel-Rührreaktor wurden 400 ml 50 mM Citratpuffer, pH 5,0, 30 g auf "Colorona Blackstar" immobilisierte Hesperidinase mit einer Aktivität von 10 U/g und 5 g Rutin (Merck, Darmstadt) bei 40°C miteinander verrührt; der Grad des Umsatzes wurde laufend durch HPLC-Analyse bestimmt. Nach 24 h wurde der Reaktorinhalt in ein Becherglas gepumpt und der Katalysator mit Hilfe eines Plattenmagneten (Bakker, 200 mT) am Boden des Gefäßes gesammelt. Der Überstand wurde sofort mit Hilfe einer Pumpe abgesaugt und die Magnetpartikel mehrmals mit jeweils 100 ml Puffer gewaschen, um die letzten Reste an anhaftendem festem Isoquercetin abzuspülen. Das gesammelte Isoquercetin wurde abfiltriert, mehrmals mit geringen Portionen Eiswasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute betrug 3,3 g. Eine HPLC-Analyse ergab eine Zusammensetzung von 96% Isoquercetin, und 4% Rutin.

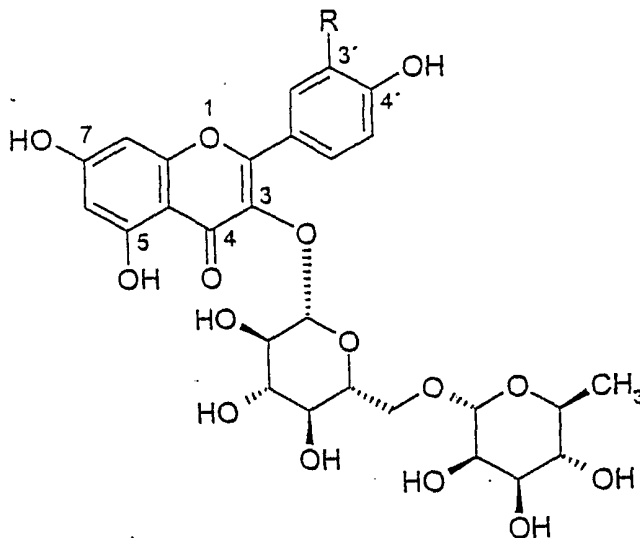
Die Aktivität des Immobilisats betrug nach der Umsetzung noch 9,7 U/g. Dies entspricht einem Aktivitätsverlust von 3%.

8. Umsetzung von Rutin zu Isoquercetin mit auf magnetischen Kieselgelpartikeln immobilisierter Naringinase in einem MSFB-Reaktor

In einem Vorlagegefäß wurde eine Mischung aus 5 g Rutin, 900 ml 50 mM Citratpuffer, pH 5,0, und 100 ml Methylacetat bei 40°C so lange gerührt, bis eine annähernd homogene Suspension ohne größere Agglomerate entstanden war. Der Reaktor war nicht temperierbar. Das Methylacetat wurde zugesetzt, um die Löslichkeit und die Nachlöse-rate bei RT zu erhöhen, sowie um die Bildung von Quercetin zu verhindern. Inzwischen wurde eine Suspension von 6 g auf magnetischen Silicapartikeln immobilisierter Naringinase mit einer Aktivität von 162 U/g in 60 ml 50 mM Citratpuffer, pH 5,0, bei ausgeschaltetem Magnetfeld mit Hilfe einer Pumpe in das Rohr des MSFB-Reaktors befördert. Anschließend wurde ein 20 mT starkes Magnetfeld eingestellt und von unten zunächst frischer Citratpuffer mit Hilfe einer exakt dosierbaren Kolbenhubpumpe mit einem Fluss von 5 ml/min eingeleitet, bis sich die Partikel im Magnetfeld stabilisiert hatten. Dann wurde die Rutinsuspension bei RT innerhalb 3,5 h durch den MSFB-Reaktor gepumpt. Aus dem Produktgemisch wurde zunächst das Methylacetat am Rotationsverdampfer entfernt; dann wurde das Produkt abfiltriert, mehrfach mit Eiswasser gewaschen, und im Exsikkator getrocknet. Die Produktausbeute betrug 2,9 g; das Produkt bestand aus 86% Isoquercetin und 14% Rutin.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von monoglycosidierten Flavonoiden durch enzymatische Hydrolyse von Rutinosiden, dadurch gekennzeichnet, dass für die enzymatische Hydrolyse ein Enzym, das auf einem Träger immobilisiert ist, verwendet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Rutinosid ein Rutinosid der Formel (A)

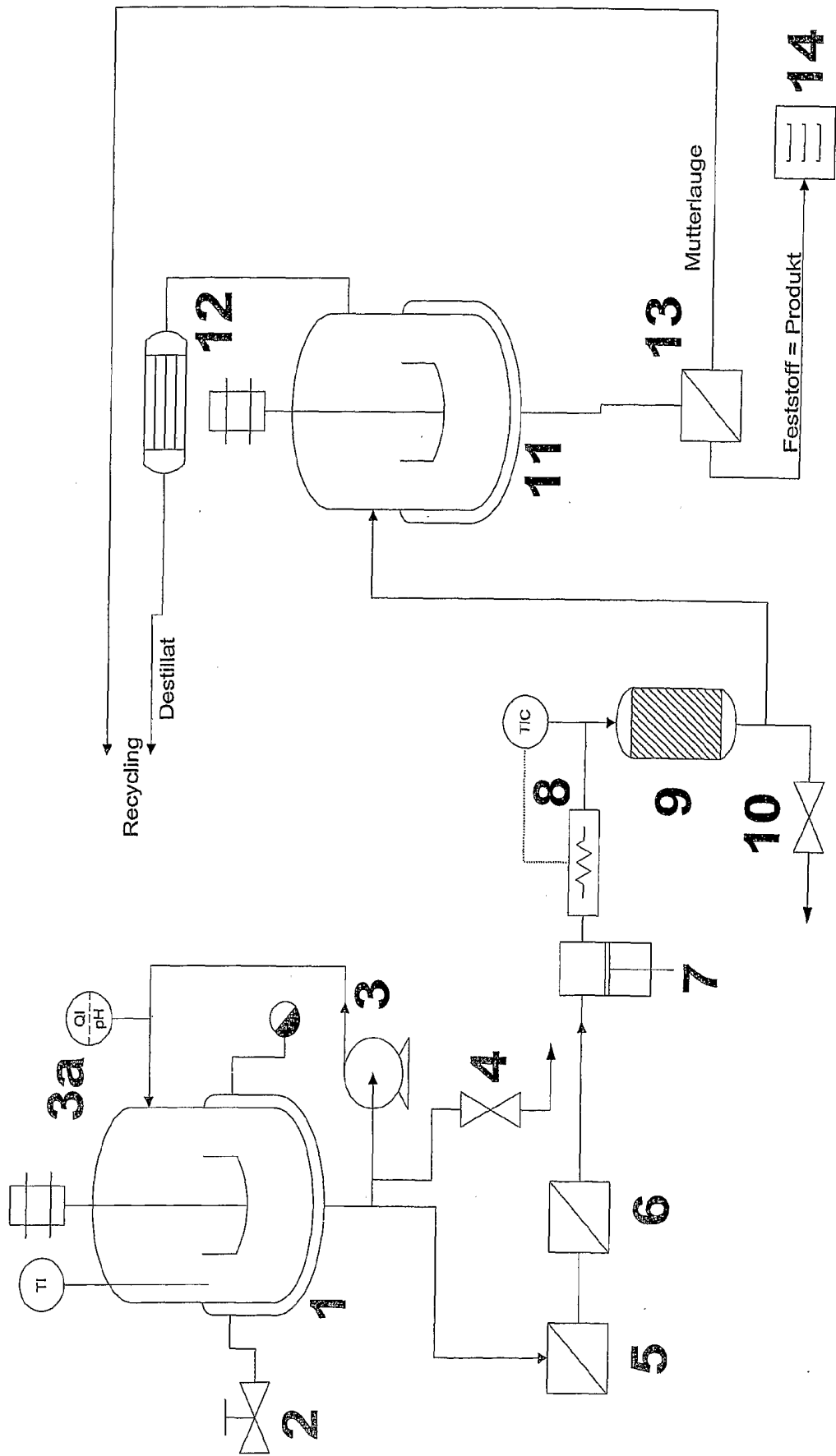


worin R H, OH oder OCH₃ bedeutet,
verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Rutinosid Rutin verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Enzym eine α -L-Rhamnosidase verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Enzym Hesperidinase verwendet wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym auf Kieselgel immobilisiert ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die enzymatische Hydrolyse in Gegenwart eines Lösungsmittelgemisches aus Wasser und mindestens einem organischen Lösungsmittel durchgeführt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion bei einer Reaktionstemperatur von 15 bis 80°C durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion bei einem pH-Wert von 3 bis 8 durchgeführt wird.

Abb. 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/01447

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12P19/02 C12P19/60

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 971 812 A (NATIONAL SCIENCE COUNCIL) 20 November 1990 (1990-11-20) Siehe insbesondere Spalten 1 und 2 ---	1-9
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; TURECEK, P. L. ET AL: "Applications of enzyme immobilization in the analysis of naturally occurring compounds, for example, .alpha.-L-rhamnosides" retrieved from STN Database accession no. 109:34782 XP002168065 abstract & SCI. PHARM. (1987), 55(4), 275-83 , --- -/--	1-9



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 2001

Date of mailing of the international search report

05/06/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Douschan, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/01447

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989 TSEN H-Y ET AL: "FIBER ENTRAPMENT OF NARINGINASE FROM PENICILLIUM-SP AND APPLICATION TO FRUIT JUICE DEBITTERING" Database accession no. PREV198987114493 XP002168066 abstract & JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 67, no. 3, 1989, pages 186-189, ISSN: 0922-338X</p>	1-9
X	<p>--- DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; January 1998 (1998-01) ELLENRIEDER G ET AL: "Hydrolysis of supersaturated naringin solutions by free and immobilized naringinase." Database accession no. PREV199800134334 XP002168067 abstract & BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 12, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 63-65, ISSN: 0951-208X</p>	1-9
Y	<p>--- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; TURECEK, P. ET AL: "Simple enzyme reactors suitable for the byproduct-free preparation of the aglycones of naturally occurring glycosides under mild conditions" retrieved from STN Database accession no. 105:95983 XP002168068 abstract & APPL. BIOCHEM. BIOTECHNOL. (1986), 13(1), 1-13 ,</p>	1-9
Y	<p>--- EP 0 317 033 A (UNILEVER PLC) 24 May 1989 (1989-05-24) cited in the application the whole document</p>	1-9
Y	<p>--- US 5 641 659 A (HOECHST AG) 24 June 1997 (1997-06-24) column 7</p>	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/01447

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4971812	A	20-11-1990	NONE	
EP 0317033	A	24-05-1989	AT 92109 T	15-08-1993
			CA 1333780 A	03-01-1995
			DE 3882655 A	02-09-1993
			DE 3882655 T	18-11-1993
			WO 8904870 A	01-06-1989
			ES 2058241 T	01-11-1994
			JP 2502248 T	26-07-1990
			MX 170209 B	11-08-1993
			PT 89040 A, B	01-12-1988
			US 5077206 A	31-12-1991
US 5641659	A	24-06-1997	CZ 9302543 A	15-06-1994
			EP 0599159 A	01-06-1994
			JP 6209773 A	02-08-1994
			SG 54274 A	16-11-1998
			US 5468625 A	21-11-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01447

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12P19/02 C12P19/60

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 971 812 A (NATIONAL SCIENCE COUNCIL) 20. November 1990 (1990-11-20) Siehe insbesondere Spalten 1 und 2 ---	1-9
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; TURECEK, P. L. ET AL: "Applications of enzyme immobilization in the analysis of naturally occurring compounds, for example, alpha.-L-rhamnosides" retrieved from STN Database accession no. 109:34782 XP002168065 Zusammenfassung & SCI. PHARM. (1987), 55(4), 275-83 , ----- -/--	1-9



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Mai 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05/06/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Douschan, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01447

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989 TSEN H-Y ET AL: "FIBER ENTRAPMENT OF NARINGINASE FROM PENICILLIUM-SP AND APPLICATION TO FRUIT JUICE DEBITTERING" Database accession no. PREV198987114493 XP002168066 Zusammenfassung & JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, Bd. 67, Nr. 3, 1989, Seiten 186-189, ISSN: 0922-338X</p>	1-9
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Januar 1998 (1998-01) ELLENRIEDER G ET AL: "Hydrolysis of supersaturated naringin solutions by free and immobilized naringinase." Database accession no. PREV199800134334 XP002168067 Zusammenfassung & BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, Bd. 12, Nr. 1, Januar 1998 (1998-01), Seiten 63-65, ISSN: 0951-208X</p>	1-9
Y	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; TURECEK, P. ET AL: "Simple enzyme reactors suitable for the byproduct-free preparation of the aglycones of naturally occurring glycosides under mild conditions" retrieved from STN Database accession no. 105:95983 XP002168068 Zusammenfassung & APPL. BIOCHEM. BIOTECHNOL. (1986), 13(1), 1-13 ,</p>	1-9
Y	<p>EP 0 317 033 A (UNILEVER PLC) 24. Mai 1989 (1989-05-24) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-9
Y	<p>US 5 641 659 A (HOECHST AG) 24. Juni 1997 (1997-06-24) Spalte 7</p>	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01447

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4971812 A	20-11-1990	KEINE	
EP 0317033 A	24-05-1989	AT 92109 T	15-08-1993
		CA 1333780 A	03-01-1995
		DE 3882655 A	02-09-1993
		DE 3882655 T	18-11-1993
		WO 8904870 A	01-06-1989
		ES 2058241 T	01-11-1994
		JP 2502248 T	26-07-1990
		MX 170209 B	11-08-1993
		PT 89040 A, B	01-12-1988
		US 5077206 A	31-12-1991
US 5641659 A	24-06-1997	CZ 9302543 A	15-06-1994
		EP 0599159 A	01-06-1994
		JP 6209773 A	02-08-1994
		SG 54274 A	16-11-1998
		US 5468625 A	21-11-1995