

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4699661号

(P4699661)

(45) 発行日 平成23年6月15日(2011.6.15)

(24) 登録日 平成23年3月11日(2011.3.11)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 P 33/20 (2006.01) C 1 2 P 33/20
C 1 2 R 1/685 (2006.01) C 1 2 P 33/20
C 1 2 R 1:685

請求項の数 8 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2001-500799 (P2001-500799)	(73) 特許権者	397068654
(86) (22) 出願日	平成12年5月26日 (2000.5.26)		インデナ・ソチエタ・ベル・アチオニ
(65) 公表番号	特表2003-501045 (P2003-501045A)		イタリア・ミラノ・ピアレオルトレス 1 2
(43) 公表日	平成15年1月14日 (2003.1.14)	(74) 代理人	100078662
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/004794		弁理士 津国 肇
(87) 国際公開番号	W02000/073489	(74) 代理人	100075225
(87) 国際公開日	平成12年12月7日 (2000.12.7)		弁理士 篠田 文雄
審査請求日	平成19年5月17日 (2007.5.17)	(72) 発明者	アクアティ, ヴァルター
(31) 優先権主張番号	MI99A001223		イタリア国、イー-20139 ミラノ、ヴ
(32) 優先日	平成11年6月1日 (1999.6.1)		ィアレ・オルトレス 1 2
(33) 優先権主張国	イタリア (IT)	(72) 発明者	ボンツォーネ, セザーレ
			イタリア国、イー-20139 ミラノ、ヴ
			ィアレ・オルトレス 1 2
		審査官	福岡 信子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Ruscus aculeatus* ステロイド配糖体の誘導体の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラスコシド (*ruscoside*) またはデスグルコラスコシド (*desglucoruscuside*) を含む基質を、真菌 *Aspergillus niger* 種を用いる該基質の醗酵によって、一連の酵素的な β -グルコシダーゼ反応および α -ラムノシダーゼ反応により加水分解させることを特徴とする、デスグルコデスラムノラシンの製造方法。

【請求項 2】

前記基質が培養ブロスである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記醗酵を、25～30℃の温度で、50%よりも高い、または50%に等しい pO_2 に到達するために攪拌および通気下で行う、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

温度が27℃である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記ステロイド配糖体の出発濃度が5～15% (w/v) である、請求項 3 記載の方法。

。

【請求項 6】

前記濃度が8～10% (w/v) である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

10

20

培養ブロスのpHが4～6の範囲である、請求項2～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項8】

培養ブロスのpHが4.5～5.5の範囲である、請求項7記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、*Ruscus aculeatus*ステロイド配糖体（ラスコサポニン）の誘導体の製造方法に関する。

【0002】

より詳細には、本発明は、醗酵ルートを介したラスコシド（*ruscocide*）および／またはデスグルコラスコシド（*desgluccrucoside*）の加水分解によるデスグルコデスラムノラシン（*desglucodesrhamnoruscine*）の製造に関する。

10

【0003】

デスグルコデスラムノラシンから酸加水分解によって容易に得ることができる、デスグルコラムノラシン、および対応する遊離アグリコンであるラスコゲニン（*ruscogenin*）およびネオラスコゲニン（*neoruscogenin*）は、抗炎症活性および結合－保護活性を有する価値ある薬学的活性素である。

【0004】

しかし、ラスコシドまたはデスグルコラスコシドから出発する上記活性素の化学的調製は、強酸による加水分解等の激烈な条件、および中間体と生成物との非常に不均質な混合物を生じる複雑な操作工程を必要とするため、問題が多い。

20

【0005】

従って、公知の化学的方法と関連した上述の難点を克服する、デスグルコデスラムノラシンの製造方法を提供することは、極めて望ましいであろう。

【0006】

本発明は、*Ruscus aculeatus*ステロイド配糖体（ラスコサポニン）を含む基質の、真菌*Aspergillus niger*種による醗酵を介した上記配糖体の加水分解を特徴とする、デスグルコデスラムノラシンの製造方法を提供することにより、このような必要性に応えるものである。

【0007】

培養ブロスは、典型的には、栄養複合基質として使用される。

30

【0008】

醗酵は、一般に、25～30℃、好ましくは27℃の温度で、50%よりも高い、または50%に等しい pO_2 を達成するために攪拌および通気下で、実施される。

【0009】

出発するステロイド配糖体の濃度は、通常5～15%（w/v）、好ましくは8～10%（w/v）の範囲であり、培養ブロスのpHは4～6、好ましくは4.5～5.5の範囲である。

【0010】

本発明のバイオテクノロジー的方法を使用すると、適当な微生物学的技法で選択された微生物が、出発する複雑なヘテロ配糖体からモノ配糖体または最終的なアグリコンへの転換逐次反応全てを実行するのに必要な酵素活性を発現することができるため、一連の反応全部を1つの醗酵ステップで実施することが可能である。上記加水分解酵素転換は、事実、工程中に連続的に放出される中間体に対する一連のβ-グルコシダーゼ反応、α-ラムノシダーゼ反応を含む。さらなるα-アラビノシダーゼ反応によって、遊離アグリコン（ラスコゲニン）を得ることが可能である。

40

【0011】

上記手順を上記生成物の製造に応用した例を、文献中に見つけることができないため、上記アプローチは全く新規である。

【0012】

50

関与する転換を実施するのに適した微生物は、従来の炭素源（グルコース、スクロース等）に加えて、またはその代わりに、転換される基質と同じ基質を加えた合成培地または半合成培地での選択によって得られる。この場合、関心のある基質（ラスコシド、デスグルコラスコシド）を、高濃度、たとえば、 $90 \sim 100 \text{ g/l}$ でも、加えることができる。寒天化単離用培地は、モルト寒天（Malt Agar）およびツァペク寒天（Zapek Agar）等の微生物学用の通常の調製物であるが、ここで窒素源はペプトン、尿素、硝酸アンモニウム等で代表され、従来の炭素源（グルコース、スクロース）は、ラスコシドまたはデスグルコラスコシドで置換されているか、ラスコシドまたはデスグルコラスコシドが加えられている類似の調製物を含む。上記培地に、カリウム、マグネシウム、マンガン、亜鉛等の無機塩、たとえば、リン酸塩、硫酸塩および／または塩化物をさらに加えてもよい。単離用培地のpHは、 $4 \sim 6$ 、好ましくは $4.5 \sim 5.5$ の範囲であってもよい。

10

【0013】

必要な生物学的変換に適する微生物は、土壌、腐植土、野菜抽出物および他の類似した有機源の試料の水性懸濁液を段階希釈してプレーティングすることにより、回収される。

【0014】

上記のように選択された微生物培養物を、同じ培地を含む微生物学試験管内に単離し、上述のようにリン酸塩および他の無機塩類を加えて、単離用培地で使用したものと同様の窒素源、たとえば、尿素またはペプトンを含む液体培地に、高濃度で（ 100 g/l まで）加えられたラスコシドおよびデスグルコラスコシドの生物学的変換に、 $4 \sim 6$ 、好ましくは $4.5 \sim 5.5$ の範囲のpHで使用した。

20

【0015】

記載の手順に従って、*Aspergillus niger*の選択された培養が、一連の酵素的 β -グルコシダーゼ反応および α -ラムノシダーゼ反応により、ラスコシドおよびデスグルコラスコシドを、ラスコゲニンの直接的前駆体であるデスグルコデスラムノランに変換できることが確認されている。

【0016】

その後の α -アラビノシダーゼ反応により、アグリコンの形態（ラスコゲニン-ネオラスコゲニン）のサポニンが得られる。

【0017】

選択された培養物は、管理された（温度調節された）条件で、 $25^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ の範囲の最適温度にて、回転攪拌機（ $200 \sim 300 \text{ rpm}$ ）上で攪拌状態で、増殖して上記転換を行うことができる。上記醗酵は、所望のサポニン誘導体の工業生産のための好適なバイオリアクターで、異なる規模で、実施することもできる。

30

【0018】

前記生物学的転換に使用される微生物は、反復醗酵サイクルの場合でも、バッチ法または連続法においても、触媒活性を着実に維持することができる。

【0019】

本方法は、生成物を分離して回収するための複雑でない工程等の、重大な利点を提供し、実施しやすく、且つ費用が節減される。

40

【0020】

長期保存のために、選択された微生物を、グリセロール、ペプトン等の凍結保護剤を強化した懸濁液で、 $-80^\circ\text{C} \sim -196^\circ\text{C}$ の範囲の温度で（液体窒素中で）凍結してもよく、または凍結乾燥処理に付してもよい。

【0021】

以下の分析方法を使用して、培養ブロスに対するTLC分析およびHPLC分析により、生物学的変換の進行をモニタリングすることができる。

【0022】

TLC分析

シリカゲルプレート 60 F250 Merck

50

溶離剤：

A) 酢酸エチル-メタノール 9 : 1

B) 酢酸エチル-メタノール-水 100 : 15 : 10

検出：10%硫酸との反応および120℃まで5分間加熱、次いで可視およびUV検出。

【0023】

HPLC分析

カラム：Supelcosil LC18、250×4.6mm、5μm

溶離剤：アセトニトリル-水 60 : 40

波長：200nm

注入量：10μl

流量：1ml/分

【0024】

最終生物学的変換生成物、たとえばデスグルコデスラムノラシンを、培養ブrossのn-ブタノールによる抽出、その後の塩素化溶剤（たとえば、トリクロロエタン）による精製工程およびシリカゲルクロマトグラフィーによって、回収することができる。最後に、イソプロパノール、酢酸エチル、クロロホルム、アセトン、メタノール等の異なる溶剤から、生成物を結晶化することができる。主生成物に加えて、C-2'にて、たとえば、2-ヒドロキシ-3-メチルペンタン酸でエステル化されたデスグルコデスラムノラシンが得られる。

【0025】

上述の醗酵生成物の酸加水分解で、アグリコンの形態のサポニン（ラスコゲニン）が得られる。

【0026】

以下の実施例は、本発明をさらに詳細に開示する。

【0027】

実施例1

フラスコ2個の培地（モルトブross（Malt Broth）、フラスコ当たり250ml）に、改良型寒天モルト培地（2%ラスコシドを添加）での選択により得られた、*Aspergillus niger*のモルト寒天（Malt Agar）での培養物からの胞子を接種した。このフラスコを、250rpmの軌道式攪拌装置上で、+27℃で48時間インキュベートした。インキュベーション後、以下の組成（数値は脱イオン水1リットルに関する）：ラスコシド乾燥抽出物（90g）、尿素（1g）、ペプトン（1g）、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ （5g）、KCl（1.5g）、 KH_2PO_4 （1g）、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ （0.2g）、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ （0.1g）、消泡剤P2000（1.5ml）、約pH5、を有する、滅菌生産ブross RO90約7リットルを含むバイオリアクターに、この前培養物を移した。

【0028】

醗酵は、溶存酸素パーセンテージ（ pO_2 ）に基づいて実施し、50%より高い pO_2 値を得るために、攪拌速度および空気流量を次第に高めた。生物学的変換の進行をHPLC分析およびTLC分析でモニタリングした。27℃にて5日間インキュベーション後、醗酵が終わった。ブrossのTLC分析およびHPLC分析から、ラスコシドが消失し、主生成物としてのデスグルコデスラムノラシンと、痕跡量のラスコゲニンが存在することが示された。

【0029】

培養ブrossをn-ブタノールで完全に抽出した。ブタノール抽出物を真空下、+60℃で濃縮乾固し、70%メタノールに再溶解し、トリクロロエタンで逆抽出した。塩素化溶液を、真空下、濃縮固化した。この生成物を、クロロホルム-メタノール混合物に再溶解した後、カラムクロマトグラフィー（Kieselgel, Merck）で溶離剤として酢酸エチル-クロロホルム 9 : 1を使用して、精製した。分画を、TLC分析またはHPLC分析で確認した。精製した生成物分画を真空下、濃縮し、次いで、アセトンに再溶解

10

20

30

40

50

し、結晶化した。さらにメタノールから結晶化した。分光分析でデスグルコデスラムノラシンと同定される生成物約7gを得た。主生成物に加えて、C-2'にて2-ヒドロキシ-3-メチルペンタン酸でエステル化されたデスグルコデスラムノラシンが少量(約800mg)得られた。

【0030】

上述の醗酵生成物の酸加水分解で、アグリコンの形態のサポニン類(ラスコゲニン類)を得た。

【0031】

実施例2

実施例1に記載のように醗酵槽で操作し、最初の生物学的転換サイクルを実施し、その後、生成物を得るために培養ブrossの90%を採取して抽出し、残りの醗酵ブross10%を新たなRO90培地と共に醗酵槽に加え、最終容量約7リットルとした。この2回目の醗酵サイクルを、上述のようなパラメーターおよび分析管理で実施した。+27℃にて約5日間インキュベーション後、醗酵を完了した。

10

【0032】

生成物を抽出および回収するために、2回の醗酵サイクルからの培養ブrossを、実施例1に記載のように処理した。最終工程の終わりに、デスグルコデスラムノラシン約14gを得た。

フロントページの続き

(56)参考文献 英国特許第0 1 3 8 0 2 5 3 (GB, B)

PEREPELITSA E D, PRIKLADNAYA BIOKHIMIYA I MIKROBIOLOGIYA, 1975, Vol.11 No.6, P.901-905

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 1/00-41/00

CA/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed