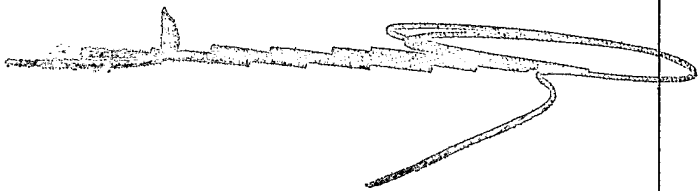


Descrição referente à patente de invenção de UNILEVER N.V., holandesa, industrial e comercial, com sede em Burg. s'Jacobplein 1, NL-3000 DK Rotterdam, Holanda, (inventores: Peter Samuel James Cheetham e Michael Andrew Quail, residentes na Inglaterra), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE L-RAMNOSE".

Descrição

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de L-ramnose por hidrólise da ligação ramnosídica de um glicosido que contém ramnose numa posição terminal por reacção enzimática.

Um tal processo para obter a L-ramnose livre a partir de um produto de glicosido é conhecido dos técnicos da especialidade. O pedido de patente Japonesa (JP-A-) 62/293 (Kanegafuchi Chem. Ind.Co.) descreve a hidrólise de glicosidos flavonóides tais como hesperidina, naringina, neo-hesperidina, rutina, linarina, poncerina ou quercitrina pela acção de uma enzima que provoca a cisão selectiva da ligação ramnosídica (ramnosidase) e a recuperação da L-ramnose do hidrolisado. A enzima utilizada foi a naringinase disponível comercialmente (uma mistura de ramnosidase e beta-glucosidase) ou a hesperidinase preparada por purificação de uma cultura líquida de certos microorganismos do género *Aspergillus* ou *penicillium*. Este processo

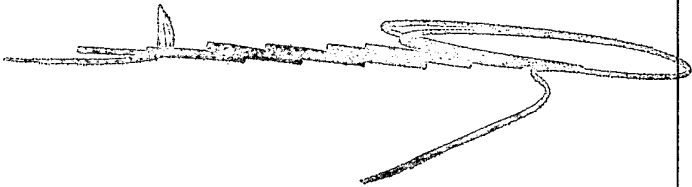


conhecido tem as desvantagens de requerer como matéria prima a enzima ramnosidase purificada bem como o glicosido flavonóide relativamente puro.

De acordo com a presente invenção em especial uma fonte impura desse produto é hidrolisada selectivamente por via enzimática usando uma combinação de enzimas capaz de degradar o material estrutural biológico, como por exemplo protease, lipase, pectinase, celulase e hemicelulase, além da ramnosidase. Deverá notar-se que muitos graus disponíveis comercialmente de ramnosidase activa no que diz respeito a naringina, hesperidina, neoesperidina, etc. contêm quantidades apreciáveis de beta-glucosidase e consequentemente de acordo com a presente invenção tais preparações de enzima são utilizadas desde que contenham um alto teor em ramnosidase. As preparações de enzimas adequadas que contenham actividade enzimática capaz de degradar o material biológico como especificado atrás e ramnosidase podem ser obtidos por mistura de enzimas purificadas fornecidas comercialmente ou por selecção cuidadosa de preparações de enzimas disponíveis que não tenham sido purificadas ou sejam parcialmente purificadas. Também se usaram com sucesso líquidos de cultura brutos de certos microorganismos.

O uso destas combinações de enzimas tem também a vantagem de provocar a precipitação de impurezas facilitando assim a purificação do hidrolisado e também permite o uso de materiais de glicosido impuros baratos tais como material bruto derivado de citrinos bem como de material flavonóide purificado que necessita de uma degradação para tornar os glicosidos disponíveis para a ramnosidase até agora utilizada que contêm uma variedade de ramnose contendo glicosidos flavonóides tais como naringina, hesperidina, neo-hesperidina, etc..

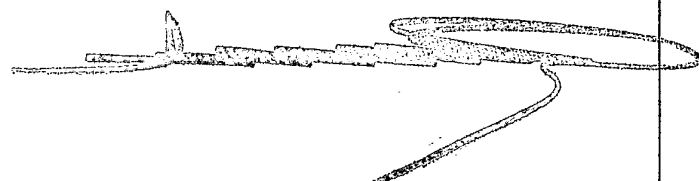
Os produtos brutos derivados de citrinos, da casca de laranja ou de toranja ou desperdícios de espremedura dos frutos constituem produtos iniciais particularmente adequados para o processo de acordo com a seguinte invenção. Por exemplo, amostras secas de casca de laranja doce e em particular pedaços de laranja verde amarga que têm um conteúdo de glicosido mais alto podem ser moídos até se converterem a pó e usa-



dos numa suspensão em água de 5 a 10% (D p/p) e em seguida incubados com uma combinação de enzima de degradação de material biológico estrutural e ramnosidase. Os produtos iniciais de glicosido tendo ramnose numa posição terminal que podem ser usados de acordo com a presente invenção podem ser produtos vegetais purificados, tal como rutina ou naringina mas de preferência produtos vegetais brutos contendo ramnose que contém glicosidos flavonóides tais como produtos de citrinos (em particular produto bruto derivado de frutos de citrinos verdes, goma arábica), alforva, ramnolípídeos microbianos ou ramnopolisacarídeos microbianos, p. ex. poliramnose. Isolaram-se microorganismos capazes de produzir ramnosidase extracelular por contaminação deliberadas de áreas de solo de jardim com naringina durante um período de meses e depois depositando amostras deste solo em placas de agar contendo naringina como fonte exclusiva de carbono. Quaisquer colónias microbianas que cresçam são assim capazes de produzir a ramnosidase requerida.

Se se liberta também glucose durante a degradação enzimática do glicosido, esta pode ser eliminada por fermentação de preferência à medida que é formada por um fermento adequado (p.ex., fermento de padeiro numa quantidade de 1 g por 100 g de material de glicosido) ou enzimaticamente, p.ex., por acção de p.ex. oxidase de glucose opcionalmente em combinação com catalase, sendo em seguida eliminada sob a forma do sal de cálcio do ácido glucónico. Também existe uma via conveniente para converter a glucose que possa estar presente em ácido 5-cetoglucónico que é depois removido. A última oxidação é efectuada convenientemente por Gluconobacter oxydans seguida por remoção do ácido 5-cetoglucónico por precipitação e filtração, produzindo um xarope de ramnose substancialmente puro. Opcionalmente a glucose e a ramnose podem ser separadas por técnicas de adsorção, p.ex. usando carvão para adsorver preferencialmente a ramnose.

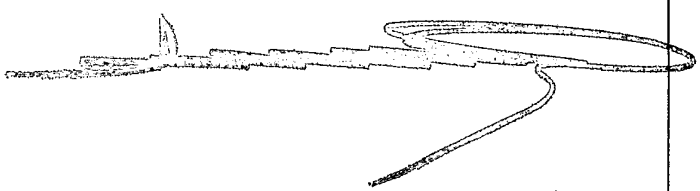
O hidrolisado obtido conforme descrito contém ramnose normalmente junto com alguma glucose e algumas flavonas e glucosidos flavónicos e de preferência é posteriormente purificado para remover a glucose, a flavona e os glicosidos flavónicos.



Os métodos convenientes para isto

são:

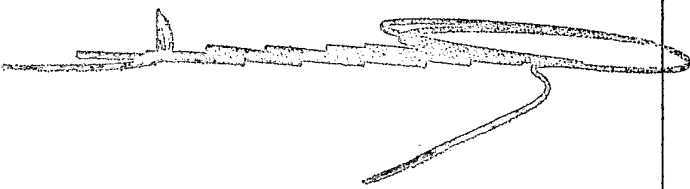
1. Fermentação selectiva da glucose com um microorganismo adequado sob condições escolhidas para fermentar de preferência glucose em vez de ramnose, produzindo-se etanol como produto secundário. Tais microorganismos são p.ex. Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans, Lactobacillus delbruckii e Proteus bulgaris. De preferência a fermentação é realizada a um pH de 4 a 4,5. A fermentação selectiva foi inibida quando o pH do xarope era mais alto p.ex. pH 6,0. De preferência o microorganismo, em especial um fermento, foi immobilizado p.ex. em alginato de cálcio, que pode opcionalmente ser seco antes de ser usado para melhorar as suas propriedades mecânicas e de armazenamento, e o hidrolisado é bombeado através de uma coluna carregada com o microorganismo immobilizado. Adicionalmente células livres ou células immobilizadas podem ser introduzidas numa reacção agitada de modo descontínuo. As actividades para reacção descontínua são de cerca de 1,9 e 3,4 g de ramnose livre de glucose por litro do conteúdo do reactor por hora respectivamente; e para células immobilizadas usadas numa coluna são de 22,4 g de ramnose livre de glucose/litro/hora. A maior parte da ramnose perdida foi metabolizada durante o início da fermentação. A variação da concentração de açúcar no xarope não tem qualquer efeito no rendimento da ramnose, que é de cerca de 65% quando se removeu toda a glucose, mas a presença de concentrações baixas de glucose resulta num tempo de fermentação proporcionalmente mais baixo, e por conseguinte deverá usar-se um caudal proporcionalmente mais alto. Rendimentos mais altos de ramnose podem ser obtidos se se aceitar alguma glucose residual p.ex. recuperações de 74%, 82% e 92,5% de ramnose respectivamente para 1%, 2% e 6% (p/p) de glucose residual. As células immobilizadas podem ser reutilizadas, mas as suas actividades podem decrescer com o tempo.
2. Em alternativa a glucose pode ser removida pela oxidação enzimática selectiva da glucose a ácido glucónico (usando oxidase de glucose e catalase), que é subsequentemente precipitado sob a forma do seu sal de cálcio, em opção juntamente com o ácido orgânico de grau alimentar, e removido. A oxidase de



glucose/catalase pode também ser usada na forma imobilizada. Preferem-se as fontes da enzima que são mais resistentes à inibição pelo produto. O momento em que a fonte de cálcio é adicionada não é crítico, na realidade pode estar presente junto com a glucose/catalase desde o princípio para precipitar o ácido glucônico à medida que este se forma, apesar de esta opção não ser a preferida. Pode usar-se também deidrogenase de glucose em vez da oxidase de glucose. Podem obter-se rendimentos de ramnose até 100% por este método eliminando completamente a glucose. O ácido glucônico é produzido como um produto secundário da glucose.

3. Oxidação selectiva da glucose a ácido 5-cetoglucônico por meio dum microorganismo adequado e a recuperação em separado do ácido 5-cetoglucônico e da ramnose. Um organismo preferido para realizar esta oxidação é a Gluconobacter oxydans. Este método contudo não funciona se a concentração de glucose na solução se situar acima de 6 a 7% (p/v) uma vez que a glucose é inibidora para altas concentrações. Por conseguinte, somente se podem tratar com sucesso por este método soluções de açúcar diluídas. Obtiveram-se rendimentos de ramnose isenta de glucose até um máximo de 95% por este método. Também se produz o sal de cálcio do ácido 5-cetoglucônico como produto secundário.
4. Adsorção/absorção selectiva quer da glucose quer da ramnose p.ex. usando carvão activo para absorver de preferência a ramnose. Este método é realizado de preferência usando o carvão numa forma cromatográfica.

A hidrólise de material de glicosido adequado de acordo com a presente invenção é realizada de preferência a uma temperatura entre 20 e 60° C, o pH da mistura incubada é de preferência mantido entre pH 2 e 8 e o tempo de incubação varia geralmente entre 30 minutos e 36 horas. A mistura incubada é depois sujeita a uma ou mais fases de purificação. Normalmente a suspensão é arrefecida primeiro e o produto sólido é em seguida removido p.ex. deixando sedimentar e decantar ou por centrifugação, depois remove-se qualquer glucose que se tenha também libertado durante a incubação como descrito anteriormente e opcionalmente segue-se posterior purificação por adsorção/absor-



ção. Em particular verificou-se ser benéfico o tratamento com material polimérico tal como polivinilpirrolidona (p.v.p.), resina de permuta de iões e/ou carvão activado. Opcionalmente pode fazer-se uma cristalização a partir do xarope, obtendo-se L-ramnose cristalina pura.

A ramnose assim obtida era de elevada pureza e um produto natural o qual era muito adequado para posteriores conversões em compostos farmacêuticos e essências.

Mais em particular, este grau de ramnose pode ser convertido em essências naturais tal como 2,5-dimetil-4-hidroxi-2,3-diidrofurano-3-ona.

A invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos:

EXEMPLO 1

Suspenderam-se 220 g de pó de citrino (ex. Zoster, Espanha) contendo principalmente naringina e neohesperidina em 1 l de água e em seguida aqueceu-se a 80°C. Adicionou-se 1 ml de enzima tendo actividade de ramnosidase (TP 104A, de Biocatalists Pontypridd, Reino Unido) suplementada com enzima SP249 (de NOVO, Dinamarca) tendo actividade de degradação estrutural de produto vegetal e incubou-se a solução a 40°C até não se libertar mais ramnose de acordo com a análise por hplc. A selectividade da reacção, isto é, o quociente entre a ramnose e a glicose deixada, foi máximo na gama de pH de 4,8 a 5,6. A enzima SP 24G aumenta ainda mais as quantidades de ramnose libertada e também a selectividade da reacção. Deixou-se repousar a mistura, decantou-se o sobrenadante e arrefeceu-se a 4°C, entretanto algumas impurezas precipitaram na forma dum depósito oleoso que se retirou. Tratou-se então o sobrenadante com 10 g de polivinil polipirrolidona (p.v.p.) para remover mais impurezas e em seguida descolorou-se o sobrenadante por adição de 2 g de carvão activado. Efectuou-se uma purificação adicional com um tratamento com resina de Amberlite (marca registada) XAD-4 (10 g).

A quantidade relativamente pequena de glucose presente no sobrenadante descolorado foi removida por

incubação com fermento (*S. cerevisiae*) e verificou-se que a solução obtida continha ramnose pura (16 g). A solução de ramnose obtida deste modo foi posteriormente cristalizada para dar 14 g de L-ramnose cristalina.

EXEMPLOS 2-10

O tratamento enzimático de pó de desperdício de citrinos obtido de Zoster, Murcia, Espanha contendo 60% de naringina foi realizado com várias preparações de enzima usando o processo descrito no Exemplo 1. As enzimas e rendimentos são apresentados no quadro abaixo:

<u>Ex.</u>	<u>Enzima</u>	<u>Rendimento de ramnose</u> (g/100 g de pó)
2	Biopectinase L	32,0
3	Naringinase Sigma	31,4
4	Hesperidinase I	27,1
5	Pectinase de elevada naringinase	27,0
6	Naringinase (Biocatalysts)	23,5
7	Biopectinase P	19,5
8	1286 (Biocatalysts)	10,6
9	Pectinex	7,5
10	Pectinase Biocon	4,5

As enzimas TP são preparações de naringinase nas quais o componente de B-glucosidase foi selectivamente inactivado por exemplo a 65° C durante 2 horas antes de utilizar.

EXEMPLOS 11-27

Tratamento enzimático de casca bruta de laranja doce ou amarga, (no todo e em quartos de Siber Hegner Ltd., Beckenham, Kent, Grã-Bretanha). Misturas impuras de enzimas, comercialmente disponíveis a granel, foram usadas para hidrolisar ramnose (+ glucose) a partir de glicosídeos flavonoides

(principalmente naringina, neo-hesperidina, etc.) presentes nos desperdícios de laranja. Estas enzimas foram suplementadas com uma mistura de enzimas de degradação de material biológico estrutural para suplementar a celulose/hemicelulase/pectinase presentes nas enzimas de naringinase impura com o fim de libertar os glicosidos da casca para assim tornar os glicosidos disponíveis para a hidrólise. A seguir à reacção purificou-se o hidrolisado e recuperou-se a ramnose.

Os resultados são apresentados no quadro abaixo:

CASCA DE LARANJA DOCE

Ex.	enzimas adicionadas	Rendimento em Ramn	Rendimento em Glu
11	1286	0,7 %	16,5 %
12	1286 + SP 249	1,2 %	17,9 %
13	TP 104A	0,3 %	14,5 %
14	TP 104A + SP 249	0,8 %	15,8 %
15	Biopectinase L	0,3 %	19,1 %
16	Biopectinae L + SP 249	0,6 %	20,2 %

CASCA DE LARANJA AMARGA

Ex.	enzimas adicionadas	Rendimento em Ramn	Rendimento em Glu
17	1286	3,0 %	4,4 %
18	1286 (aquecimento)	1,9 %	4,6 %
19	1286 + SP 249	3,7 %	9,6 %
20	1286 (aquecimento) + + SP 249	3,7 %	8,2 %
21	TP 104A	1,3 %	1,0 %
22	TP 104A + SP 249	3,3 %	6,6 %
23	Biopectinase L	3,0 %	8,0 %
24	Biopectinase L + SP 249	3,2 %	12,2 %
25	Naringinase da Sigma	2,4 %	3,2 %
26	Naringinase da Sigma + + SP 249	4,8 %	8,8 %
27	TP 110 + SP 249	2,4 %	17,6 %

Outras enzimas suplementares, tal como preparações de celulose, mostram um efeito semelhante ao de SP 249.

EXEMPLOS 28-31

Estes exemplos descrevem o tratamento simultâneo de uma suspensão de pó de desperdício de citrinos de Zoster, Murcia, Espanha a 20% (p/v) com as enzimas hidrolíticas indicadas seguida de processos de remoção da glucose como descrito nos exemplos anteriores. Os resultados são apresentados no quadro abaixo:

Ex.	Enzima	Biocatalisador adicionado	Rendimento de ramnose (%) (g/110 g de pó)	Rendimento de glucose (%) (g/100g de pó)
28	1286	S. cerevisiae	15	11
29	1286	glucose oxidase + + catalase	15,3	12,6
30	1286	G. oxidans	4,0	1,2
31	1286	nenhum*	12,9	15,9
	Biopectinase	S. cerevisiae	0,88	1,24

EXEMPLO 32

Esmigalhou-se 10 g de goma "talha" e em seguida dissolveu-se em 90 ml de água destilada. Adicionou-se 1,5 ml de uma enzima tendo actividade de ramosidase (Biopectinase L, de Biocon U.K., Ltd) e agitou-se a solução resultante à temperatura ambiente durante 68 horas, tendo-se obtido após este período ramnose equivalente a 3,2 g de ramnose por 100 g (35,5% do rendimento teórico) por 100 g de goma "talha". Também se libertaram alguns outros açúcares nesta solução.



REIVINDICAÇÕES

- 1^a -

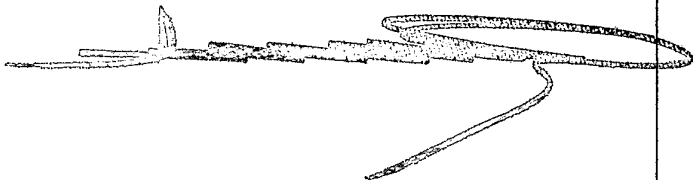
Processo para a preparação de L-ramnose por hidrolização de uma ligação ramnosídica de um glicósido contendo ramnose numa posição terminal, caracterizado por o glicósido ser enzimaticamente hidrolisado utilizando uma combinação de enzimas compreendendo um enzima de degradação de material estrutural biológico e uma preparação de naringinase, que tem uma actividade de ramnosidase superior à actividade de beta-glucosidase.

- 2^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a combinação de enzimas tendo uma actividade de ramnosidase em conjunto com actividade de enzima adicional ser uma determinada preparação de enzima parcialmente purificada, tendo uma elevada actividade de ramnosidase e uma baixa actividade de glucosidase em conjunto com uma actividade de degradação de material biológico estrutural.

- 3^a -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a actividade de enzima adicional ser derivada de um enzima do grupo consistindo em protease, lipase, pectinase, celulase e hemicelulase.



- 4^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o glicósido utilizado contendo ramnose numa posição terminal fazer parte de um material citrino bruto.

- 5^a -

Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o material citrino bruto ser derivado de frutos citrinos verdes.

- 6^a -

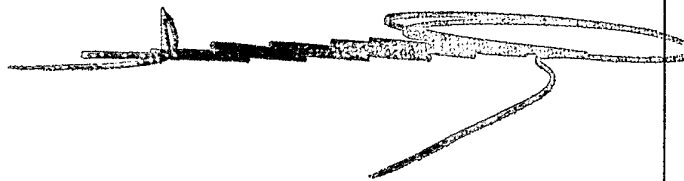
Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o glicósido contendo ramnose numa posição terminal ser escolhido no grupo que consiste em naringina, quercitrina, rutina, ramnolípídeos microbianos, ramnopolissacáridos microbianos e goma de acácia.

- 7^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a hidrólise enzimática ser realizada durante um período de entre 30 minutos a 36 horas.

- 8^a -

Processo de acordo com a reivindica-



ção 1, caracterizado por a hidrólise enzimática ser efectuada a uma temperatura entre 20º C e 60º C.

- 9^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a hidrólise enzimática ser realizada numa gama de pH entre 2 e 8.

- 10^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por qualquer glucose existente no hidrolisado obtido ser removido por oxidação química ou bioquímica.

- 11^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a hidrólise ser seguida por uma fase de purificação incluindo a remoção da glucose.

- 12^a -

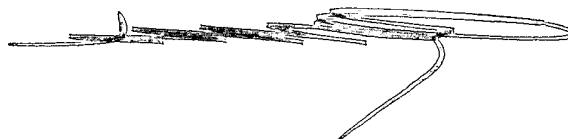
Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a hidrólise enzimática e a remoção da glucose serem efectuadas simultaneamente.

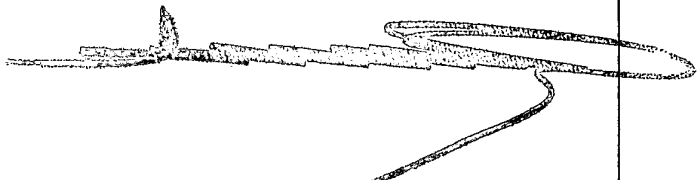
A requerente declara que o primeiro

pedido desta patente foi apresentado na Grã-Bretanha em 20 de Novembro de 1987, sob o nº. 87 27223.

Lisboa, 18 de Novembro de 1988.

SECRETARIA GERAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in dark ink, consisting of several overlapping loops and a long, sweeping tail that extends downwards and to the right.



RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE L-RAMNOSE"

A invenção proporciona um processo para a preparação de L-ramnose pela hidrolisação de uma ligação ramnosídica de um glicósido tendo ramnose numa posição terminal, hidrolisando enzimaticamente o glucósido com uma combinação de enzima, compreendendo um enzima de degradação de material estrutural biológico e uma preparação de naringinase que tem uma actividade de ramnosidase mais elevada do que uma actividade de beta-glucosidade. Preferivelmente a combinação de enzimas tendo actividade de ramnosidase em conjunto com actividade adicional de enzima é uma preparação de enzima escolhida parcialmente purificada, tendo alta actividade de ramnosidade e baixa actividade de glucosidase em conjunto com actividade de degradação de material estrutural biológico.

Mais preferivelmente a actividade de enzima adicional é derivada de um enzima do grupo consistindo em protease, lipase, pectinase, celulase e hemicelulase.

89040

