[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12P 33/00
//C12N9/24

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00808244.8

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1198941C

[22] 申请日 2000.5.29 [21] 申请号 00808244.8
[30] 优先权
[32] 1999. 6. 1 [33] IT [31] MI99A001222
[86] 国际申请 PCT/EP2000/004873 2000.5.29
[87] 国际公布 WO2000/073483 英 2000.12.7
[85] 进入国家阶段日期 2001.11.29
[71] 专利权人 因迪纳有限公司
地址 意大利米兰
[72] 发明人 C·庞佐恩 M·德罗萨
A·莫拉纳 A·迪拉加罗
审查员 辜学英

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 杜京英

权利要求书 1 页 说明书 2 页

[54] 发明名称 通过酶水解制备假叶树甾类糖苷衍生物的方法

[57] 摘要

制备去葡萄糖去鼠李糖假叶树素的方法，包括使用得自黑曲霉的粗水解酶将假叶树甾类糖苷(假叶树皂甙)进行酶水解。

ISSN1008-4274

1. 制备去葡萄糖去鼠李糖假叶树素的方法，该方法包括使用得自黑曲霉的粗水解酶将假叶树甾类糖苷进行酶水解，其中所述水解是在pH 5的水溶液中或含有至多30％体积乙醇的水-乙醇混合物中进行的，假叶树皂苷的浓度为5－40％w/v，所述水解在20－40℃的温度下进行3－7天，终产物是通过离心并用甲醇洗涤而回收的。

2. 权利要求1的方法，其中所述粗水解酶是制备物Cytolase PCL5。

通过酶水解制备假叶树甾类糖苷衍生物的方法

本发明涉及制备假叶树甾类糖苷衍生物（假叶树皂苷(ruscosaponins)）的方法。

更具体来说，本发明涉及通过部分酶水解假叶树素（ruscin）、去葡萄糖假叶树素（desglucoruscin）或假叶树糖苷(ruscoside)来制备去葡萄糖去鼠李糖假叶树素（desglucodesrhamnoruscin）的方法。

本发明酶水解是使用基于从黑曲霉（Aspergillus niger）提取的水解酶的酶粗品制备物进行的。所述制备物是商购获得的，并且用于葡萄酒和饮食工业中。特别优选使用商品名为Cytolase PCL5的从Gist Brocades购得的市售制备物。

所述酶制备物同时具有β-吡喃葡糖苷酶和α-吡喃鼠李糖苷酶活性，因此能依次除去β-葡糖苷残基和α-鼠李糖苷残基以获得所需产物。

本发明酶水解是在缓冲至pH 5的水溶液中或者含有至多约30％体积乙醇的水中进行的。已经发现，乙醇的存在对酶活性无不利影响：β-吡喃葡糖苷酶活性在乙醇存在下会增加，而与此同时α-吡喃鼠李糖苷酶活性会稍微下降，但是下降的程度无论如何也不会影响本发明反应。为了将去葡萄糖假叶树素完全溶解，需要大约30％v/v乙醇，而对于假叶树糖苷，需要约17％v/v的较低百分比。因此使用后者有时是优选的，这还因为其不需要特殊预处理，并且由于其表面活性特性可将得自第一个酶水解步骤的去葡萄糖假叶树素溶解，之后可更有效地将其转化成α-吡喃鼠李糖苷酶。

假叶树皂苷的浓度为约5－约40％w/v，并且水解是在20－50℃的温度下进行3－7天。

在生物转化结束时，不溶于反应体系的去葡萄糖去鼠李糖假叶树

素终产物可通过离心、随后用甲醇洗涤而方便地回收。此外，本发明方法可连续进行，即，在固定时间除去水解产物，并连续加入新鲜底物，这是由于所用酶的稳定性所致。对于该目的，优选使用装配有超滤膜的生物反应器以防止抑制剂和变性分子积聚。

下述实施例更详细地举例说明本发明。

实施例

使用前，在装配有XM膜(截留分子量为50 kDa)的Amicon仪器中用0.1 M柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液pH 5将酶制备物Cytolase PCL5 (Gist Brocades)渗滤(diafilitered)，以除去变性剂和抑制剂。

培养混合物是通过以下述顺序进行的加入而制得的：底物(去葡萄糖假叶树素或假叶树糖苷)、0.1 M柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液pH 5.0、Cytolase PCL5、和在搅拌下缓慢地加入乙醇。底物浓度为5-40％(w/v)、乙醇浓度为0-30％(v/w)。反应通过在硅胶板(60 F250 Merck)上的TLC进行监测，用乙酸乙酯/甲醇/水100:15:10作为展开剂。该酶制备物的活性为38单位β-吡喃葡糖苷酶和2.3单位α-吡喃鼠李糖苷酶/毫升培养混合物。

本发明生物转化在25℃进行。从去葡萄糖假叶树素开始，在约72小时内完全转化成去葡萄糖去鼠李糖假叶树素，从假叶树糖苷开始，在约96小时内完全转化成去葡萄糖去鼠李糖假叶树素。

然后将该培养混合物在4℃以12,100 g离心30分钟。用甲醇洗涤沉淀物，并在相同条件下再次离心。将该步骤重复5次，并合并上清液。然后将甲醇溶液真空蒸发，研制所得产物，以获得含有20％去葡萄糖去鼠李糖假叶树素(HPLC分析)的深黄色细粉末。