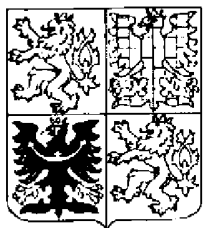


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 2934-94

(13) A3

6(51)

A 23 L 1/015

(22) 15.04.93

(32) 29.05.92

(31) 92/891224

(33) US

(40) 14.06.95

(71) American Maize-Products Company, Stamford, CT, US;

(72) Hedges Allan, Crown Point, IN, US;
Shieh Wen, Crown Point, IN, US;
Ammeraal Robert, Worth, IL, US;

(54) **Způsob odstraňování zbytkového cyklodextrinu
ze soustavy**

(57) Popsaným způsobem lze odstraňovat zbytkový cyklodextrin ze soustavy, zejména potravinové. Cyklodextrin se přidává do potravinových soustav pro odstranění nežádoucích složek v podobě komplexní látky, po jejímž odstranění však v soustavě zbývá malé množství cyklodextrinu. Ten se odstraní tím, že se na soustavu působí pro jeho zhydrolyzování kombinací alespoň dvou různých enzymů, z nichž jedním je cyklodextringlyko-syltransferáza a druhým některá amyláza. Při výhodném provedení se na soustavu obsahující zbytkový cyklodextrin působí rovněž enzymem štěpicím rozvětvené řetězce.

UČENÍ
KATEDRY
AGROCHEMIE

Číslo
9 XI 94

Způsob odstraňování zbytkového cyklodextrinu ze soustavy

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu odstraňování zbytkového cyklodextrinu, zejména pak způsobu odstraňování zbytkového cyklodextrinu ze soustavy.

Dosavadní stav techniky

V nedávných letech se cyklodextrin používal k odstraňování nežádoucích látek, jako je cholesterol, z vajec nebo másla, kofeinu z čaje a kávy, fenylalaninu z proteinových hydrolyzátů, a fenolických sloučenin, pigmentů a hořkých složek z ovocných šťav. Tento odstraňovací postup spočívá typicky ve smísení cyklodextrinu s potravinovou soustavou, čímž vznikne komplexní sloučenina nežádoucí látky s cyklodextrinem, a v následném odstranění komplexní sloučeniny z potravinové soustavy.

Jedním z problémů při použití cyklodextrinu k odstraňování nežádoucích látek z potravinových soustav je, že se z těchto soustav neodstraní veškerý cyklodextrin při oddělování komplexní sloučeniny ze soustavy. Je známo, že komplexotvorný proces je rovnovážnou reakcí, při němž se do soustavy přidá nadbytek cyklodextrinu, aby se reakční rovnováha posunula ve směru tvorby komplexní sloučeniny. To má nevyhnutelně za následek, že určité množství cyklodextrinu zůstává po odstranění komplexní sloučeniny ze soustavy v nekomplexovaném stavu.

Jiným zdrojem nekomplexovaného nebo zbytkového cyklodextrinu zbylého po odstranění komplexní sloučeniny je neodstraněná komplexní sloučenina. V některých potravinových soustavách, například kávové, se komplexní sloučenina odstraňuje v podobě sraženiny z roztoku. Často se ze soustavy neodstraní rozpustné nebo snadno suspendovatelné komplexní sloučeniny. V jiných případech, jako například u másla, se komplexní sloučeniny odstraňují promýváním másla vodou. V těchto případech se promýváním neodstraní celkové množství komplexních látek. V obou případech, jak při promývání, tak při srážení, prochází zbytkové množství komplexní sloučeniny rovnovážnou

reakcí, při níž se nežádoucí látka a cyklodextrin pohybují mezi zkomplexovaným a nezkomplexovaným stavem.

Bylo navrženo, odstraňovat zbytkový cyklodextrin z potravinové soustavy tím, že se potravinová soustava inkubuje s α -amylázou pocházející z mikroorganismů ze skupiny *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus coagulans*, *Flavobacterium*, nebo s α -amylázou z pankreatu vepře domácího, viz patent US č. 4,980.180.

Problémem spojeným s některými α -amylázami, které byly použity k hydrolyze cyklodextrinu, je, že nehydrolyzují veškerý cyklodextrin. Zejména bylo zjištěno, že nehydrolyzují cyklodextrin s rozvětveným řetězcem a nehydrolyzují veškerý α -cyklodextrin. Stává proto potřeba způsobu, kterým lze z potravinové soustavy odstranit veškerý zbytkový cyklodextrin.

Pedstata vynálezu

Nyní bylo zjištěno, že je možno odstranit veškerý zbytkový cyklodextrin tím, že se na soustavu obsahující zbytkový cyklodextrin působí v přítomnosti vody kombinací alespoň dvou různých enzymů, z nichž jedním je cyklodextringlykosyltransferáza a druhým je některá amyláza. Při výhodném provedení vynálezu se na soustavu obsahující zbytkový cyklodextrin působí rovněž enzymem odštěpujícím rozvětvené řetězce, aby se zbytkový cyklodextrin s rozvětvenými řetězci těchto zbavil. Cyklodextrin s rozvětvenými řetězci je odolnější vůči hydrolyze působením kombinace cyklodextringlykosyltransferázy s amylázou podle vynálezu než cyklodextrin s nerozvětveným řetězcem. Enzym odstraňující rozvětvené řetězce z cyklodextrinu s rozvětvenými řetězci činí cyklodextrin náchylnějším k hydrolyze kombinací cyklodextringlykosyltransferázy s amylázou. Přidání enzymu odstraňujícího rozvětvené řetězce výhodně předchází přidavek kombinace cyklodextringlykosyltransferázy s amylázou, protože některé amylázy, jako například glukoamyláza a houbová α -amyláza, působí na vlastní rozvětvení, čímž je zredukovány na glukosylový zbytek, který je odolný vůči enzymům odstraňujícím rozvětvení.

Při působení na soustavu alespoň dvěma enzymy se postupuje

tak, že se k soustavě přidají oba enzymy při pH v rozmezí od asi 4 do asi 6 při teplotě od asi 40 do asi 80 °C, a soustava se udržuje při této teplotě a pH po dobu asi 1 až asi 48 hodin. Jestliže soustava nemá uvedenou vhodnou hodnotu pH 4 až 6 před zpracováním, upraví se její pH příslušně přidáním buď kyseliny nebo zásady. Úvahou, které enzymy se mají použít u té které soustavy, se řídí podmínky zpracování. Rovněž teplota se výhodně upraví tak, aby se účinnost enzymů v soustavě optimalizovala.

Soustava se zpracovává v obvyklém zařízení a v přítomnosti vody. Enzym se výhodně přidává k potravinové soustavě jako samostatná složka a vmíchává se do ní. Zpracování se výhodně provádí za míchání běžným zařízením. Alternativně je možno alespoň jeden z enzymů immobilizovat a potravinová soustava se nechá procházet immobilizovaným enzymem.

Ačkoliv přesný mechanismus vynálezu není dokonale vysvětlen, předpokládá se, že působením cyklodextringlykolystransferázy se cyklodextrinový kruh otevírá a vytvoří se dextrin, který je pak napaden a zhydrolyzován amylázou. Je známo, že cyklodextringlykosyl-amy lázy mají schopnost vytvářet cyklodextrin ze škrobu a škrobových hydrolyzátů. O amylázách je známo, že hydrolyzují vazbu α -D-(1-4) mezi anhydroglukozovými monomery kdežto o enzymech štěpicích rozvětvené řetězce je známo, že hydrolyzují vazbu α -D-(1-6) mezi anhydroglukozovými monomery. O některých amylázách, známých jako glukoamylázy z *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus niveus*, je známo, že katalyzují hydrolyzu jak vazby 1-4, tak i vazby 1-6.

Vynález je obzvláště vhodný pro potravinové soustavy, jako jsou vaječné nebo mléčné soustavy, které byly podrobeny decholesterolizaci tím, že k nim byl přidán β -cyklodextrin k vytvoření komplexní sloučeniny s cholesterolem. V takovéto potravinové soustavě se způsob podle vynálezu používá k odstranění zbytkového cyklodextrinu po oddělení komplexní sloučeniny cyklodextrinu s cholesterolem. Způsob podle vynálezu je možno použít nejen u cyklodextrinu a cyklodextrinu s rozvětveným řetězcem, ale též u modifikovaného cyklodextrinu s nízkým počtem substitucí.

Způsob podle vynálezu byl rovněž sledován užitečným pro odstraňování zbytkového cyklodextrinu z maltodextrinu, který je vedlejším produktem při tvorbě cyklodextrinu.

Vhodnými zdroji cykloextringlykosyltransferázy jsou *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* a *Bacillus stearothermophilus*. Dobrých výsledků bylo dosaženo s *Bacillus stearothermophilus*.

Vhodné amylázy zahrnují α -amylázu, β -amylázu a glucoamylázu. Výhodnou amylázou je glucoamyláza. Vhodnými zdroji α -amylázy jsou *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*. Vhodné β -amylázy se získají z ječného sladu, sojových bobů a pšenice. Vhodné glucoamylázy se získají z *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae* a *Rhizopus niveus*. Výhodnou glucoamylázou je glucoamyláza z *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*.

Vhodnými enzymy štěpicími rozvětvené řetězce jsou pullulanáza, isoamyláza a kterékoliv jiné endo-enzymy, které hydrolyzují pouze α -D-(1-6) glukosidické vazby škrobu. Výhodně se jako enzymu štěpicího rozvětvené řetězce používá pullulanáza.

Množství jak cykloextringlykosyltransferázy, tak amylázy přidané k potravinové soustavě pro odstranění zbytkového cykloextrinu závisí v podstatě na množství zbytkového cykloextrinu přítomného v soustavě. Výhodně se používá přibližně 0,005 až asi 0,05 % hmot. cykloextringlykosyltransferázy a přibližně 0,005 až asi 0,05 hmot. amylázy. Množství enzymu štěpicího rozvětvené řetězce je výhodně v rozmezí od přibližně 0,001 do asi 0,05 % hmot. Tato hmotnostní procenta představují hmotnostní množství enzymu vztahované na hmotnostní množství zbytkového cykloextrinu.

Jak cykloextringlykosyltransferáza, tak i amyláza musí být přítomna v soustavě zároveň, aby se odstranil zbytkový cykloextrin. Je možno je přidat jednotlivě a v různou dobu, pokud jen jsou přítomné a účinné v dané soustavě. Výhodně se oba enzymy přidávají do soustavy zároveň.

Enzym štěpicí rozvětvené řetězce se do soustavy vnáší výhodně před přidáním cykloextringlykosyltransferázy a amylázy. Je však též možno přidat enzym štěpicí rozvětvené řetězce zároveň s cykloextringlykosyltransferázou a amylázou. Odborníkům je známo, že většina komerčních zdrojů cykloextrinu obsahuje malé množství

cyklodextrinu s rozvětveným řetězcem.

Jestliže je to nutné, deaktivují se enzymy po zpracování buď úpravou pH nebo zahřátím. Oba způsoby deaktivace enzymů se provádějí obvyklým postupem za použití běžného zařízení.

Vynález je blíže objasněn v dále uvedených příkladech provedení.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Tento příklad dokládá způsob podle vynálezu za použití různých amyláz a porovnává jej s použitím jediného enzymu, kyseliny nebo s použitím dvou enzymů, z nichž však žádný není cyklodextrin-glykosyltransferáza.

Ke stanovení množství cyklodextrinu se používá vysoce výkonné metody kapalinové chromatografie. Pro zjištění přítomnosti cyklodextrinu je možným množstvím 50 ppm. Jednotlivé enzymy, použité v tomto testu, jakož i podmínky, za nichž byly pokusy prováděny, jsou uvedeny v Tabulce 1. Každá soustava obsahuje 20 % 15 DE škrobového hydrolyzátu s 2 % zbytkového cyklodextrinu. Hodnota pH škrobového hydrolyzátu se upraví na hodnotu uvedenou v Tabulce 1 a k roztoku se přidá 0,01 % (hmot./hmot.) cyklodextrin-glykosyltransferázy a 0,005 % (hmot./hmot.) amylázy s výjimkou pokusů č. 10 a č. 16, kdy se použije 0,0075 % (hmot./hmot.) amylázy a 0,0025 % (hmot./hmot.) enzymu štěpícího rozvětvené řetězce. Směs se inkubuje za neustálého míchání při teplotě uvedené v tabulce. Při pokusu č. se použije dostatečného množství kyseliny k dosažení uvedené hodnoty pH, při ostatních pokusech se hodnota pH vždy upraví obvyklým způsobem.

Tabulka 1

<u>Pokus č.</u>	<u>katalyzátor</u>	<u>podmínky</u>		
		<u>pH</u>	<u>teplota °C</u>	<u>trvání pokusu</u>
1	kyselina chlorovodíková	1,7	125	2/3
2	CGTáza	5,0	80	24
3	BAA, bs	6,0	80	24

Tabulka I - pokračování

<u>pokus č.</u>	<u>katalyzátor</u>	<u>pH</u>	<u>teplota °C</u>	<u>trvání pokusu</u>
4	BAA, bl	6,0	80	24
5	FAA, an	4,8	50	24
6	FAA, ao	4,8	50	24
7	GA, an	4,8	50	24
8	GA, ao	4,8	50	24
9	Mase	6,0	60	24
10	Pase/GA, an	4,8	50	24
11	CGTáza/BAA, bl	5,5	80	24
12	CGTáza/FAA, an	4,8	50	24
13	CGTáza/FAA, ao	4,8	50	24
14	CGTáza/GA, an	4,8	50	24
15	CGTáza/GA, ao	4,8	50	24
16	CGTáza/Pase/GA, an	4,8	50	24

Enzymy a jejich zdroje, jak jsou ve zkratce uvedeny v Tabulce 1, jsou tyto:

- CGTáza = cyklodextringlykosyltransferáza z *Bacillus stearothermophilus*
- BAA, bs = bakteriální α -amyláza z *Bacillus subtilis*
- BAA, bl = bakteriální α -amyláza z *Bacillus licheniformis*
- FAA, an = houbová α -amyláza z *Aspergillus niger*
- FAA, ao = houbová α -amyláza z *Aspergillus oryzae*
- GA, an = glúkoamyláza z *Aspergillus niger*
- GA, ao = glukamyláza z *Aspergillus oryzae*
- Mase = maltogenní α -amyláza získaná z *Bacillus subtilis* a prodávaná firmou Novo Enzyme Process Division, Dánsko pod označením MALTOGENASE
- Pase = pullulanáza z *Bacillus sp.*

Po zpracování každého ze škrobových hydrolyzátů se stanoví množství cyklodextrinu zbývajících v roztoku vysoce výkonou metodou kapalinové chromatografie. Těmito zkouškami se zjistilo, že cyklodextrin byl po pokusech 1 až 10 ještě stále přítomen. Po pokusech 5, 6 a 10 byla zjištěna přítomnost α -dextrinu, naproti tomu po pokusech 11 až 16 nebyl zjištěn žádný cyklodextrin.

Příklad 2

Tento příklad dokládá způsob podle vynálezu při použití k odstranění zbytkového cyklodextrinu z dekofeinované kávy.

10 gramů β -cyklodextrinu se přidá ke 100 mililitrům kávového roztoku. Po zpracování při teplotě 60 °C po dobu jedné hodiny se roztok nechá schladnout na teplotu místnosti a vzniklá komplexní sloučenina kofeinu s cyklodextrinem se z roztoku odfiltruje. Pak se upraví pH filtrátu, což je roztok dekofeinované kávy, na hodnotu 5 a vysoce účinnou metodou kapalinové chromatografie se zjistí že filtrát obsahuje 3,3 % hmot. β -cyklodextrinu. Hranice stanovení obsahu cyklodextrinu kapalinovou chromatografií je 50 ppm. Filtrát se pak zpracuje, jak popsáno v příkladu 1, za použití enzymů uvedených v Tabulce 2.

Tabulka 2

<u>Pokus č.</u>	<u>katalyzátor</u>	<u>pH</u>	<u>teplota °C</u>	<u>trvání pokusu, h</u>
1	CGTáza/BAA, bl	5,0	60	24
2	CGTáza/FAA, an	5,0	50	24
3	CGTáza/FAA, ao	5,0	50	24
4	CGTáza/Masc	5,0	50	24
5	CGTáza/Pasc/GA, an	5,0	50	24

Po každé z těchto zkoušek bylo zjištěno, že nebyl přítomen žádný cyklodextrin.

Příklad 3

Tento příklad dokládá použití způsobu podle vynálezu ve farmaceutické soustavě.

Pro mikrobiální konverzi hydrokortisonu v prednisolon se použije komplexní sloučeniny β -cyklodextrinu s hydrokortisonem pro solubilizaci hydrokortisonu a pro urychlení reakční rychlosti. Reakcí se získá komplexní sloučenina prednisolonu. Pro přípravu produktu vhodného k injekční aplikaci se z komplexní sloučeniny uvolněný a izolovaný prednisolon suspenduje ve vodě a na vzniklou suspenzi se působí směsí cyklodextrin-glykosyltransferázy s amylázou k odstranění jakýchkoliv stop β -cyklodextrinu.

Příklad 4

Tento příklad dokládá použití způsobu podle vynálezu v průmyslové soustavě, jíž je čisticí roztok.

Pro obohacení p-xylenu při přípravě speciálního čisticího rozpouštědla byl použit β -cyklodextrin. Cyklodextrin nebyl úplně odstraněn z čisticího roztoku a zbytek cyklodextrinu zanechával stopy na čištěné součástce, které byly na závadu při jejím používání.

Para-xylenové rozpouštědlo bylo pro odstranění zbytkového množství cyklodextrinu podrobeno zpracování mícháním ve vodě obsahující směs cyklodextringlykosyltransferázy s amylázou pro zhydrolyzování zbytku cyklodextrinu. Produkty hydrolyzy neměly vliv na p-xylen a zůstávaly ve vodné fázi. Enzymem zpracovaný p-xylen nezanechával žádný zbytek na součástce po čištění.

Je úmyslem vynálezce, aby dále uvedené patentové nároky chránily všechny změny a obměny výhodného provedení vynálezu, vybraného zde pro ilustraci, které nikterak nevybočují z povahy a rozsahu vynálezu.

Průmyslová využitelnost

Způsobem podle vynálezu lze odstranit zbytkový cyklodextrin z různých potravinových a jiných soustav, k nimž se cyklodextrin přidává k odstranění různých nežádoucích látek, s nimiž vytváří komplexní sloučeninu. Po odstranění této sloučeniny však v soustavě zbývá malé množství cyklodextrinu, které lze způsobem podle vynálezu odstranit.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob odstraňování zbytkového cyklodextrinu ze soustavy, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se na soustavu obsahující zbytkový cyklodextrin a vodu působí zároveň cyklodextrin-glykosyltransferázou a amylázou při pH v rozmezí od asi 4 do asi 6, při teplotě v rozmezí od asi 40 do asi 80 °C po dobu od asi 1 do asi 48 hodin pro zhydrolyzování zbytkového cyklodextrinu.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se amyláza volí ze skupiny zahrnující α -amylázu, β -amylázu a glukoamylázu.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že soustavou je potravinová soustava ze skupiny zahrnující vejce, mléčný produkt, maso, lůj, sádlo, ovocnou šťávu, kávu a čaj.

4. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že soustavou je škrobový hydrolyzát nebo proteinový hydrolyzát.

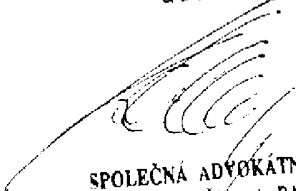
5. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že před zpracováním soustavy cyklodextrin-glykosyltransferázou a amylázou se na soustavu působí enzymem štěpicím rozvětvené řetězce při pH v rozmezí od asi 4 do asi 6, při teplotě od asi 40 do asi 80 °C po dobu od asi 1 do asi 48 hodin.

6. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že enzymem štěpicím rozvětvené řetězce se na soustavu působí zároveň s cyklodextrin-glykosyltransferázou a amylázou.

7. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a ě u j í c í s e t í m „ amylázou je bakteriální α -amyláza, houbová α -amyláza nebo glukoamyláza.

8. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že enzymem štěpicím rozvětvené řetězce se na soustavu působí zároveň s cyklodextringlykosyltransferázou a amylázou, a touto amylázou je glukoamyláza.

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát


SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETEČKA A PARTNEŘI
Hájkova 2
120 00 Praha 2