

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

295 568

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ?

C 12 P 19/18

C 12 P 19/04

C 08 B 37/16

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1999-2848**
(22) Přihlášeno: **11.08.1999**
(30) Právo přednosti: **11.08.1998 AT 1998/1380**
(40) Zveřejněno: **16.02.2000**
(Věstník č. 02/2000)
(47) Uděleno: **29.06.05**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **17.08.2005**
(Věstník č. 8/2005)

(73) Majitel patentu:

SÜDZUCKER AKTIEGESELLSCHAFT
MANNHEIM/OCHSENFURT, Mannheim, DE

(72) Původce:

Grüll Dietmar Dr., Langenschönbichl, AT
Stifter Ulrich Dr., Klosterneuburg, AT

(74) Zástupce:

JUDr. Miloš Všečetka, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:

Způsob výroby cyklodextrinu

(57) Anotace:

Způsob výroby cyklodextrinu z amylopektinového bramborového škrobu působením cyklodextringlykosyltransferázy, při kterém se jako výchozí škrobová surovina používá amylopektinový bramborový škrob, který byl získán z brambor, inhibovaných se zřetelem na tvorbu amylózy šlechtěním nebo genetickým, případně jiným molekulárně-biologickým postupem. Tato výchozí škrobová surovina sjednocuje kladné účinky přírodního amylopektinového škrobu s účinky bramborového škrobu, a vyznačuje se mimo jiné nízkým obsahem lipidů a bílkovin a tedy vyšší čistotou.

CZ 295568 B6

Způsob výroby cyklodextrinu

Oblast techniky

5

Předmětem tohoto vynálezu je způsob výroby cyklodextrinu z amylopektinového bramborového škrobu působením cyklodextrin-glykosyltransferázy (CGTáza, též označovaná jako cyklodextrin-transglykosyláza, EC Nr 2.4.1.19).

10

Oblast techniky

Pod názvem cyklodextriny se rozumí skupina látek, jejichž molekuly jsou tvořeny větším počtem jednotek anhydroglukózy s cyklicky propojenými alfa-1,4-glukosidickými vazbami, přičemž nejjednodušší cyklodextrin, alfa-cyklodextrin, obsahuje 6 glukózových jednotek. Podle počtu anhydroglukózových jednotek, obsažených ve vznikajícím kruhu, se ještě rozlišuje beta-cyklodextrin a gama-cyklodextrin. Beta-cyklodextrin je termodynamicky nejvíce zvýhodněný reakční produkt při přeměně škrobu na cyklodextrin pomocí CGTázy. Pro technické použití jsou výhodnější cyklodextriny s větším počtem kruhů.

20

V technických postupech pro výrobu cyklodextrinů se dosud používaly jako hlavní výchozí surovina tyto škroby:

Bramborový škrob: Brambory se mohou pěstovat s vysokými hektarovými výnosy též v horších polohách. Mají nízký obsah bílkovin a lipidů a proto poskytují velmi čistý škrob.

25

Škrob z kukuřice a voskové kukuřice: Kukuřice vyžaduje teplejší klima. Vosková kukuřice má dlouhé časy dozrávání. Pěstuje se ve výhodných polohách s dostatečným ohraničením od normální kukuřice. Nízké hektarové výnosy způsobují další zdražení.

30

U škrobu z kukuřice a voskové kukuřice je nevýhodou vysoký obsah bílkovin a lipidů (je nutné nákladné a drahé čištění škrobu).

Pšeničné škroby: představují horší substrát než škroby bramborové a kukuřičné, protože při výrobě cyklodextrinu poskytují značně nižší výtěžky.

35

Obyčejné přírodní škroby představují směs obou forem škrobu, totiž amylopektinu a amyulózy. Amylóza a amylopektin nejsou samy opět žádnými jednotnými látkami, ale jsou to směsi polymerů s různými molekulovými hmotnostmi a různými glukózovými vazbami. Amylóza je v podstatě tvořena nerozvětvenými polysacharidy, v nichž je glukóza v alfa-1,4-vazbě. Naproti tomu amylopektin je silně rozvětvený polymer glukózy, v němž jsou jednotky glukózy vedle alfa-1,4-vazeb v místech rozvětvení v 1,6-vazbě. Ukázalo se, že amylopektin poskytuje stálejší roztoky než amylóza, protože amylóza má sklon k nežádoucí retrogradaci, tj. k opětovnému spojení již předtím oddělených řetězců.

45

Běžné přírodní škroby obsahují 15 % až 30 % amyulózy bez ohledu kukuřice tak zvaného voskového typu poskytují škrob, který je téměř výlučně tvořen amylopektinem. V řídkých případech se může škrob, bohatý na amylopektin, získávat též z tak zvané voskové rýže, nebo z voskového ječmene.

50

Amylóza a amylopektin se mohou od sebe oddělit frakcionací. Tyto postupy jsou velmi obtížné a drahé a sotva se provádějí jinak, než v laboratorním měřítku. Kromě toho se při frakcionaci přírodních škrobů vyvolává nekontrolovatelné odbourávání a poškozování frakcí škrobu, čímž se vlastnosti takto získaných produktů nevýhodně ovlivňují.

55

Pro technické účely se proto amylopektinový bramborový škrob prakticky nepoužívá. V praxi má určité použití v potravinářské oblasti jen přirozeně se vyskytující škrob z voskové kukuřice, protože vyvolává v ústech příjemnější pocit než obyčejný škrob.

5 Výroba cyklodextrinu ze škrobu je popsána na četných místech v literatuře.

Tak patent US 3 425 910 popisuje postup výroby cyklodextrinu z hydrolyzátu škrobu. Jako výchozí škrobnatá surovina se uvádí použití bramborového škrobu. V době vydání uvedeného patentu US (1966) je bramborový škrob obvyklým škrobem s obsahem amylozy asi 20 %.

10

V přihlášce WO 93/10255 se popisuje výroba cyklodextrinu ze škrobů, obsahujících nejméně 90 % amylopektinu, čímž se má získávat cyklodextrin, který ve vodě poskytuje roztok prostý zákalu. Výhodné výchozí škroby obsahují 95 % amylopektinu, nebo více, zejména asi 99 %. Konkrétně se uvádí jako výchozí surovina škrob z voskové kukuřice, voskové rýže a voskového ječmene, přičemž se jako výhodný uvádí škrob z voskové kukuřice. Srovnávacími škroby, které jsou uvedeny v příkladu 1 k předvedení kladného vlivu použití škrobu z voskové kukuřice, jsou bramborový škrob a kukuřičný škrob s obvyklým obsahem amylozy.

15

K podmínkám postupu, uvedeným ve jmenované přihlášce PCT, patří použití komplexotvorného prostředku pro cyklodextrin za účelem jeho lepšího oddělení z reakčního prostředí. Jako komplexotvorné prostředky jsou jmenovány toluen, 1–dekanol, cyklodekanol, cyklohexan, trichlorethylen, tetrachlorethan, brombenzen, 2,3–cyklodenopyridin, naftalen, 1–naftol, 2–naftol a dimethylfenol.

20

25 V J. Szejtli und T. Ose, *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Bd. 3, Cyclodextrins, 1966, Pergamon, Oxford, UK*, se v článku 3 na straně 41, *Preparation and Industrial Production of Cyclodextrins, G. Schmidt, Wackerchemie GmbH, München, Deutschland*, podává přehled průmyslové výroby cyklodextrinů.

30 Popisují se různé podmínky přeměny a jejich působení na poměr alfa–cyklodextrinu, beta–cyklodextrinu a gama–cyklodextrinu. Přitom může přísada zvláštního komplexotvorného prostředku během výrobního postupu též změnit poměr tří druhů cyklodextrinu.

35 Dále se uvádí, že alfa–1,6–glukosidické vazby v místech rozvětvení amylopektinu blokují působení CGtázy. Když se na amylopektin před přidávkem CGtázy nechají působit enzymy, odstraňující rozvětvení, jako je například pullulanáza, nebo izoamyláza, zvyšuje se stupeň přeměny škrobu na cyklodextrin o několik procent.

40 V následující části uvedeného literárního zdroje *Szejtli a Ose* je též zmíněno, že amylopektin je lepším substrátem pro výroby cyklodextrinu, než je amyulóza, protože CGtáza na něj působí počínaje neredukujícími konci molekuly škrobu. Protože amylopektin má značně více neredukujících konců, než amyulóza, je stupeň přeměny při použití amylopektinu lepší. Proto se doporučuje používat bramborový škrob místo škrobu kukuřičného, protože bramborový škrob má od přírody o něco vyšší obsah amylopektinu než škrob kukuřičný (asi 79 % u brambor proti asi 72 % u kukuřice).

45

Konečně se ještě popisuje pokus vyrábět cyklodextrin přímo v hlízách transgenních rostlin brambor konstrukcí chimérického genu pomocí genů CGtázy z *Klebsiella oxytoca*. Přitom se skutečně mohla dokázat malá množství cyklodextrinu v hlízách brambor. Extrakce dřeně hlíz probíhala na sloupci C18 Sep–Pak, který váže cyklodextrin, ale nikoliv škrob.

50

V patentu US 4 477 568 se zmiňuje při výrobě cyklodextrinu, mimo jiné, použití frakcionovaného amylopektinového škrobu z nejrůznějších plodin, jako je kukuřice, pšenice, sorghum, brambory, tapioka, ságo a rýže.

55

Protože se však z dříve uvedených důvodů postup frakcionace škrobu neprosadil, stále se hledá výchozí surovina pro výroby cyklodextrinu, již by se odstranily uvedené nevýhody.

5 Podstata vynálezu

Podle předloženého vynálezu se při způsobu výroby cyklodextrinu z amylopektinového bramborového škrobu působením cyklodextrin-glykosyltransferázy používá jako výchozí škrobnatá surovina amylopektinový bramborový škrob, který se získává z brambor, které byly pěstováním, nebo molekulárně-biologickým, případně technicko-genetickým postupem, inhibovány se zřetelem na tvorbu amyulózy.

V posledních letech se úspěšně rozvinula geneticko-technická přeměna brambor za účelem pěstování brambor prakticky bez amyulózy. Z takových brambor získaný amylopektinový bramborový škrob kombinuje přednosti prakticky čistého amylopektinu, který vykazuje původní vlastnosti přírodního produktu, s výhodami bramborového škrobu, totiž s nízkým obsahem lipidů a bílkovin.

Nejlépe se amylopektinový bramborový škrob získává z brambor, inhibovaných proti tvorbě amyulózy pomocí antisense-techniky, nebo kosupresí.

Tyto dvě metody jsou dobře známé ze současného stavu techniky, takže jejich další vysvětlování není nezbytné.

Existují také další molekulárně biologické postup k inhibování syntézy amyulózy, jako je například postup na bázi mutace bramborových rostlin.

Odrůdy brambor, které se pro daný případ používají jako producenti amylopektinového škrobu, poskytují amylopektinový škrob s obsahem amylopektinu přes 90 %, výhodně přes 95 %. Zvláště výhodným je pro způsob podle vynálezu amylopektinový škrob s obsahem amylopektinu přes 98 %.

Stanovení obsahu amyulózy, případně amylopektinu, se provádí podle: *J. H. M. Hovenkamp-Hermelink, J. N. DeVries, F. Adamse, E. Jacobsen, W. Witholt a W. J. Feenstra, „Rapid estimation of the amylose amylopectin ratio in small amounts of tuber and leave tissue of the potato“, Potatoe Res. 31, (1988), 241–246.*

Enzym cyklodextrin-glykosyltransferáza (EC NR.2.4.1.19) se vyrábí pěstováním mikroorganismů, které tento enzym produkují, a získáváním enzymu z fermentační půdy. Příkladem takového mikroorganismu je *B.macerans*.

Cyklodextriny vytvářejí v důsledku dutin, které jsou v jejich vnitřku, klatráty nebo komplexy s různými menšími molekulami, nebo monomery. Je možno předpokládat, že tato tvorba komplexu probíhá přes hydrofobní interakci apolárního vnitřku kruhu cyklodextrinů s rovněž apolární vzniklou molekulou, jakož i pomocí van der Waalových sil. Chemické a fyzikální vlastnosti vniklé molekuly se uzavřením v cyklodextrinu změni tak, že se přitom mohou dosáhnout cílené modifikace vniklé molekuly.

K výhodnému účinku tvorby komplexu s cyklodextrinem patří:

1. Stabilizace látek, citlivých na světlo a kyslík.
- 5 2. Změna chemické reaktivity vzniklých molekul:
 - a) Reaktivní látky jsou včleněním chráněny a mohou se bez nebezpečí míchat s jinými látkami;
 - 10 b) Může se ovlivňovat selektivita reakcí včleněním funkčních skupin;
 - c) Reakce se mohou podporovat, nebo potlačovat.
- 15 3. Fixace těkavých látek:
 - a) Usnadňuje se skladování a manipulace zejména u jedovatých látek;
 - b) Může se zmenšit potřebné množství těkavých látek, protože se sníží ztráta vypařením;
 - 20 c) Aromatické látky a látky fyziologicky účinné se mohou snadněji dávkovat.
4. Změna vlastností včleněné molekuly co do použití:
 - 25 a) Látky ve vod těžko rozpustné se přidavkem cyklodextrinu lépe rozpouštějí a snadněji se mohou emulgovat;
 - b) Práškové lyofilizované komplexy cyklodextrinu jsou jemně dispergované a snadněji se rozpouštějí ve vodě, než ve vodě obtížně rozpustné nekomplexované včleněné molekuly;
 - 30 c) Pigmenty se mohou maskovat, nebo se mohou měnit barevné odstíny, protože se obecně při včlenění mění absorpční spektrum.
- 35 5. Mohou se potlačit nepříjemně chutnající látky.

Zvýšené používání cyklodextrinů se v budoucnu očekává zejména v potravinářském oboru, pokud se podaří snížit jejich výrobní náklady.

40 Amylopektinový bramborový škrob, používaný podle vynálezu, může být neupravený, nebo předem upravený mechanicky, tepelně, chemicky, a/nebo enzymaticky. Tato předběžná úprava slouží ke ztekucení, případně k lepší rozpustnosti škrobu.

Při mechanické předběžné úpravě se amylopektinový bramborový škrob ztekucuje mícháním při vysokých otáčkách.

45 Škrob se rovněž může předem upravovat při teplotách až do asi 155 °C.

Chemickou předběžnou úpravou se zpravidla rozumí zpracování kyselinou, výhodně kyselinou chlorovodíkovou.

50 Jinak se škrob může též upravit oxidačními činidly, jako je například chlornan sodný.

Když se amylopektinový bramborový škrob upravuje alfa-amylázou, pak přitom dochází k enzymatickému odbourávání, které činí škrob snadněji rozpustným.

55

Pro výrobu etherů škrobu, esterů škrobu, a/nebo zesíťovaných produktů škrobu se rovněž výhodně používá předběžná chemická úprava.

5 V daném případě se ukázalo, že úprava enzymem, odstraňujícím rozvětvení, jako je pullulanáza (EC 3.2.1.41), nebo izoamylóza, má příznivý vliv na výtěžek cyklodextrinu.

Při způsobu podle vynálezu se rovněž příznivě projevilo použití komplexotvorného prostředku.

10 Následující tabulka 1 ukazuje zvýšení výtěžku při použití pullulanázy, případně při současném použití pullulanázy a komplexotvorného prostředku.

Suspenze škrobu se předem upravila při 100 °C, cyklizační reakce pak proběhla při 25 °C.

15 Tabulka 1

| Použitý substrát | Výtěžek CD % | Výtěžek při použití pullulanázy % | Výtěžek při použití pullulanázy a komplexotvorného prostředku % |
|-----------------------------------|--------------|-----------------------------------|---|
| Frakcionovaný kukuřičný AP | 22,6 | 36,1 | 89,8 |
| Kukuřičný škrob | 14 | | 87,2 |
| Škrob z voskové kukuřice | 18,6 | | 90,6 |
| Bramborový škrob | 18,9 | | 85,9 |
| Bramborový AP z transgen. brambor | 25,1 | 35,3 | 92,3 |
| Pšeničný škrob | 15,8 | | 86,9 |

Pro nejvyšší výtěžky cyklodextrinů při použití bramborového škrobu, prostého amylyózy, je možné toto vysvětlení:

20 Při použití izoamylázy, nebo pullulanázy, jako prostředků pro odstranění větvení, vznikají zlomky s délkami řetězce o DP 60 a 18. Následující tabulka 2 ukazuje rozdělení DP různých amylopektinů, které byly zbaveny rozvětvení pomocí izoamylázy.

25

Tabulka 2

| Amylopektin | DP frakce 1 | DP frakce 2 | Obvyklý poměr F1:F2 |
|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| Brambory | 60 | 18 | 1:2,1 |
| Kukuřice | 45 | 15 | 1:3,5 |
| Pšenice | 49 | 13 | 1:4,8 |

30 Podíl malých zlomků je u bramborového škrobu nejnižší [M. T. Kalichevsky, P. D. Orford a S. G. Ring, „The retrogradation and gelation of amylopectins from various botanical sources“ *Carbohydr. Res.*, 198 (1990) 45–55]. Nejvyšší výtěžky cyklodextrinů se docílily u škrobů s $DE \leq 2$ [F. C. Armbruster und E. R. Kooi, *Production of Cyclodextrin, US-Patent 3 425 910*].

35 Výtěžky cyklodextrinů při použití amylopektinového škrobu z transgenních brambor jsou vyšší než výtěžky, které byly získány při použití škrobu z voskové kukuřice [J. W. Shieh und

A. Hedges, PCT Anmeldung WO 93/10255 (1993)J. Za vysvětlení se považuje vyšší podíl dextrinu ve frakci 1 s DP 60.

5 Ukázalo se, že nejvýhodněji se použil amylopektinový bramborový škrob se stupněm polymerace (DP) ≥ 50 . Jak je patrné z tabulky 3, stoupá výtěžek cyklodextrinu při použití výchozího škrobu se stoupajícím DP.

10 Tabulka 3

| Výtěžek cyklodextrinu % | DP |
|-------------------------|-----------|
| 51,2 | 10 |
| 70,7 | 20 |
| 92,3 | ≥ 50 |

15 Při izolaci cyklodextrinu z reakční směsi je výhodná vysoká čistota bramborového škrobu (nízký obsah tuku a bílkovin), která se například projevuje ve zlepšení transmise. V následující tabulce 4 je uveden obsah bílkovin a lipidů v komerčních škrobech:

20 Tabulka 4

| Škrob | Bílkoviny % v sušině | Lipidy |
|----------|-------------------------|-----------|
| Kukuřice | 0,2 – 0,4 | 0,5 – 0,9 |
| Brambory | 0,05 – 0,1 | 0,1 |

25 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

30 100 g bramborového škrobu z transgenních brambor, prostého amylyázy, se suspendovalo v 1 litru vody a zahřátím na 100 °C se během 30 minut převedlo v gel. Po ochlazení na 25 °C se přidalo buď 16,5 ml suspenze pullulanázy (45 U/ml) nebo 0,5 ml suspenze izoamylázy (5330000 U/ml).

35 Pullanáza: suspenze v roztoku síranu amonného, 1 jednotka (U) uvolňuje 1 μ mol maltotriózy z pullanu/min, pH 5,0, 25 °C;

40 Izoamyláza: suspenze ve 2,0 M roztoku síranu amonného, 1 jednotka (U) způsobuje, po 15 minutách při teplotě místnosti, zvýšení A_{610} o 0,1 v roztoku, připraveném následujícím způsobem: po inkubaci směsi 0,5 ml 1% rozpustného rýžového škrobu, 0,1 ml 0,5 M acetátového pufru (pH 3,5) a 0,1 ml roztoku enzymu, prováděné při teplotě 40 °C po dobu jedné hodiny se 0,5 ml alikvotního podílu smíchá s 0,5 ml 0,001 M roztoku jodidu draselného a doplní vodou na objem 12,5 ml.

45 Vsázka se míchala 3 hodiny. Pak se přidalo 10 mg cyklodextrin-glykosyl-transferázy a cyklo-dekanon jako komplexotvorný prostředek. Tato reakční směs se míchala 10 dnů. Výtěžek cyklodextrinů při použití pullulanázy činil 92,3 %.

50

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Způsob výroby cyklodextrinu z amylopektinového bramborového škrobu působením cyklo-dextrin-glykosyltransferázy (EC Nr. 2.4.1.19), **vyznačující se tím**, že se jako výchozí škrobová surovina použije amylopektinový bramborový škrob, který se získal z brambor, inhibo-
vaných na tvorbu amylozy šlechtěním, nebo genetickým, případně jiným molekulárně-biologic-
kým postupem.
- 10 2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se použije amylopektinový bram-
borový škrob, který byl získán z brambor, inhibovaných se zřetelem na tvorbu amylozy antisen-
se-technikou.
- 15 3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se použije amylopektinový bram-
borový škrob, který byl získán z brambor, inhibovaných se zřetelem na tvorbu amylozy kosupre-
sí.
- 20 4. Způsob podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že se použije amylo-
pektinový bramborový škrob s obsahem amylopektinu nejméně 95 %, výhodně nejméně 98 %.
- 25 5. Způsob podle některého z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že se použije amylo-
pektinový bramborový škrob, předem upravený mechanicky, a/nebo tepelně, a/nebo chemicky,
a/nebo enzymaticky.
- 30 6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se použije amylopektinový bram-
borový škrob, který byl ztekucen mícháním při vysokých otáčkách.
- 35 7. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se použije amylopektinový bram-
borový škrob, který byl upraven tepelně při teplotě až do 155 °C.
- 40 8. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se použije amylopektinový bram-
borový škrob, který byl upraven kyselinou, výhodně kyselinou chlorovodíkovou.
- 45 9. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se použije amylopektinový bram-
borový škrob, který byl upraven oxidačním činidlem, výhodně chlornanem sodným.
- 50 10. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se použije amylopektinový bram-
borový škrob, který byl upraven alfa-amylázou.
11. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se použije amylopektinový bram-
borový škrob, který byl etherifikován, esterifikován, a/nebo zesítěn.
12. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se použije amylopektinový bram-
borový škrob, který byl ošetřen enzymem, odstraňujícím rozvětvení.
13. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se použije amylopektinový bram-
borový škrob, který byl ošetřen izoamylázou (EC 3.2.1.68) nebo pullulanázou (EC3.2.1.41).
14. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se použije amylopektinový bram-
borový škrob s DP \geq 50.

15. Způsob podle některého z nároků 5 až 13, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že přeměna škrobu se provádí pomocí CGtázy v přítomnosti komplexotvorného prostředku pro cyklodextrin.

- 5 16. Použití amylopektinového bramborového škrobu, získaného z brambor, inhibovaných na tvorbu amylózy šlechtěním, nebo genetickým, případně jiným molekulárně-biologickým postupem, jako výchozí škrobové suroviny pro výrobu cyklodextrinu zpracováním škrobu CGtázou podle způsobu, uvedeného v některém z nároků 1 až 15.

10

Konec dokumentu

15