

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(11) (13)
194939 B

(22) A bejelentés napja: 83.12.22. (21) 4406/83
A módosítás napja: 87.02.12. 2925/87

(51) Int.Cl.
C 12 P 12/08

(41) (42) A közzététel napja: 1985.08.28.

(45) Megjelent: 1989. 03. 06.

(72) Feltalálók:
SERES Gábor, 40%, Halásztelek, dr. JÁRAI
Miklós, 13%, PIUKOVICH Sándor, 13%,
SZIGETVÁRINÉ, dr. GABÁNYI Mária, 24%,
dr. SZEJTLI József, 10%, Budapest

(73) CHINOIN Gyógyszer és Vegyészeti
Termékek Gyára Rt., Budapest

(54) ELJÁRÁS ALFA-, BÉTA- ÉS GAMMA-CIKLODEXTRIN NAGYHOZAMÚ ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás alfa-, béta- és gamma-ciklodextrin nagyhozamú előállítására, alfa-amilázzal részlegesen hidrolizált, alacsony redukálóképességű — ahol a redukáló képesség 0,5 és 10 DE egység között van — keményítő szubsztrátból ciklodextrin-glükózil-transzferáz enzimmal oly módon, hogy a hidrolizátumot a ciklodextrinokkal terner komplexeket képező kombinált lecsapószer-elegy jelenlétében konvertálják, ahol is kombinált lecsapószer-elegyként R_1COR_2 általános képletű alifás keton — ahol R_1 és R_2 jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, 1—6 szénatomos alkilcsoport, CO jelentése karbonil-csoport — és $R_3R_4Phe-OH$ általános

képletű fenolszármazék — ahol R_3 és R_4 jelentése hidrogénatom, 1—4 szénatomos alkil-csoport, vagy R_3 és R_4 együttesen fenil-csoport, Phe jelentése fenil-csoport, OH jelentése hidroxil-csoport-, vagy R_5R_6Phe általános képletű benzol-származék — ahol R_5 és R_6 jelentése hidrogénatom, 1—4 szénatomos egyenes vagy elágazó szénláncú alkil-csoport, vagy R_5 és R_6 együttesen fenil-csoport-, elegyét, vagy R_1COR_2 általános képletű alifás keton, — ahol R_1 és R_2 jelentése a fenti— és R_7OSO_3X általános képletű alkáli-alkil-szulfát — ahol R_7 jelentése 8—18 szénatomos alkilcsoport, X valamely alkáli fém — elegyét alkalmazzák.

Találmányunk tárgyát gamma-, béta- és alfa-ciklodextrin nagyhozamú előállítására szolgáló eljárás képezi.

Ismeretes, hogy a ciklodextrinek (Schar-dinger dextrinek, cikloamilózok /alfa/1→4/ kötésekkkel kapcsolódó 6–12 anhidroglukopiranoz egységekből álló ciklikus oligoszaccharidok. Közülük a 6-, 7, illetve 8-tag-számú gyűrűvel rendelkező alfa-, béta-, illetve gamma-ciklodextrin (a továbbiakban CD) a legjelentősebb. Üreges szerkezetük következtében zárványkomplex képzésére hajlamosak. Mivel a legkülönbözőbb molekulákat képesek üregükbe bezárni, és ezáltal külső nem-kívánatos hatásoktól megvédeni, a gyógyszer- és élelmiszeripar részéről jelentős érdeklődés nyilvánul meg irántuk.

A ciklodextrinek a keményítő enzim lebontási termékei, nem toxikus anyagok. A keményítőtől egy különleges alfa-glukán depolimerizáló enzimmel, a ciklodextrin-glükozil-transzferázzal (a továbbiakban CGT) (E.C. 24.1.19.) állíthatók elő. Ez az enzim rendszerint *Bacillus macerans*, *Bacillus polymixa*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus circulans*, *Klebsiella pneumoniae*, alkalofil *Bacillus species* N° = 38–2, N° = 17–1 szüllyesztett tenyészetéből állítható elő. A CTG különleges, nem hidrolitikus jellegű, főként glükozil-csoport átvitelén alapuló keményítő-degradáló tulajdonsággal rendelkezik. Bármely szubsztrátot fel tud használni, melyben (1→4) glukán kötések vannak, például amilózt, amilopektint, glikogént, stb. A CTG e szubsztrátokból lineáris és ciklikus oligoszaccharidok keverékét állítja elő, ahol a reakcióelegyben a béta-ciklodextrin aránya a legnagyobb.

Az egyes ciklodextrin-féleségek (komponensek) egymáshoz viszonyított aránya megváltoztatható, ha a keményítőt és CGT-t tartalmazó reakcióelegyhez oldhatatlan komplexeket képező reagenseket adagolunk, mivel az egyes komplexképzőkkel a legstabilisabb komplexet adó ciklodextrin-féleség dúsul fel a reakcióelegyben.

Ismeretes, hogy zömmel alfa-CD-t tartalmazó konverzióelegy nyerhető 8–18 szénatomszámú alifás alkoholok hozzáadásával. Így például az 51–12941 lajstromszámú japán szabadalmi leírás szerint 1-dekanol és 1-nonanol lecsapószer alkalmazásával segítik elő az alfa-CD képződését, 0–2 dextróz ekvivalens (DE) redukálóképességű, gyakorlatilag glükózmentes keményítő-hidrolizátumból. Az egyik kiviteli példában 1-dekanol komplexképzőszer alkalmazásával 48 óra alatt, 45°C-on, 36% alfa-ciklodextrin előállítását írják le.

A 3 640 847 lajstromszámú amerikai egyesült államok-beli szabadalmi leírásban (Armbruster és tsai) leírt módszerrel szintén zömmel alfa-ciklodextrint tartalmazó konverzióelegyet állítanak elő, 20 DE-t meg nem haladó redukálóképességű keményítő-hidrolizátum-

ból, legalább 8 szénatomos alifás láncot tartalmazó lecsapószer alkalmazásával, ilyenek lehetnek: alkoholok (1-oktanol, 1-nonanol, 1-dekanol, 1-undekanol, 2-undekanol, 1-dodekanol, 9-decen-1-ol, 1-oktadekanol), aldehidek (1-dekanal, 1-dodekanal), ketonok (2-dekanon), zsírsavak (1-dekánsav), éterek (dodecileter), észterek (metil-oktanoát, metil-dekanoát, metil-dodekanoát), tioalkoholok (1-dekántiol), nitrilek (1-undekán-nitril) vagy szerves halogenidek (1-decil-klorid), vagyis végcsoportjukban ként vagy annál elektronnegatívabb atomokat tartalmazó alifás szerves vegyületek. Az egyik kiviteli példa szerint 30%-os burgonyakeményítő hidrolizátumból 3 napon át, 55°C-on, 1-dekanol lecsapószer jelenlétében végzett konverzióval, a keményítő súlyára vonatkoztatva 65 tömeg% alfa-ciklodextrin képződik. Számos molekula ismert, amely oldható és oldhatatlan zárványkomplexet képez alfa-CD-vel. Így például alkalmas vendégmolekulák lehetnek halogénezett benzol-származékok, benzol, difenil, ciklohexán, 4,4-dihidroxidifenil, terfenil, o-klór-fenol, anilin, N-metil-anilin, p-klór-anilin, etil-bromid, 1,6-dibrom-hexán, 1,4-dibrom-bután, etil-klór-acetát, propionsav, vajsav, kapronsav, dimetil-glioxim, elemi klór, -brom, -jód-kálium-jodid, p-cimol, p-fenilén-dia-krolein, hidrokinon, vinil-etil-éter, o-klór-hidrokinon, 1,4-butánditiol, 1,6-hexánditiol, bisz (10-merkaptodekametilén)-éter, széndiszulfid [Chem. Ber. 90, 2561 (1957)].

A 3 541 077 lajstromszámú amerikai egyesült államok-beli szabadalmi leírásban ipari méretben is alkalmazható alfa-CD kinyerési módszert ír le Armbruster, keményítő konverzióelegyből kiindulva, ahol az alfa-CD-vel oldhatatlan zárványkomplexbe vivő vendégmolekulák: ciklohexán, tetraklór-etán, triklór-etilén, benzol, hexán, 1-oktanol, toluol, széndiszulfid lehetnek. E módszer gyakorlati alkalmazását megnehezíti az a tény, hogy a létrejött konverzióelegyet vagy a feldolgozási intermediert nehéz tovább tisztítani, melynek oka részben az átalakulatban keményítővel képzett hidrofób intramolekuláris adduktok keletkezése miatt fellépő rossz szűrhetőség, részben a lecsapószer egy részének magas forrponjtja, mely megnehezíti vízgőzdesztilláció útján történő eltávolításukat a rendszerből.

Ismeretes, hogy a gamma-CD-vel zárványkomplexeket képeznek a következő molekulák: klórozott benzolszármazékok, benzol, cikloalkánok, ciklohexanol, naftalin, antracén, 9,10-diklór-antracén, difenil, terfenil, anilin, N-metil-anilin, N,N-dimetil-anilin, etil-bromid, 8-oxi-kinolin, o-klór-fenol, jód-kálium-jodid, p-cimol, eferdin [Chem. Ber. 90, 2561 (1957)]. Keményítő konverziókban gamma-CD ipari előállítására még nem alkalmazták ezeket a vendégmolekulákat. Ismert az irodalomból egy, a japán kutatók által leírt eljárás a béta-CD gyártásakor keletkezett kristályosítási anyalug gamma-CD tartalmá-

nak kinyerésére (Horikoshi et al., Proceedings of 1st International Conference of Cyclo-dextrins, Budapest, 1981. Reidel Publ. Co., 1982.). Az alkalofil species N° = 38—2 eredetű CGT-zal végzett béta-CD gyártás kristályosítási anyalúgját a lineáris-dextrin tartalom megbontása céljából amiloglükózidázzal kezelik, a reakcióelegyben keletkezett glükózt Diaion FRK—01 típusú ioncsereelő-vel kiszűrik, majd a gamma-CD tartalmat Toyo Pearl HW—40 típusú gélszűrő oszlopon elválasztják, az effluens bepárlása és tisztítása után a gamma-CD-t kikristályosítják. Az eljárás hátránya, hogy mivel nem gamma-CD előállítására irányuló célzott módszer, a gamma-CD kitermelése meglehetősen rossz: 20 kg/tonna kiindulási burgonyakeményítő.

Ismeretes, hogy 1—8 szénatomszámú alifás alkoholok és 2—4 szénatomszámú ketonok alkalmasak a CGT-katalizált keményítő-ciklizáló reakciók sebességének növelésére, ezáltal az alfa- és béta-CD termelés %-ának emelésére (80—156—595 sz. Japán Kokai, C.A. 94, 172.894), az alfa-CD %-ának emelésére pedig alkalmas binér komplexképző a nátrium-lauril-szulfát (77—79,0,39 sz. Japán Kokai, C. A. 87, 150.201).

Célul tűztük ki olyan módszer kidolgozását, mellyel ugyanazon kiindulási anyagból, kivánság szerint zömmel alfa-CD, béta-CD, illetve gamma-CD állítható elő.

Meglepő módon azt találtuk, hogy a kitűzött célnak megfelelő eljáráshoz jutunk, ha az általunk felderített konszekutív CD-képződésre alapozzuk előállítási eljárásunkat. E szerint a reakciómechanizmus szerint a már megtermelt alfa-CD-ből keletkezik a béta- és a gamma-CD; méghozzá a gamma-CD a reakció utolsó fázisában keletkezik, amikor az enzim már jórészt inaktíválódott. Belátható tehát, hogy a konszekutív reakciósorban elsőként keletkező alfa-CD mennyisége limitálólag hat a béta- és gamma-CD mennyiségére, vagyis ha az alfa-CD kezdeti képződési sebességét megemeljük, ez a későbbi béta- és gamma-CD termelésre kedvező hatással van. További limitáló faktor a kesői reakciófázisban felhalmozódó jelentékeny mennyiségű lineáris dextrin, amelyek jelenlétében az eredetileg ciklikus termékek képződése felé irányuló enzimhatás a deciklizálás és a diszproporcionálás irányába tolódik el.

Mivel, mint ismeretes, az egyes CD-k üregátmérője között nagy különbség van, a gamma-CD üregében nem elég nagy stabilitási állandóval komplexálódnak az alfa-CD és béta-CD lecsapószerkezetek és a lecsapószerkezetek a gamma-CD vagy egyáltalában nem keletkezik, vagy csak elhanyagolhatóan kis mértékben oldhatatlan zárványkomplex formájában. Az oldatban pedig a diszproporcionáló enzimhatás következtében lineáris dextrinekké reagál.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy ha a primer reakció, vagyis az alfa-CD keletkező-

sének a sebességét valamely alkalmas anyaggal fokozzuk (pl. alifás keton, vagy alkohol), ezáltal az alfa-CD kezdeti koncentrációját megemeljük. Ugyanakkor ha ez az anyag a szekunder reakcióban keletkezett béta- és gamma-CD-vel, és az alkalmazott második lecsapószerrel olyan terner komplexet képez, mely nagyobb stabilitású és rosszabb vízoldékonyságú, mint a primer reakcióban keletkezett biner komplex, akkor ezáltal a szekunder reakciótermékek aránya jelentősen megnő a konverziós termékben. Tehát ha az alfa- és a béta, ill. a gamma-CD lecsapószerkezet keverékét tesszük a konverziós elegyhez, akkor a reakcióközegben megnő a gamma-CD mennyisége. Ez az alapvetően új felismerés alkotja találmányunk lényegét. Célszerű a reakciókörülményeket úgy megválasztani, hogy a gamma-CD képződése minél gyorsabban menjen végbe, vagyis optimálni kell a CGT működését és a lehetőségekhez képest minél inkább háttérbe szorítani a diszproporcionáló hatást.

Kutatásunk eredményei szerint tehát alkalmasan megválasztott terner komplex lecsapószerkezet jelenlétében bármelyik CD-féleség előállítható a keményítő konverzió fő komponenseként. Az előállításához bármely amilóz-amilopektin arányú keményítő (pl. burgonyakeményítő, kukoricakeményítő, waxy-kukoricakeményítő, rizs-, tápióka-keményítő, különböző béta-amiláz-mentes gabonakeményítők, stb.), valamint amilóz, amilopektin és glikogén is felhasználható az enzim szubsztátjaként. A szubsztátok közvetlenül vagy a nagyobb fajlagos hozam elérése céljából limitált savas, lúgos vagy enzimes előhidrolízisnek alávetve alkalmazhatók. A hidrolízist úgy állítjuk be, hogy a kapott parciális hidrolizátum redukálóképessége 0,5 és 10 DE tartományban legyen. (DE érték jelentése: 1DE = 1 tömeg% glükóz ekvivalens redukáló képessége, meghatározását a DIN 1263 szabvány szerint végezzük.)

A limitált enzimes hidrolízishez alkalmazott alfa-amiláz bármilyen eredetű lehet, például *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymixa*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, stb. A fenti limitált hidrolízis esetén már a kezdeti reakciófázisban biztosítjuk, hogy glükózil-akceptor hiányában diszproporcionálódás ne mehessen végbe.

Találmányunk szerinti eljárás kiindulási anyaga kukoricakeményítő, melyet részleges hidrolízisnek vetünk alá. A parciális degradációt *Bacillus* eredetű alfa-amilázzal végezzük, kalcium ionok jelenlétében, pH = 7 közegben, 80°C-on. Mielőtt a hidrolizátum redukáló képessége a 8 DE egységet meghaladná, 120°C-on, 10⁵ pascal túlnyomáson végzett hőinaktiválással megszakítjuk az enzimes hidrolízist. Így mintegy 10—40 tömeg%-os keményítő hidrolizátumot kapunk, melynek redukálóképessége kisebb, mint 8 DE egység. A hidrolizátum aránylag nagy láncösszű-

ságú dextrinek elegyét tartalmazza és gyors retrogradálódásra hajlamos. Mivel a retrogradált termékek a CGT hatás szempontjából kevésbé hozzáférhetőek, a retrogradálódás kiküszöbölésére az alfa-amiláz inaktiválása után azonnal hozzá kell adni a CGT-t a reakcióelegyhez. A CGT enzim *Bacillus species* eredetű, az eljárásunkban alkalmazott CGT-t a *Bacillus species* BM 10—68 MNG 00154 állítja elő. Ezután a kezdeti gyors CD-képződés elősegítésére alifás rövidszénláncú ketont adunk a rendszerhez, majd a szekunder reakciótermékek konvertálására alifás ketonban oldott kondenzált fenol-származékot vagy alkilcsoporttal szubsztituált fenol-származékot, vagy zsíralkohol-szulfátot. Az alkalmazott keton: acetone, di-etyl-eton, metil-etyl-eton, metil-propil-eton, metil-izobutil-eton, az alkalmazott kondenzált fenol-származékok: 1-naftol, 2-naftol, az alkilcsoporttal szubsztituált fenol-származékok (xilenol-izomer): 2,4-dimetil-fenol, 2,6-dimetil-fenol lehetnek.

A gamma-CD képzéséhez legalkalmasabbak a következő kombinált lecsapószer-rendszerek: metil-etyl-eton és 2,4-dimetil-fenol, illetve metil-etyl-eton és 1-naftol 1:1 súlyarányú elegye.

Ily módon például egy 35 tömeg%-os kukorica-keményítő hidrolizátumban, CGT hatására, 35—45°C-on, 20—50 órás reakcióidő alatt, metil-etyl-eton és 1-naftol 1:1 arányú elegyét, mint kombinált lecsapószerként 10 tf%-ban alkalmazva, a gamma-CD konverziófoka eléri a 35%-ot.

Az alfa-CD előállítására alkalmas szelektív terner komplexképzési reakció fog végbemenni, ha a rövidszénláncú alifás keton lecsapószerként valamely C = 8—18 szénatomszámú zsíralkohol-szulfáttal kombinálva alkalmazzuk.

Az alfa-CD képzéséhez a legalkalmasabb a következő kombinált lecsapórendszer: metil-etyl-eton és nátrium-lauril-szulfát 1:1 súlyarányú elegye. Ily módon pl. 40 tömeg%-os keményítő-hidrolizátumban, CGT hatására, 40°C-on és pH=6 értéken 20—30 órás reakcióidő alatt a fenti kombinált lecsapószer-rendszert alkalmazva, az alfa-CD konverziófoka eléri a 40%-ot.

Kísérleteink folyamán a CD-tartalmat vékonyrétegekromatográfiás, ill. folyadékromatográfiás módszerrel határozzuk meg. (Szejtli J.: Cyclodextrins, Their Inclusion Complexes p. 53—54, Akadémia Kiadó, Budapest, 1982. és Proc. 1st Int. Symp. on Cyc-

lodextrins, p. 42, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982).

A CGT aktivitását Kitahata módszere alapján mértük (Okada, Kitahata 3 888 738 lajstromszámú amerikai-egyesült-államok-beli szabadalom). Az elfolyósítás alfa-amiláz aktivitását Sandstedt és társai módszere szerint mértük [Cereal Chem. 16, 712 (1939)].

Eljárásunk részleteit az alábbi példákön mutatjuk be, anélkül, hogy találmányunkat ezekre korlátozni szándékoznánk.

1. példa

170 g kukoricakeményítőt 340 g csapvízben szuszpendálunk, a kapott zagy pH-ját 10 súly%-os sósavval 5—6 közé, majd 10 tömeg%-os vizes kalcium-hidroxid szuszpenzióval 7,1—7,4 közé állítjuk be. Ezután alfa-amiláz segítségével (NOVO Industri A. S. Kopenhága, BAN 240 L típus) 80°C-on, 15 percig elfolyósítjuk. A hozzáadott enzim mennyisége: 2 SKB egység/g keményítő (SKB egység: amiláz aktivitási egység, Sanstedt, Kneen, Bergström: Cereal Chem. 29, 108, 1952). Ezután a feleslegben maradt enzimet 30 perces 120°C-on végzett hőkezeléssel inaktíváljuk. Az így kapott hidrolizátum redukáló képessége 7,4 DE.

2. példa

Konverziós elegy előállítása

Az 1. példa szerint előállított hidrolizátum 3 ml-es aliquot részeit egy alkalmas blokkreaktor 5 ml-es reakciócsöveibe mérjük (például Reactitherm típus, Pierce Chemical Comp., Rockford). Az így kimért 9 db szubsztrát adaghoz 45°C-on 24 Kitahata egység/g keményítő alkivítású CGT-enzimet adunk (Kitahata egység: CGT aktivitási egység/g keményítő aktivitású CGT-enzimet Chem. 38, 387, 1974). A CGT enzim eredete: *Bacillus species* BM 10—68, MNG 00154). 1 óra múlva az egyes csövekbe a következő lecsapószerkeket adagoljuk, 5% mennyiségben: 6 csöbe metil-etyl-eton (MEK), majd sorban a következő terner komplexképzőket: nátrium-lauril-szulfát (SDS), 1-dekanol (n-D) 2,4-dimetilfenol (2,4-DMP), 1-naftol (1-N), toluol (To), p-cimol (p-ci). A 7., 8., és 9. csöbe kontrollként MEK-t, 1-N-t, ill. SDS-t adunk.

Ezután a konverziót 45°C-on folytatjuk. A reakcióelegyből vett mintákban a konverziófokot az egyes CD-féleségek HPLC módszerrel végzett meghatározásával követjük. Az analízis eredményét az 1. sz. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat

terner komplexáns vegyületpár	Konverzió idő (h)	Ciklodextrin			Összes CD konverziófok (%)
		alfa	béta	gamma	
		vegyes %			
MEK + SDS	24	6,71	1,73	0,17	23,91
	60	9,46	3,33	0,12	35,86
MEK + n-D	24	4,25	1,05	0,40	15,83
	60	6,21	4,57	0,31	30,77
MEK + 2,4-DMP	24	0,38	14,47	5,14	55,52
	60	0	16,56	6,94	65,27
MEK + 1-N	24	0,69	14,72	4,17	54,41
	60	0	17,65	5,76	65,05
MEK + To	24	0,77	14,52	0,92	45,02
	60	0,14	18,26	0,66	52,94
MEK + p-ci	24	0,53	15,29	0,47	45,25
	60	0	19,40	0,14	54,28
MEK kontroll	24	3,10	5,27	0,55	25,43
	60	2,74	7,91	0,21	30,15
1-N kontroll	24	0,73	11,97	0,83	37,58
	60	0,28	13,44	0,40	39,22
SDS kontroll	24	4,02	1,0	0,1	14,22
	60	7,13	2,61	0	27,05

A táblázat eredményei azt mutatják, hogy az első kettő terner komplexáns vegyületpár leginkább alfa-CD, a második kettő leginkább gamma-CD, az utolsó kettő pedig leginkább béta-CD-ben dús konverzióelegy előállítására alkalmas.

3. példa

Konverziós elegy előállítása

Az 1. példa szerint előállított kukoricakeményítő hidrolizátumból a 2. példában leírt blokkreaktor reakciócsöveibe 3—3 ml-t mérünk, majd 24 Kitahata egység/g kemé-

nyítő CGT-t adunk hozzá 45°C-on, és a csövekbe sorban 500—500 µl mennyiségben metil-etil-eton (MEK) és toluol, dietilketon (Et₂CO) és toluol, metil-izobutil-eton (MIBUK) és toluol, MEK és xilol, Et₂CO és xilol, valamint MIBUK és xilol 1:1 térfogatarányú elegyét, illetve MEK és 1-naftol, MEK és 2,4-dimetil-fenol (2,4-DMP) 1:1 súlyarányú elegyét, illetve kontrollként toluolt mérünk. A naponként vett minták vékonyrétegekromatográfiásan végzett CD-analízisét a 2. táblázatban foglaltuk össze:

2. táblázat

Terner komplexáns vegyületpár	alfa-CD béta-CD gamma-CD vegyes % a konverzióelegyben								
	Napok száma								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
MEK + toluol	3	2	1	4	10	16	-	-	-
Et ₂ CO + toluol	4	7	4	5	8	15	-	1	2
MIBUK + toluol	3	1	1	3	10	17	-	-	-
MEK + xilol	5	5	3	6	10	14	-	2	1
Et ₂ CO + xilol	5	4	3	5	9	10	-	3	3
MIBUK + xilol	3	2	1	8	12	18	-	-	-
MEK + 1-naftol	4	3	1	6	11	15	7	13	10
MEK + 2,4-DMP	4	2	0	5	5	12	6	15	14
Toluol kontr.	3	1	1	4	6	12	-	-	-

4. példa Alfa-CD-ben gazdag reakcióelegy előállítása

Az 1. példa szerint kapott hidrolizátum 150 ml-éhez 45°C-on 1200 Kitahata egység CGT enzimet adunk, majd egy óra kezdeti reakcióidő után 4,5 ml MEK-et és 10 g SDS-t adunk hozzá. A konverziót 40°C-on 60 óráig folytatjuk. A nyert konverzióelegyet felforraljuk az enzim inaktiválása céljából. Ily módon olyan konverzióelegyet kapunk, amelynek összetétele 10,23% alfa-CD, 4,71% béta-CD és 0,1% gamma-CD (HPLC-vel mérve).

Ezután a reakcióelegy pH-ját 4,3-ra állítjuk, a reakcióhőmérsékletet 55°C-ra emeljük és az elegyhez keményítő súlyra számolt 1 AGU/g amiloglükozidázt és 30 Fu/g Fungamyl amilázt adunk (AGU: amiloglükozidáz egység, NOVO Technical Bulletin N° 338, Fu: Fungamyl egység, NOVO Technical Bulletin N° 312) mindkét enzim a NOVO Industri A.S. Koppenhága gyártmánya). A 6 órás reakcióidő után kapott konverzióelegy CD-tartalma: 14,88% alfa-CD, 0,16% béta-CD. A reakcióelegyet 300 ml desztillált vízzel hígítjuk, 10 percig forraljuk és szobahőmérsékleten leszűrjük. A szűrletet 100 ml OH⁻ ciklusban lévő erős anioncserélővel töltött ioncserélő oszlopon 1 ml/min térfogatebességgel átbocsájtjuk. Az effluenset 1 g aktív szénnel 20 percig kevertetve derítjük, majd a derített szűrletet 15 tf% szárazanyag-tartalomig bepároljuk, 15 tf% kloroformmal Biomix homogenizátorban csapvíz hűtéssel 1 óráig kevertetjük, a keletkezett oldhatatlan komplexet lehűtjük, 100 ml desztillált vízben felfuszpendáljuk és 50 tf% szárazanyag-tartalomig bepároljuk.

Egy éjszakán át +4°C-on végzett kristályosítás után 18,3 g kristályos alfa-ciklodextrint nyerünk, amelynek tisztasága HPLC-vel mérve 99,3%. A kiindulási keményítőre vonatkoztatott kitermelés 36,6%.

5. példa Béta-CD-ben dús konverziós elegy előállítása

Az 1. példa szerint előállított hidrolizátum 150 ml-éhez 45°C-on 1200 Kitahata egység CGT enzimet adunk, majd egy óra múlva 4,5 ml MEK és 4,5 ml toluol elegyet (3 tf% + 3 tf%). A konverziót 60 óráig folytatjuk. A kapott 460 ml konverzióelegyet HPLC módszerrel analizáljuk és az alábbi CD-tartalmat kapjuk: alfa-CD 0,08%; béta-CD 19,48%; gamma-CD 0,59%.

A konverzióelegy pH-ját sósavval 4 értékre állítjuk és leszűrjük. A komplex lepényt szűrőn 50 ml desztillált vízzel kimossuk és a nedves nyers béta-ciklodextrint 500 ml desztillált vízben felfuszpendáljuk és a toluol-tartalmat 2 órás vízgőz desztillációval lepároljuk. A toluolmentesített béta-CD oldatot 70°C-on desztillált víz hozzáadásával 10%-os szárazanyag-tartalomra állítjuk be, 1 g aktív szenet adunk hozzá és 70°C-on történő 1 órás adszorpció után melegen

6

leszűrjük. A szűrletet 50 tf% szárazanyag-tartalomig bepároljuk és hűtőszekrényben egy éjszakán át kristályosodni hagyjuk. A kiszűrt és szárított béta ciklodextrin kristályok súlya 26,4 g, tisztaságuk HPLC módszerrel 99,9%. Eljárásunk keményítőre vonatkoztatott kitermelése 52,4%.

6. példa Gamma-CD nagyhozamú, gazdaságos előállítása

Az 1. példa szerinti hidrolizátum 150 ml-ét 1200 Kitahata egység CGT-enzimmel 45°C-on egy óráig reagáltatjuk, majd 7 ml MEK-ben oldott 7 g 1-naftol lecsapószerkeletet adunk hozzá. A konverziót 40°C-on 70 óráig folytatjuk és a konverzióelegyet ezután pH-4 értékre állítjuk be sósav segítségével. Az így nyert anyag CD-tartalma HPLC metodikával mérve: alfa-CD 0,05%; béta-CD 17,06%; gamma-CD 6,89%. A gamma-CD kinyerése céljából a konverzióelegyet leszűrjük, a nyert csapadékot megszáritjuk. A 48,3 g nyers ciklodextrint Soxhlet extraktorban 200 ml metanollal szűrőn mossuk. A szűredéket a Soxhlet készülékbe visszahelyezve 200 ml metanol és 100 ml víz elegyével újabb két óráig extraháljuk. Az extraktléhez 2 g aktív szenet adva 15 perces 40°C-on végzett adszorpció után leszűrjük. A javarészt béta ciklodextrint tartalmazó szilárd fázis összetétele: 89 t% béta-CD, 1,65 t% gamma-CD, tömeg: 21,2 g.

A derített extraktlevet 5 ml H⁺ ciklusú erős kationcserélőt és 5 ml OH⁻ ciklusban lévő erős anioncserélőt (Varion KS és AD típusú, Nitrokémia Ipartelepek, Fűzfő) tartalmazó sorbakötött ioncserélő kolonnán engedjük át és 50 ml desztillált vízzel utánamossuk.

A kapott ioncserélt effluenset bepároljuk 15 tf% szárazanyag-tartalomig, 5 tf% kloroformot adunk hozzá és Biomix homogenizátorban (Labor MIM gyártmány) 10 percig a CD-kloroformkomplexet kicsapjuk. A komplex kiszűrése után 100 ml desztillált víz hozzáadásával a gamma-CD oldatot 15 tf%-ig bepároljuk.

A kapott zömmel gamma-CD-t tartalmazó oldat béta-CD tartalmát 3 tf% ciklohexán hozzáadása és 5 perces Biomix homogenizálás után ciklohexán komplex formájában kiszűrjük, a szűrletet 50 tf%-ig bekoncentráljuk és a gamma-CD-t +4°C-on egy éjszakán át kikristályosítjuk. 7,55 g 99,8% tisztaságú gamma ciklodextrint kapunk 15 tf% keményítőre vonatkoztatott kitermeléssel.

7. példa Béta-CD előállítása gamma-CD extrakció melléktermékéből

A 6. példa szerint előállított szűrt extraktlé elválasztása utáni maradékot és az azt követő aktív szenes kezelés után nyert csapadékot egyesítjük. Az így kapott nedves béta-CD tömege 51,2 g. A nedves csapadékot 1% aktív szén jelenlétében 400 ml vízben 70°C-on 1 óra hosszáig extraháljuk, majd

Zeitz K 5 típusú szűrőlapon leszűrjük, a lepenyt 20 ml vízzel mossuk. A szűrletet 45—50 refrakció % töménységig bekonzentráljuk, majd egy éjszakán át szobahőmérsékleten kristályosítjuk és leszűrjük. Ily módon 21,4 g 99,6% tisztaságú béta-ciklodextrint kapunk, a kitermelés a kiindulási keményítőre számolva 43,4%.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1.) Eljárás alfa-, béta- és gamma-ciklodextrin nagyhozamú előállítására, alfa-amilázzal részlegesen hidrolizált, alacsony redukálóképességű — ahol a redukálóképesség 0,5 és 10 DE egység között van — keményítő szubsztrátból ciklodextrin-glükozil-transzferáz enzimmel, *azzal jellemezve*, hogy a hidrolizátumot a ciklodextrinnekkel terner komplexeket képező kombinált lecsapószerelégy jelenlétében konvertáljuk, ahol is kombinált lecsapószerelégyként R_1COR_2 általános képletű alifás keton — ahol R_1 és R_2 jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, 1—6 szénatomos alkilcsoport, CO jelentése karbonil-csoport-, és $R_3R_4Phe-OH$ általános képletű fenolszárma-zék — ahol R_3 és R_4 jelentése hidrogénatom, 1—4 szénatomos alkilcsoport, vagy R_3 és R_4 együttesen fenil-csoport, Phe jelentése fenil-csoport, OH jelentése hidroxil-csoport-, vagy R_5R_6Phe általános képletű benzol-származék — ahol R_5 és R_6 jelentése hidrogénatom, 1—4 szénatomos egyenes vagy elágazó szénláncú alkil-csoport, vagy R_5 és R_6 együttesen fenil-csoport-elegyét alkalmazzuk.

(Elsőbbség: 1983. december 22.)

2.) Eljárás alfa-, béta és gamma-ciklodextrin nagyhozamú előállítására, alfa-amilázzal részlegesen hidrolizált, alacsony redukálóképességű — ahol a redukáló képesség 0,5 és 10 DE egység között van — keményítő szubsztrátból ciklodextrin-glükozil-transzferáz enzimmel, *azzal jellemezve*, hogy a hidrolizátumot a ciklodextrinnekkel terner komplexeket képező kombinált lecsapószerelégy jelenlétében konvertáljuk, ahol is kombinált lecsapószerelégyként R_1COR_2 általános képletű alifás keton — ahol R_1 és R_2 jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, 1—6 szénatomos alkilcsoport, CO jelentése karbo-

nil-csoport-és R_7OSO_3X általános képletű alkáli-alkilszulfát — ahol R_7 jelentése 8—18 szénatomos alkilcsoport, X valamely alkáli fém — elegyét alkalmazzuk.

5 (Elsőbbség: 1987. február 12.)

3.) Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mint lecsapószeret alifás ketonként acetont, dietil-ketont, metil-etil-ketont, metil-propil-ketont, vagy metil-izobutil-ketont alkalmazunk.

10 (Elsőbbség: 1983. december 22.)

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mint lecsapószeret fenol-származékként 2,4-dimetil-fenolt, 2,6-dimetil-fenolt, 1-naftolt, vagy 2-naftolt alkalmazunk.

15 (Elsőbbség: 1983. december 22.)

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mint lecsapószeret benzol-származékként toluolt, xilolt, p-cimolt, vagy naftalint alkalmazunk.

20 (Elsőbbség: 1983. december 22.)

6. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mint lecsapószeret alifás ketonként acetont, dietil-ketont, metil-etil-ketont, metil-propil-ketont, vagy metil-izobutil-ketont alkalmazunk.

25 (Elsőbbség: 1987. február 12.)

7.) A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy alkáli-alkil-szulfátként nátrium-lauril-szulfátot alkalmazunk.

30 (Elsőbbség: 1987. február 12.)

8.) Az 1., 3—5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az alifás keton és fenolszármazék lecsapószereteket a ciklodextrinek terner komplexképzése céljából együttesen adjuk a reakcióelegyhez.

35 (Elsőbbség: 1983. december 22.)

9.) Az 1., 3—5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az alifás keton és a benzolszármazék lecsapószereteket a ciklodextrinek terner komplexképzése céljából együttesen adjuk a reakcióelegyhez.

40 (Elsőbbség: 1983. december 22.)

10.) A 2., 6., 7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az alifás keton és az alkáli-alkil-szulfát lecsapószereteket a ciklodextrinek terner komplexképzése céljából együttesen adjuk a reakcióelegyhez.

50 (Elsőbbség: 1987. február 12.)

Rajz nélkül

Kiadja: Országos Tájélmányi Hivatal, Budapest.
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető

№ 431. Nyomdaipari vállalat, Uzsgorod