

P - 36.457

Nº 75.626

U.S. Serial No. 588.755

Case D 1936

346308

4 ENE 1967

Memoria descriptiva



para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de CORN PRODUCTS COMPANY

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 717 Fifth Avenue, Nueva York, N.Y., Estados
Unidos de América

por: "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR CICLODEXTRINA"

(Clase Internacional C131)

27.10.67

- 1 -



La presente invención se refiere a un procedimiento para producir enzimáticamente ciclodextrina a partir de almidón.

Las ciclodextrinas, conocidas también como dextrinas de Schardinger, comprenden 6 o más restos de anhídrido-alfa-D-glucosa unidos entre sí por enlaces 1,4-, formando compuestos cíclicos, las ciclodextrinas pueden ser clasificadas más específicamente por el número de unidades de glucosa presentes. El anillo de 6 miembros se denomina alfa-ciclodextrina o ciclohexa-amilosa, el anillo de 7 miembros se denomina beta-ciclodextrina o ciclohepta-amilosa, etc.

Como resultado de su inigualada estructura cíclica, las ciclodextrinas tienen un potencial considerable como agentes formadores de complejos, debido a que forman compuestos de inclusión con moléculas que residen en la cavidad de la molécula cíclica. Son numerosas las aplicaciones potenciales en los campos de alimentación, tabaco y medicina, así como en otros muchos campos.

Las ciclodextrinas se producen a partir del almidón por acción de una enzima conocida corrientemente como transglicosilasa de ciclodextrina (*B. macerans* amylase). La fuente de la enzima es usualmente un cultivo de Bacillus macerans. La capacidad para producir la enzima que sintetiza a las ciclodextrinas es frecuentemente un criterio que sirve para distinguir a cepas de Bacillus macerans de otros microorganismos muy relacionados. Para producir la enzima sintetizadora de ciclodextrina se cultiva Bacillus macerans bajo condiciones adecuadas, en medios apropiados que contengan fuentes adecuadas de nitrógeno, carbono, fac



tores de crecimiento, y minerales. En la literatura se describen diversos medios apropiados para producir transglicosilasa de ciclodextrina (D. French, en "Methods in Enzymology", "Metodos de enzimología", S.P. Colowick y N.O. Kaplan, editores, Academic Press, New York, N.Y., vol. V, 1962, págs. 148-155).

La cantidad de actividad de transglicosilasa de ciclodextrina presente en preparaciones de Bacillus macerans se mide convenientemente por el método de Tilden-Hudson (E.B. Tilden y G.S. Hudson, J. Bacteriol., 43, 527-544 (1942)). Este método de determinación es aplicable a licores de cultivo crudos o a preparaciones de enzima que han sido purificadas o concentradas por evaporación, adsorción sobre adsorbentes adecuados y subsiguientes elu-
ción desde estos, precipitación con disolventes o sal, o fraccionamiento, u otros medios conocidos por los expertos en la técnica. Se halla generalmente que los licores de cultivo crudos contienen de 3 a 6 unidades Tilden-Hudson por mililitro.

Según los métodos usuales del pasado para producir ciclodextrina, se añade transglicosilasa de ciclodextrina a una solución diluida de un almidón gelatinizado apropiado, y se permite que transcurra la enzimolisis bajo condiciones que conduzcan a una acción continuada de las enzimas durante el tiempo suficiente para permitir la conversión del almidón a ciclodextrina.

Hasta ahora se ha venido prefiriendo el uso de almidón de patata, debido a su reducida tendencia a la retrogradación a las temperaturas de conversión empleadas. Además, no se ha considerado factible el uso de almidón



de patata a concentraciones mayores del 5% de sólidos, debido a la imposibilidad de manipular mayores concentraciones de almidón a causa de la gran viscosidad, así como a la retrogradación del almidón. Si el almidón se retrograda durante la enzimólisis, el resultado es la presencia de mucho almidón sin convertir en los licores de conversión, lo que aumenta la dificultad de recuperación de la ciclodextrina presente. Análogamente, los almidones modificados no han sido usados generalmente como substrato debido a que el rendimiento de ciclodextrina obtenido con ellos ha sido sustancialmente menor que el obtenido con almidón sin modificar. Para una descripción de los procedimientos de la técnica anterior, véase D. French y otros, Die Stärke, 15, 280-284 (1963).

A pesar de haber sido conocidas antes de ahora, no se ha podido disponer de estas dextrinas cíclicas en grandes cantidades. No han existido con anterioridad medios económicos para producirlas. Hay muchos factores que contribuyen al elevado coste de producción de ciclodextrina por los procedimientos de la técnica anterior.

Una desventaja principal de los procedimientos de la técnica anterior para producir ciclodextrina es el hecho de que la conversión solo es factible a baja concentración de sustancia seca. El coste de manipulación de grandes volúmenes de líquido, incluyendo el calentamiento hasta temperaturas muy altas y reducidas subsiguiente de la temperatura, así como la retención durante largos periodos de conversión, para producir ciclodextrina en cantidades sustanciales, hizo que los procedimientos de producción de la técnica anterior no fueran económicamente



atractivos.

La situación económica se agrava más por el hecho de que para recuperar la ciclodextrina de licores de conversión diluïdos se añade un precipitante adecuado, por ejemplo tricloroetileno, para hacer sustancialmente insoluble a la ciclodextrina. Las solubilidades de los complejos de ciclodextrina en estos licores diluïdos son tales que no se puede recuperar toda la ciclodextrina presente en los licores. Por ejemplo, por este procedimiento, la solubilidad de la ciclodextrina en presencia de tricloroetileno es tal que el 20% del total de ciclodextrina presente permanece en solución, lo que produce una pérdida sustancial debido a no poder recuperar toda la ciclodextrina presente.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para convertir almidón en ciclodextrina, donde el sustrato almidonoso está presente en solución de gran contenido de sólidos, y la ciclodextrina se produce en concentraciones mayores que las usadas hasta ahora.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir ciclodextrina a partir de almidón, donde la ciclodextrina o su complejos son fácilmente cristalizables, y pueden cristalizar durante la conversión.

Otro objeto de la presente invención es permitir el uso económico, para conversiones a ciclodextrina, de almidones que anteriormente no habrían sido adecuados, debido a sus inherentemente malas propiedades de pasta, o a sus tendencias a la retrogradación.

27.10.67

346308



Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento práctico para obtener grandes rendimientos de ciclodextrina a partir de almidón.

5 Otros objetos de la presente invención serán evidentes en lo que sigue, por la descripción siguiente y por lo expuesto en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar ciclodextrina a partir de un hidrolizado de almidón que tiene un ED (equivalente de dextrosa) no
10 mayor que aproximadamente 20, que comprende someter dicho hidrolizado de almidón a conversión con transglicosilasa de ciclodextrina, en medio acuoso, para obtener un producto de conversión que contiene ciclodextrina.

La presente invención proporciona también un procedimiento para preparar ciclodextrina a partir de almidón
15 que comprende hidrolizar parcialmente almidón hasta un ED no mayor de aproximadamente 20, y someter subsiguientemente el almidón parcialmente hidrolizado a conversión con transglicosilasa de ciclodextrina, en medio acuoso, para
20 obtener un producto de conversión que contiene ciclodextrina.

Se ha descubierto que cuando un hidrolizado de almidón que tiene un valor ED no mayor de aproximadamente 20 es sometido a la acción de transglicosilasa de ciclodex-
25 trina, se obtiene excelentes rendimientos de ciclodextrina, la conversión a ciclodextrina se puede efectuar fácilmente a grandes concentraciones de almidón, se evitan las dificultades de retrogradación del almidón y contaminación del producto con almidón, y se simplifican el aislamiento
30 y la purificación de la ciclodextrina. Para ilustrar las



deficiencias de la técnica anterior, los procedimientos antiguamente recomendados para preparar ciclodextrina a partir de una suspensión de almidón al 5%, requerían el tratamiento de 4900 litros de agua por 100 kg de ciclodextrina producida. En el método de la presente invención, en el que una solución de almidón parcialmente hidrolizado con 34% en peso de contenido de sólidos puede ser convertida con un rendimiento del 50% de ciclodextrina, solo se necesitan tratar 480 litros de agua por 100 kg de ciclodextrina producida. Aunque el presente procedimiento se puede usar con menor contenido de sólidos, una de las importantes ventajas prácticas del procedimiento es que se puede producir ciclodextrina en un medio que contenga una cantidad mínima de agua. El contenido de sólidos de la mezcla de reacción inicial será usualmente mayor del 10% en peso, y preferiblemente puede estar comprendido entre aproximadamente 20% y aproximadamente 50% en peso.

Las ciclodextrinas producidas según la invención son útiles para los mismos fines que las ciclodextrinas producidas por los procedimientos de la técnica anterior. Por ejemplo, los productos producidos según la invención son útiles como agentes de desprendimiento de aroma para el humo de tabaco, y se pueden disponer en una base filtrante de soporte, para la manufactura de filtros de tabaco. También son útiles, como es bien sabido, como agentes de inclusión, y por esta razón encuentran aplicación en cromatografía.

346308



Preparación de hidrolizado de almidón

Para producir un hidrolizado de almidón se puede usar cualquier tipo de almidón o fracción de almidón, incluyendo almidones de cereales y tubérculos, almidones
5 céreos o de gran contenido de amilosa y sus fracciones de amilosa o amilopectina. También se pueden usar fuentes de almidón crudas, tales como cereales molidos, tubércu-
los macerados, o sus almidones parcialmente purificados. Cuando se usan fuentes de almidón crudas, la ciclodextrina
10 na se puede recuperar por calentamiento del producto de conversión para solubilizar la ciclodextrina, filtración para eliminar los insolubles, y recuperación de la ciclo-
dextrina del filtrado, por cristalización o precipitación.

La hidrólisis parcial del almidón se puede efectuar por medios usuales. Entre los catalizadores adecuados para la hidrólisis parcial, se incluyen ácidos, sales de ácidos, resinas ácidas intercambiadores de iones,
15 y enzimas apropiadas. El hidrolizado de almidón se produce sometiendo almidón gelatinizado a tratamiento con ácido,
20 do, con enzima, o con ambos.

El término "hidrolizado de almidón" se define como el producto derivado de la hidrólisis enzimática o
25 ácida de almidón, efectuándose dicha hidrólisis sobre almidón gelatinizado.

Quando se emplea hidrólisis ácida, la acidez durante la acción hidrolítica puede disminuir a medida que
aumentan la temperatura y el tiempo de hidrólisis, hasta un punto en que se puede obtener suficiente acción hidro-
lítica en una solución neutra, cuando la temperatura es



tan alta como 205°C.

Un método particularmente adecuado para hidrolizar parcialmente el almidón consiste en usar alfa-amilasa bacteriana. La enzima se puede obtener en forma de alfa-amilasas resistentes al calor, disponibles comercialmente, producidas por ciertas cepas de Bacillus subtilus o Bacillus mesentericus.

Aunque las preparaciones de alfa-amilasa bacteriana estables al calor son particularmente adecuadas para producir el hidrolizado de almidón también se pueden usar otras preparaciones de alfa-amilasa. Por ejemplo, las derivadas de bacterias, hongos, cereales o animales. Cuando las preparaciones tienen gran contenido de actividad de enzima sacarógena, se deben usar bajo condiciones de pH, temperatura y tiempo de conversión tales que se refuerce la actividad licuadora de la enzima, y se minimize la cantidad de actividad sacarógena de la enzima.

Cuando se usa una enzima para efectuar la hidrólisis parcial, la temperatura durante la hidrólisis debe ser menor que la temperatura de desactivación de la enzima. El catalizador de hidrólisis se puede añadir al almidón antes, durante o después de la gelatinización del almidón. Se efectúa una hidrólisis parcial para reducir la viscosidad de la pasta de almidón en tal medida que el almidón pueda ser manipulado fácilmente a gran concentración de sólidos. También se solubiliza el almidón de tal manera que está fácilmente disponible para la enzimolisis causada por la enzima usada para producir ciclodextrina. Además, la hidrólisis parcial hace mínima la retrofracción del almidón, y permite que la enzimolisis se efectúe



eficazmente. Además, la ciclodextrina se recupera más fácilmente. Se prefiere efectuar la hidrólisis parcial hasta un ED comprendido entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 6. ED es la abreviatura de equivalente de dextrosa, que es la cantidad de azúcares reductores presentes, calculada como dextrosa y expresada como tanto por ciento tomando como base el producto seco.

Aunque el método preferido para la práctica de la presente invención es que el almidón se hidrolice hasta un ED de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 6, antes de la enzimólisis, para obtener la ciclodextrina, el almidón se puede hidrolizar hasta un grado mayor o menor. Si el hidrolizado de almidón tiene un ED sustancialmente menor de 0,5, los anteriores problemas inherentes al uso de almidones no hidrolizados aparecen gradualmente al disminuir los valores del ED. Entre estos problemas se incluye una viscosidad que impide la manipulación, y una retrogradación del almidón. Si la hidrólisis parcial se efectúa hasta sustancialmente más allá de ED igual a 6, se reduce el rendimiento de ciclodextrinas.

Operación de conversión.- Producción de ciclodextrina

Después de la hidrólisis parcial, el hidrolizado de almidón está dispuesto para ser convertido en ciclodextrina, por acción de transglicosilasa de ciclodextrina. Esta enzima tiene una actividad óptima a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 60°C, y a valores del pH comprendidos preferiblemente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,5. Para obtener



ner el máximo rendimiento de ciclodextrina, es deseable mantener al sustrato de almidón dentro de estos límites, aunque se pueden usar valores de pH y temperatura algo mayores o menores.

5 La cantidad de transglicosilasa de ciclodextrina empleada depende de la rapidez deseada para efectuar la enzimólisis, así como de las otras condiciones de conversión utilizadas. Por ejemplo, si se mantienen constantes la temperatura y las condiciones de pH, la cantidad de
10 enzima empleada es inversamente proporcional a la cantidad de tiempo requerido para obtener la cantidad deseada de ciclodextrina. El tiempo, temperatura, cantidad de enzima y pH se pueden ajustar para obtener las cantidades máximas de producto de conversión, en la cantidad mínima
15 de tiempo.

 En general, los rendimientos máximos de ciclodextrina se pueden obtener dentro de aproximadamente 2 a 7 días a 50°C, a un pH aproximadamente igual a 7, cuando la dosis de enzima está comprendida entre aproximadamente
20 100 y aproximadamente 1000 unidades Tilden-Hudson por 100 g de almidón.

Recuperación de ciclodextrina

 La ciclodextrina presente en el licor de conversión se puede recuperar y purificar fácilmente por las
25 técnicas de precipitación y cristalización de la técnica anterior.

 La inigualada capacidad de las ciclodextrinas para formar compuestos de inclusión con muchos compuestos



orgánicos puede ser utilizada para recuperar las ciclodextrinas presentes en el licor de conversión, después de la enzimolisis. Así, la adición de un precipitante adecuado tal como tricloroetileno, tetracloroetano, bromobenceno
5 y similares, causa la precipitación de la ciclodextrina, debido a la menor solubilidad del complejo de ciclodextrina. Aprovechando las diferentes solubilidades de las diferentes ciclodextrinas en presencia de los diversos precipitantes, se puede obtener una u otra de las ciclo-
10 dextrinas, tal como alfa- o beta-ciclodextrina, en forma purificada. También se puede controlar la acumulación de las respectivas ciclodextrinas durante la conversión, en alguna medida. Los complejos insolubles de ciclodextrina pueden ser purificados también por técnicas de recrista-
15 lización y similares, si se desea.

Como alternativa, se puede obtener fácilmente ciclodextrina sólida, por cristalización directa de los licores de conversión, por medios de cristalización conocidos. El licor de conversión, con la ciclodextrina formada
20 contenida en él, puede ser evaporado o secado, después de un refinado adecuado, produciendo un jarabe o un sólido que contiene ciclodextrina.

A continuación se describirá más en detalle la invención, mediante varios ejemplos ilustrativos de la
25 misma.

Ejemplo 1

A una suspensión al 30% en peso de almidón de patata, a pH igual a 7,2, se añadió una preparación de



alfa-amilasa bacteriana HF 1000 (marca registrada de una
preparación de alfa-amilasa bacteriana producida y vendi-
da por Miles Chemical Laboratories), a concentración igual
a 0,025% en peso basado en la preparación de enzima, to-
5 mando como base los sólidos de almidón. La suspensión fue
añadida gradualmente, durante un periodo de 30 min, a un
recipiente mantenido a una temperatura de 90 a 92°C. La
agitación fue continua, y la temperatura fue mantenida
durante 25 min adicionales, hasta que el almidón fue hi-
10 drolizado parcialmente hasta ED igual a 2,6. El almidón
hidrolizado fue ajustado inmediatamente a un PH igual a
5,8, calentado hasta 121°C, y mantenido durante 15 min,
para destruir la actividad residual de alfa-amilasa.

El hidrolizado de almidón así obtenido fue enfriado
20 do luego hasta 45°C, y el pH fue ajustado a 6,0. El hidro-
lizado fue convertido luego, en presencia de 5 ml de to-
lueno por cada 100 ml de licor de conversión, con una can-
tidad de transglicosilasa de ciclodextrina equivalente a
200 unidades Tilden-Hudson por cada 100 g de sólidos del
25 hidrolizado de almidón. Al cabo de 5 días de enzimolisis
a 45°C, el licor de conversión fue calentado a ebullición
durante 15 min, para desactivar la enzima y expulsar el
tolueno y solubilizar la ciclodextrina. Luego se filtró
el producto de conversión, mientras estaba caliente.

25 El licor de conversión filtrado fue dividido en
tres porciones, A, B y C, y tratado como sigue:

La porción A fue analizada por precipitación di-
recta con tricloroetileno, para determinar la cantidad de
ciclodextrinas presentes. Para cada análisis de ciclodex-
30 trina, en todos los ejemplos, se usó el siguiente método



analítico: el contenido de ciclodextrina fue determinado
añadiendo un exceso de tricloroetileno al licor de conver-
sión (25 ml por cada 100 ml de licor de conversión), agi-
tando la mezcla durante de 3 a 7 días, a de 25 a 30°C, fil-
5 trando bajo vacío a través de papel de filtro Whatman nú-
mero 1, lavando la torta de filtración con una cantidad
de agua a 5°C equivalente al 10% del volumen del licor de
conversión, recuperando cuantitativamente la torta de fil-
tración, y secándola a 30°C bajo un vacío de aproximada-
10 mente 715 mm Hg, durante aproximadamente 24 horas.

El rendimiento de ciclodextrinas crudas fue cal-
culado a partir del peso de la torta de filtración de ci-
clodextrina, mediante la siguiente fórmula:

% de rendimiento de ciclodextrina=

$$100 \times \frac{\text{peso en seco de la torta de filtración} \\ \text{por volumen de licor}}{\text{peso de los sólidos de almidón por} \\ \text{volumen de licor}}$$

15 La porción B fue mantenida a 80°C, a pH igual a
6, durante 24 horas, en presencia de 0,02% de una prepa-
ración de alfa-amilasa bacteriana (HT 1000), y luego fue
calentada a 121°C durante 15 min, para desactivar la enzi-
ma. La cantidad de ciclodextrina presente fue determinada
20 luego igual que antes.

La porción C fue tratada con alfa-amilasa bacte-
riana como se ha descrito antes, fue calentada hasta una
temperatura de 121°C, y luego enfriada hasta 75°C. Después,
la temperatura del licor fue reducida gradualmente hasta
25 aproximadamente 30°C durante las 151 horas siguientes,
mientras se agitaba el licor para promover la cristaliza-
ción de la ciclodextrina presente, Los cristales que se



acumularon fueron recogidos por filtración bajo vacío, lavados, secados y pesados. Estos cristales son designados como porción C-1. Las aguas madres y el agua de lavado combinados fueron refinadas por tratamiento con carbón orgánico activado, y filtradas para eliminar el carbono. Las aguas madres refinadas fueron evaporadas después, para producir una composición siruposa designada como porción C-2.

Tabla 1

<u>Porción</u>	<u>Descripción</u>	<u>ED</u>	<u>Sustancia se ca total (g/100 ml)</u>	<u>Rendimien- to de ciclo dextrina, %</u>
A	Licor de conversión original	4,3	41,1	39
B	Licor tratado con alfa-amilasa	13,1	39,2	37
C-1	Ciclodextrina cristalina			27
C-2	Aguas madres concen- tra das	16,8	58,0	10

Este ejemplo demuestra la producción de ciclodex- trina en rendimientos sustanciales, por el procedimiento de la presente invención. Dado que el rendimiento de ciclo- dextrina de las porciones A y B es esencialmente idéntico, los resultados muestran que el complejo de ciclodextrina y precipitante obtenido por este procedimiento está sus- tancialmente exento de almidón sin reaccionar. Además, se demuestra que las enzimas adecuadas, tal como alfa-amilasa



bacteriana, se pueden emplear para hidrolizar a los glucanos no cíclicos que quedan en el licor de conversión, sin hidrólisis simultánea apreciable de la ciclodextrina presente, y sin la correspondiente reducción del rendimiento.

5 Los resultados ilustran también la posibilidad de recuperar ciclodextrina en cantidades apreciables, por técnicas de decristalización directa, y pone en evidencia la preparación de un producto siruposo que contiene ciclodextrina.

Ejemplo 2

10 En este ejemplo se comparan el tratamiento de un hidrolizado de almidón con una enzima, para producir ciclodextrina, con el tratamiento de almidón sin hidrolizar para producir ciclodextrina.

Una suspensión al 30% en peso de almidón de patata fue tratada con alfa-amilasa bacteriana, como en el ejemplo 1, produciendo un hidrolizado de almidón que tenía un ED igual a 2,0, y que contenía 34 g de sólidos por cada 100 ml. Este hidrolizado de almidón fue diluido con agua, hasta los niveles de sustancia seca especificados más adelante en la tabla 2. Los hidrolizados fueron convertidos luego, a 50°C y pH igual a 7,2, en presencia de tolueno, con una dosis de transglicosilasa de ciclodextrina igual a 200 unidades Tilden-Hudson por cada 100 g de sustancia de almidón seco. Al cabo de 7 días de conversión, la enzima residual fue desactivada por calentamiento a 100°C durante 10 min, y la ciclodextrina presente fue determinada por el método de precipitación con tricloroetileno.



Las suspensiones de almidón sin hidrolizar fueron preparadas a diferentes niveles de sustancia seca, gelatinizadas de igual manera, y tratadas directamente con transglicosilasa de ciclodextrina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

346308

31.10.67

- 17 -



Tabla 2

Substrato	Concentración del sustrato g/100 ml	Ciclodextrina producida		Características del licor de conversión	
		g/100 ml	% en peso de almidón	Fluidez	Filtración
Almidón gelatinizado	3,2	0,4	13	Fluido	Mala
	5,4	1,5	28	Fluido	Mala
	8,1	2,5	31	Fluido	Mala
	10,8	4,3	40	Fluido	Mala
	16,1	-	-	No fluido	No filtrable
	21,5	-	-	No fluido	No filtrable
Almidón parcialmente hidrolizado (ED igual a 2,0)	3,4	0,9	26	Fluido	Buena
	5,7	2,1	37	Fluido	Buena
	8,5	3,4	40	Fluido	Buena
	11,3	4,7	42	Fluido	Buena
	17,0	7,9	46	Fluido	Buena
	22,7	11,0	48	Fluido	Buena
	28,3	13,2	47	Fluido	Buena
	34,0	17,6	52	Fluido	Buena

346308

346308

Tabla 2

Substrato	Concentración del substrato g/100 ml	Ciclodextrina producida		Caracterís Fluidez
		g/100 ml	% en peso de almidón	
Almidón gelatinizado	3,2	0,4	13	Fluido
	5,4	1,5	28	Fluido
	8,1	2,5	31	Fluido
	10,8	4,3	40	Fluido
	16,1	-	-	No fluido
	21,5	-	-	No fluido
Almidón parcialmente hidrolizado (ED igual a 2,0)	3,4	0,9	26	Fluido
	5,7	2,1	37	Fluido
	8,5	3,4	40	Fluido
	11,3	4,7	42	Fluido
	17,0	7,9	46	Fluido
	22,7	11,0	48	Fluido
	28,3	13,2	47	Fluido
	34,0	17,6	52	Fluido

18

346308



EA EN

la Características del licor de conversión

<u>Fluidez</u>	<u>Filtración</u>
Fluido	Mala
Fluido	Mala
Fluido	Mala
Fluido	Mala
No fluido	No filtrable
No fluido	No filtrable
Fluido	Buena
Fluido	Buena
Fluido	Buena
Fluido	Buena
Fluido	Buena
Fluido	Buena
Fluido	Buena
Fluido	Buena

346308



Este Ejemplo demuestra la capacidad del presente procedimiento para producir ciclodextrina con grandes rendimientos, a altos niveles de sustancia seca. Los procedimientos de la técnica anterior carecen de esta capacidad.

Los resultados demuestran, además, que aún es válido lo que se creía antes, es decir, que las conversiones con gran contenido de sólidos no son prácticas cuando el sustrato consiste en almidón gelatinizado sin hidrolizar.

Ejemplo 3

El efecto que ejerce la magnitud de la hidrólisis sobre el rendimiento de ciclodextrina que se puede obtener a partir de hidrolizados de almidón, se pone en absoluta evidencia usando dispersiones al 30% en peso de almidón de milo (especie de sorgo) céreo diluido con enzima.

El procedimiento de dilución de este Ejemplo fué similar al descrito en el Ejemplo 1, salvo en que se usó una cantidad apropiada de alfa-amilasa bacteriana, de manera que se podían obtener valores ED variables. Las dispersiones al 30% en peso de almidón de milo céreo fueron hidrolizadas a una temperatura de 90 a 92°C durante el período de tiempo que fué requerido para obtener los diferentes valores ED.

Unas muestras independientes del almidón parcialmente hidrolizado, con 34 g de sustancia seca por 100 ml, fueron calentadas a 121°C para destruir la actividad residual de la alfa-amilasa. Las muestras fueron convertidas luego a 50°C y pH igual a 7,2, en presencia de tolueno,



con una dosis de transglicosilasa de ciclodextrina igual a 400 unidades Tilden-Hudson por cada 100 g de sólidos de almidón. La ciclodextrina presente fué determinada al cabo de 7 y cuatro días desde la conversión, por el método de precipitación con cloroetileno antes descrito. La siguiente Tabla 3, muestra que se obtienen rendimientos mayores de 40% de ciclodextrina, cuando el almidón es hidrolizado antes de la conversión, hasta un ED comprendido entre 0,4 y 6, y que se obtienen rendimientos de ciclodextrina mayores que 3 g por 100 ml a un ED tan alto como 20.

346308



Tabla 3

ED del hidróli- zado parcial	Rendimiento de ciclodex- trina, g/100 ml		Rendimiento de ciclodex- trina, %	
	4 días	7 días	4 días	7 días
0,4	16,5	18,4	49	54
1,0	15,3	17,4	45	51
1,9	14,3	18,0	42	53
3,5	12,2	15,3	36	45
6,0	10,5	14,0	31	41
8,8	8,2	10,9	24	32
12,0	5,8	7,5	17	22
15,5	4,4	6,1	13	18
17,1	3,1	5,1	9	15
19,6	2,7	3,7	8	11
22,9	1,7	2,4	5	7
25,5	0,7	0,7	2	2

21

346308

346308

Tabla 3

ED del hidrolizado parcial	Rendimiento de ciclodextrina, g/100 ml		Rendimiento de ciclodextrina %	
	<u>4 días</u>	<u>7 días</u>	<u>4 días</u>	<u>7 días</u>
0,4	16,5	18,4	49	54
1,0	15,3	17,4	45	51
1,9	14,3	18,0	42	53
3,5	12,2	15,3	36	45
6,0	10,5	14,0	31	41
8,8	8,2	10,9	24	32
12,0	5,8	7,5	17	22
15,5	4,4	6,1	13	18
17,1	3,1	5,1	9	15
19,6	2,7	3,7	8	11
22,9	1,7	2,4	5	7
25,5	0,7	0,7	2	2

21

346308



α ciclodextrina

7 dias

- 54
- 51
- 53
- 45
- 41
- 32
- 22
- 18
- 15
- 11
- 7
- 2

346308



Ejemplo 4

Este Ejemplo ilustra que, para obtener la máxima eficacia, es deseable efectuar las conversiones de ciclodextrina en presencia de una cantidad adecuada de un precipitante apropiado. Se supone que la misión del precipitante es formar complejos insolubles con las ciclodextrinas, a medida que se producen, lo que tiene como efecto eliminar las ciclodextrinas de la mezcla de reacción, desplazando así el equilibrio de la reacción a favor de una producción más extensa de ciclodextrina. En la siguiente Tabla 4 se muestran Ejemplos de precipitaciones adecuados.

En este Ejemplo, una suspensión al 30% en peso de almidón de patata fué diluido hasta ED igual a 1,9 y calentada siguiendo el método descrito en el Ejemplo 1. El almidón diluido fué dividido en varias porciones y convertido a 50°C, a pH igual a 7,0 y con una dosis de transglucosilasa de ciclodextrina igual a 499 unidades Tilden-Hudson por 100 g de sustrato, basado en la substancia seca. Cinco horas después de la iniciación de la conversión el agente de precipitación de la ciclodextrina fué dispersado en el licor de conversión, en cantidad equivalente a aproximadamente 20 g por 100 g de sólidos del sustrato.

Al cabo de 3 días, la conversión para un conjunto de porciones, y al cabo de 4 días de conversión para un segundo grupo de porciones, la enzima fué desactivada por ebullición. Para evitar la posibilidad de que el almidón sin reaccionar interfiriese con la determinación de la ciclodextrina, se hizo reaccionar luego cada licor con 0,01% de alfa-amilasa bacteriana (HT 1000) durante 24 horas,

346308



a 60°C y a pH igual a 7,0. Después de haberse desactivado la alfa-amilasa bacteriana por ebullición, la cantidad de ciclodextrina formada fué determinada por precipitación con tricloroetileno. El refuerzo del rendimiento efectuado por los precipitantes se muestra también en la Tabla 4.

346308



Tabla 4

Precipitante	Concentración de almídon g/100 ml		Ciclodextrina producida g/100 ml		Rendimiento de ciclodextrina, %	
	3 días	4 días	3 días	4 días	3 días	4 días
p-cimeno	33,3		14,8	16,8	44	50
Tetracloroetano	33,3		14,9	15,7	45	47
Benceno	33,3		13,2	15,7	40	47
Disulfuro de carbono	33,3		13,1	15,4	39	46
Tolueno	33,3		13,0	15,5	39	45
Naftaleno (en éter)	33,9		13,3	15,3	39	45
Tricloroetileno	33,3		12,6	14,4	38	43
Ciclohexano	33,3		15,5	13,8	47	41
Hexano	33,3		10,2	11,7	31	35
Cloroformo	33,5		10,4	11,6	31	35
Bromobenceno	33,5		9,3	11,5	28	34
Tetracloruro de carbono	33,5		10,4	10,8	31	32
Antraceno (en éter)	33,9		10,9	10,3	32	30
Timol	33,3		6,3	7,6	19	23
Ninguno (control)	33,3		3,7	3,2	11	10

24

346308

346308

Tabla 4

Precipitante	Concentración de almidón g/100 ml	Ciclodextrina producida		Rendimiento c
		g/100 ml	3 días	4 días
p-cimeno	33,3	14,8	16,8	44
Tetracloroetano	33,3	14,9	15,7	45
Benceno	33,3	13,2	15,7	40
Disulfuro de carbono	33,3	13,1	15,4	39
Tolueno	33,3	13,0	15,5	39
Naftaleno (en éter)	33,9	13,3	15,3	39
Tricloroetileno	33,3	12,6	14,4	38
Ciclohexano	33,3	15,5	13,8	47
Hexano	33,3	10,2	11,7	31
Cloroformo	33,5	10,4	11,6	31
Bromobenceno	33,5	9,3	11,5	28
Tetracloruro de carbono	33,5	10,4	10,8	31
Antraceno (en éter)	33,9	10,9	10,3	32
Timol	33,3	6,3	7,6	19
Ninguno (control)	33,3	3,7	3,2	11

24

346308



Limimento de ciclodextrina,

<u>3 días</u>	<u>4 días</u>
44	50
45	47
40	47
39	46
39	45
39	45
38	43
47	41
31	35
31	35
28	34
31	32
32	30
19	23
11	10

3463

Ejemplo 5



En este Ejemplo se ilustra la producción de ciclodextrina con rendimientos sustanciales, a partir de grandes concentraciones de sustancia seca de almidón de 5 maiz, por el procedimiento de la presente invención.

El almidón de maiz es representativo de los almidones que, por gelatinización, poseen grandes viscosidades en pasta, y presentan una pronunciada tendencia a la retrogradación. Estas propiedades de pasta han impedi-
10 do el uso de los almidones de maiz y similares, en la producción eficaz de ciclodextrina por los procedimientos antiguos.

Una suspensión al 30% en peso de almidón de maiz fué parcilamente hidrolizada hasta ED igual a 2,2 y calen-
15 tada siguiendo en esta ocasión el método descrito en el Ejemplo 1. Este hidrolizado de almidón fué dividido en varias porciones que fueron convertidas luego a pH igual a 7,2 y 50°C, en presencia de toluano, con transglicosilasa de ciclodextrina, durante las veces y bajo las con-
20 diciones indicadas en la Tabla 5. La actividad de la transglicosilasa de ciclodextrina fué destruida después de la conversión, por calentamiento a 100°C durante 10 minutos. Para evitar la posibilidad de que un almidón sin reaccionar interfiriese con la determinación de ciclodextrina,
25 los licores de conversión fueron expuestos a la acción de la alfa-amilasa bacteriana, como se ha descrito antes. Después de hervir para desactivar la alfa-amilasa bacteriana, la ciclodextrina presente fué determinada por precipitación con tricloroetileno. Los resultados obtenidos se
30 muestran en la Tabla 5.



Tabla V

Temperatura de conversión, °C	Dosis de enzima (unidades/100 g de sustancia seca)	Sustancia seca total (g/100 ml)	Ciclodextrina, g/100 ml		Rendimiento de ciclo-dextrina, %	
			4 días	7 días	4 días	7 días
55	200	38,1	15,3	20,3	40	53
	400	38,1	20,8	22,0	55	58
60	200	38,1	15,8	17,7	42	47
	400	38,1	18,9	21,3	50	56

26

346308

346308

Tabla V

Temperatura de conversión, °C	Dosis de enzima (unidades/100 g de sustancia seca)	Sustancia seca total (g/100 ml)	Ciclodextrina, g/100 ml	
			4 días	7 días
55	200	38,1	15,3	20,3
	400	38,1	20,8	22,0
60	200	38,1	15,8	17,7
	400	38,1	18,9	21,3

26

346308



iclodextrina, g/100 ml		Rendimiento de ciclo- dextrina, %	
<u>días</u>	<u>7 días</u>	<u>4 días</u>	<u>7 días</u>
15,3	20,3	40	53
20,8	22,0	55	58
15,8	17,7	42	47
18,9	21,3	50	56

346308



Ejemplo 6

En este Ejemplo se ilustra la producción eficaz de ciclodextrina con grandes concentraciones de sólidos, a partir de almidón que ha sido parcialmente hidrolizado por hidrólisis ácida usual.

Se añadió ácido clorhídrico a una suspensión al 18% en peso de almidón de milo céreo, para obtener una normalidad igual a 0,032. La temperatura de esta mezcla fué aumentada hasta de 97 a 99°C, para efectuar la gelatinización e hidrólisis parcial. Después de haber hidrolizado el almidón hasta un ED igual a 3,4, se añadió hidróxido sódico para alcanzar un pH igual a 5,6, terminando así la hidrólisis ácida. El hidrolizado de almidón resultante fué filtrado subsiguientemente, concentrado por evaporación hasta 30% de sustancia seca, y convertido con transglicosilasa seca de ciclodextrina, a 55°C y pH igual a 7,0, en presencia de tolueno.

Después de 5 y 7 días de conversión de porciones separadas del hidrolizado, la ciclodextrina formada fué determinada por precipitación con tricloroetano. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 6. En la Tabla 6 se incluyen también dos ensayos en los que el almidón fué hidrolizado por hidrólisis ácida hasta un ED igual a 8,1, antes de ser usado como substrato para conversiones a ciclodextrina. También se indican estas conversiones.

346308



Tabla 6

ED del hidrolizado parcial	Concentración de sustancia seca (g/100 ml)	Dosis de enzima	Rendimiento de ciclodextrina, %	
			4 días	7 días
3,4	18,5	200	29	38
3,4	18,5	400	39	48
3,4	32,5	200	28	35
3,4	32,5	400	37	47
8,1 34,5	34,5	200	15	19
8,1	34,5	400	19	23

Son muchas las ventajas de la presente invención. Una importante ventaja es que el procedimiento permite que la conversión a ciclodextrina se efectúe eficazmente con gran concentración de sólidos. Otra ventaja es que se pueden efectuar conversiones a ciclodextrina con una selección más amplia de almidones substrato, tal como almidón de maiz que antes de ahora era esencialmente inadecuado. Otra característica importante de la invención es que conduce a una economía de procedimiento perfeccionada, particularmente debido a que se requieren menores inversiones para producir una cantidad dada de ciclodextrina, debido a que la invención conduce a una recuperación perfeccionada del producto, y debido a que se pueden usar niveles de substrato mayores que de 3 a 5% de concentración de sólidos. Como resultado de la invención, no sólo es posible efectuar las conversiones a niveles de substrato de 20 a 30%, sino que es deseable hacerlo, debido a que se consiguen las ventajas antes relacionadas, esencialmente sin disminución de la eficacia de la conversión.

346308



Esta solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América el 24 de Octubre de 1966, con el número 588.755, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

10 1.- Procedimiento para preparar ciclodextrina
caracterizado por someter un hidrolizado de almidón que
tiene un ED no mayor de aproximadamente 20, a conversión
con transglicosilasa de ciclodextrina, en un medio acuoso,
para obtener un producto de conversión que contiene ciclo-
15 dextrina.

 2.- Procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado por hidrolizar parcialmente almidón hasta
un ED no mayor de aproximadamente 20 y someter subsiguien-
temente el almidón parcialmente hidrolizado a la conver-
20 sión con transglicosilasa de ciclodextrina.

 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 o 2,
caracterizado porque el hidrolizado de almidón es produci-
do tratando almidón gelatinizado con un ácido, una enzima
o una combinación de ellos.

346308

31.10.67

- 29 -



4.- Procedimiento según la reivindicación 1, 2 o 3, caracterizado porque la conversión se efectúa en presencia de un agente formador de complejos con ciclodextrina.

5 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el hidrolizado de almidón es un hidrolizado ácido.

6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el hidrolizado de
10 almidón es un hidrolizado de enzima.

7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el hidrolizado de almidón tiene un ED no mayor de aproximadamente 6.

8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el hidrolizado
15 de almidón tiene un contenido de sólidos al menos igual a aproximadamente 10% en peso.

9.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el hidrolizado de
20 almidón tiene un contenido de sólidos de aproximadamente 10% a aproximadamente 40% en peso.

10.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la temperatura de conversión es aproximadamente 40°C a aproximadamente
25 60°C.

11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque la temperatura de conversión es de aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C.

12.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el pH de con-
30



versión es de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5.

13.- Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque el pH de conversión es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5.

5 14.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque el período de conversión es de aproximadamente 2 días a aproximadamente 7 días.

10 15.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque se obtiene un producto de conversión acuoso que contiene al menos aproximadamente 3 g de ciclodextrina por 100 ml de producto de conversión.

15 16.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque el producto de conversión que contiene ciclodextrina obtenido es concentrado, para producir un jarabe que tiene un contenido de sólidos mayor del 50%.

20 17.- Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque el producto de conversión que contiene ciclodextrina obtenido es concentrado lo suficiente para proporcionar un producto que contiene ciclodextrina sustancialmente sólido.

25 18.- Procedimiento para preparar ciclodextrina. Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

346308



Esta Memoria consta de treinta y dos hojas escri_{ti}
tas a máquina por una sola cara.

Madrid, 14 ENE. 1968

P.A.

Alberto de Emburgo
for Polan

346308