

## A ciklodextrin-kutatás Magyarországon

A ciklodextrinek története hosszú: már 1891-ben leírta *de Villiers*, hogy a burgonya rothadásánál egy kristályos anyag keletkezik. Évszázadunk első-második évtizedében ezt a jelenséget részletesen egy osztrák mikrobiológus, *Franz Scharldinger* tanulmányozta. Az izolált kristályos anyag szerkezetét csak a 30-as években derítették fel *Freudenberg* és munkatársai. Az 50-es években két helyen folyt intenzív kutatás: az USA-ban *French* és az NSzK-ban *Cramer* laboratóriumában. Fény derült arra, hogy a ciklodextrinek olyan különleges sajátságokkal rendelkeznek, amelyek beláthatatlanul széles körű felhasználási lehetőségeket nyitnak utat. *French* 1957-ben publikálta az első ciklodextrin monográfiát [1]. A 133 oldalas egyébként kitűnő összeállításban mindössze 8 sort szentelt a toxikológia kérdésének — mindenféle hivatkozás, részletek nélkül — azt közölve, hogy béta ciklodextrinnel etetett patkányok elpusztultak, tehát a ciklodextrin toxikus. Ezzel a ciklodextrin iránti érdeklődés 20 évre álomba merült.

A 70-es évek elején a ciklodextrin-irodalom tanulmányozásából azt lehetett következtetni, hogy a ciklodextrinek

- rendkívül érdekes, sokatígérő vegyületcsaládot képeznek,
- előállításuk bonyolult, drága,
- toxicitásuk miatt alkalmazásuk reménytelen.

Két országban: Japánban és Magyarországon a keményítő kémiai foglalkozó kutatók a két utóbbi állítást nem tudták elhinni. Így Japánban és teljesen függetlenül Magyarországon, a Chinoiban intenzív kutatás indult a ciklodextrinek előállítására, biológiai és kémiai sajátságaiknak a felderítésére és főképpen ipari alkalmazási lehetőségeiknek a feltárására.

A Chinoi ciklodextrin-team mindhárom ciklodextrinre kidolgozott gazdaságos ipari technológiát. A ciklodextrin ára az 1978. évi 2000 USD/kg-ról napjainkra már 10 USD/kg alá csökkent és lesz még olcsóbb is. Az állítólagos toxicitás kísérleti hiba volt: a béta ciklodextrinnel végzett krónikus toxicitási vizsgálatok szerint — az anyag, amit ma gyártunk — egyáltalán nem toxikus. Radioaktív ciklodextrin vizsgálatokkal felderítettük az orálisan beadott béta-ciklodextrin sorsát a szervezetben. Dokumentációnk alapján már több országban (Franciaország, Spanyolország, Hollandia, Belgium, Olaszország, NSzK stb.) a ciklodextrinek valamelyike valamilyen termékben, vagy termékcsoportban emberi fogyasztásra engedélyezve van és számos más országban folyamatban van az engedélyezés. Csúpan idő kérdése az FDA engedély kiadása

\* CYCLOLAB, Cyclodextrin Kutató-Fejlesztő Leányvállalat, Budapest

az első ciklodextrin humán fogyasztásra, illetve alkalmazásra, ami után csupán az USA-ban 32 000 tonnára becsülik a ciklodextrinek piacát. Ez sok új termék, de még több ismert, régi termék új, kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező, versenyképesebb formáinak a gyártását fogja lehetővé tenni.

A Chinoi Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyárának Biokémiai Kutató Laboratóriuma 1975-től kezdve csak a ciklodextrin kutatással foglalkozott és foglalkozik ma is, bár neve először Ciklodextrin Kutató Laboratóriumra változott, majd 1989. január 1-től a jelenleg 24 fővel dolgozó laboratórium CYCLOLAB, Cyclodextrin Kutató-Fejlesztő Leányvállalat néven önállóan gazdálkodik és teljes egészében a ciklodextrin kutatásból él. Bevételeinek kb. 90%-a külföldi gyógyszer- és élelmiszeripari vállalatoktól származik, amelyek számára ciklodextrin alkalmazásával kapcsolatos know-how-kat, licenceket, kutatási jelentéseket szállít. A CYCLOLAB-nak a ciklodextrin „monokultúrán” kívül még egy egyedi vonása van: azon kevés magyar vállalatok közé tartozik, amelyek bevételei kizárólagosan tudományos célkutatási eredmények értékesítéséből (exportjából) származnak. Ahhoz azonban, hogy odáig el lehessen jutni, hogy ha pl. egy külföldi gyógyszergyár a szakirodalom alapján arra a következtetésre jut, hogy valamilyen termékében vagy technológiájában a ciklodextrinek alkalmazását érdemes lenne kipróbálni, akkor a CYCLOLAB-hoz érdemes fordulnia, előbb egy évtizedig pénzt nem hozó alapkutatást kellett végezni, publikációk, szabadalmak, előadások tucatjait kellett produkálni. Túlzás lenne azt állítani, hogy a Chinoi vezetésében mindig, mindenki támogatta ezt a tényleg sok pénzbe kerülő témát, de a végső döntés végül is mindig pozitív volt. A legkeményebb értetlenségbe a tudományos eredmények publikálására irányuló törekvések ütköztek. Ha ezt nem tettük volna meg, nem lenne ismert Laboratóriumunk, nem lenne munkánk.

1974–1988 között ez a laboratórium 4 könyvet, több mint 140 tudományos közleményt publikált a ciklodextrin kémia minden területéről. Több mint 70 találmányi bejelentést és 12 doktori értekezést dolgoztak itt ki. Magyarországon kb. egy tucat kutatóhely dolgozik vagy dolgozott a ciklodextrin-kutatás valamelyik részterületén. 1975-től kezdve évente szerveztek egy ciklodextrin munkaértekezletet ezen csoportok résztvevőinek és 1981-ben ez lett az első Nemzetközi Ciklodextrin Szimpózium, melyet Budapesten tartottak több mint 200 résztvevővel, 18 országból. Ezt követte a II. Nemzetközi Szimpózium Tokióban 1984-ben, a III. Lancasterben 1986-ban, a IV. Münchenben, az V. szimpóziumot 1990-ben Párizsban fogják tartani, de már az 1992. évi VI. szimpózium helyszíne is megvan: Miami.



Időközben a ciklodextrin-irodalom robbanásszerű növekedést mutatott. 1988-ban kb. 600 (!) új publikáció, szabadalom, konferencia kivonat került közlésre. 1986 óta megjelenik egy havi folyóirat, a Cyclodextrin News, amely havonta átlagosan 50 kivonatot közöl, valamint a vonatkozó információkat a ciklodextrinekről, szimpóziumokról, könyvekről, termelésről, marketingről, licencekről. Manapság nem létezik gyógyszerészeti, aroma, szénhidrát, zárvány, kromatográfia stb. témájú szimpózium anélkül, hogy azon ne tartanának ciklodextrinekkal kapcsolatos előadásokat. A ciklodextrineket és kémiai vagy enzimesen módosított származékaikat lehet használni az:

|   |   |
|---|---|
| élelmiszer-<br>gyógyszer-<br>növényvédőszer-<br>kozmetikai- | stabilizálására<br>szagtalanításra<br>oldékonyság növelésre<br>biológiai hasznosít-<br>hatóság<br>növelésre |
| iparokban   | formulázásra<br>kellemetlen ízek csök-<br>kentésére   |
| robbanóanyag-<br>diagnosztikum-                             | irritáló hatások csök-<br>kentésére stb.  |
| műanyag- stb.   |   |

Ennek a felsorolásnak nyilván van határa, de azt még nem ismerjük.

A rendkívül szerteágazó lehetőségeket a továbbiakban csak illusztrálni lehetséges néhány területen mint pl.

- biotechnológia,
- vegyipar,
- élelmiszeripar,

de a terjedelem szabta korlátok miatt itt nem kerülhet áttekintésre pl. a ciklodextrinek növényvédőszeripari, analitikai kémiai (főleg kromatográfiai) stb. lehetőségekkel foglalkozó irodalma.

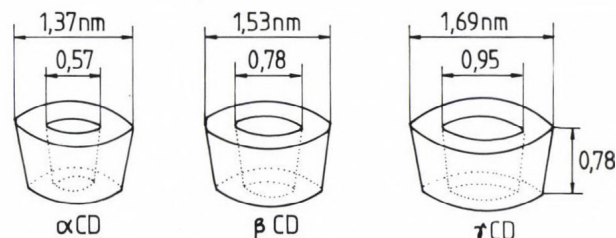
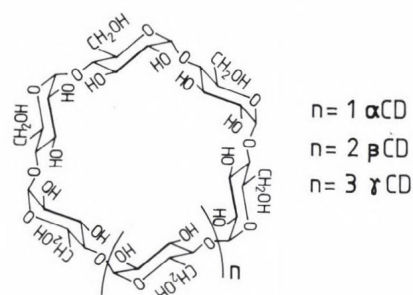
## A ciklodextrinek és zárványkomplexeik

### A ciklodextrinek kémiaja

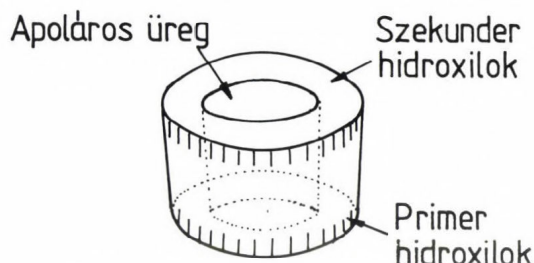
A ciklodextrinek a keményítő enzimes átalakításának a termékei. A részlegesen előhidrolizált keményítőt (=aciklikus dextrinek keveréke) a ciklodextrin-glikozil transzferáz enzim alakítja át ciklikus dextrinekké. Ezt az enzimet különböző mikroorganizmusok, pl. a *Bacillus macerans* tudja termelni. Az olyan keverék előállítására, amely a ciklikus és az aciklikus dextrinek keverékéből áll könnyű, izolálni azonban a ciklodextrineket jó kitermeléssel már nem olyan egyszerű [2,3].

A ciklodextrinek ciklikus, nem redukáló oligosaccharidok. Három különböző ciklodextrin ismeretes: alfa-, béta- és gamma-ciklodextrin. Ezek mindegyikét, mint homogén kristályos anyagot (tisztaság több mint 99,5%) lehet előállítani. A ciklodextrineket nevezik Schardinger dextrineknek, cikloamilózoknak, cikloglükánoknak vagy ciklomaltoligózoknak is.

A béta-ciklodextrin szerkezetét és mindhárom ciklodextrin molekuláris dimenzióit az 1. ábra szemlélteti. Az alfa-ciklodextrin 6, a béta-ciklodextrin 7, és



1. ábra. Alfa-, béta- és gamma-ciklodextrin szerkezete és molekuláris méreteik



2. ábra. A ciklodextrin funkcionális szerkezeti sémája

a gamma-ciklodextrin 8 glükopiranoz egységből áll. Mivel valamennyi glükopiranoz egység C-1 konformációt vesz fel, valamennyi szekunder hidroxil csoport a koszorúszerű ciklodextrin molekula egyik oldalán helyezkedik el és valamennyi primer hidroxil csoport a másik oldalon. A belső üregnek a „bélése” hidrogénatomokból és glikozidos oxigén híd atomokból áll, ezért ez a felület gyengén apoláros (2. ábra). A ciklodextrinek fizikai és szerkezeti sajátosságait az 1. táblázatban láthatjuk.

Ez az egyedülálló szerkezet és a fizikai-kémiai sajátosságok lehetővé teszik azt, hogy ezek a molekulák más anyagok molekuláit magukba zárják, ez a lényege az ún. molekuláris kapszulázásnak. Míg a legtöbb időig a ciklodextrineket csaknem kizárólagosan „üres” molekuláris méretű kapszuláknak tekintették, az újabb vizsgálatok felfedték alkalmazásuknak a széles körű lehetőségeit, ezért a ciklodextrineket mint egy új ipari nyersanyag csoportot lehet tekinteni.

### Molekuláris kapszulázás ciklodextrinekkal

A ciklodextrin molekulát molekuláris méretű üres kapszulának lehet tekinteni (2. ábra). Ha ez egy más



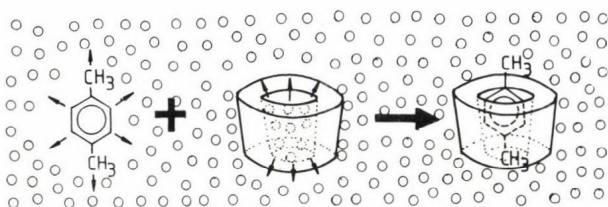
## Az alfa-, béta- és a gamma-ciklodextrinek jellemzői

| Megnevezés                                      | alfa      | béta      | gamma     |
|---|-----------|-----------|-----------|
| Glükopiranoz egységek száma                     | 6         | 7         | 8         |
| Molekulatömeg                                   | 972       | 1135      | 1297      |
| Oldékonyság g 100 ml vízben szobahőmérsékleten, | 14,5      | 1,85      | 23,2      |
| $[\alpha]_D^{25}$                               | 150±0,5   | 162,5±0,5 | 177,4±0,5 |
| Üregátmérő, nm                                  | 0,47–0,53 | 0,6–0,65  | 0,75–0,83 |
| Henger magassága, nm                            | 0,79±0,1  | 0,79±0,1  | 0,79±0,1  |
| Molekula külső átmérője                         | 1,46±0,04 | 1,54±0,04 | 1,75±0,04 |
| Közelítő térfogat, nm <sup>3</sup>              | 0,174     | 0,262     | 0,427     |
| Közelítő térfogat, l mol ciklodextrinben, ml    | 104       | 151       | 256       |
| 1 g ciklodextrinben, ml                         | 0,10      | 0,14      | 0,20      |

anyag molekulájával van kitöltve, akkor nevezzük „zárványkomplex”-nek.

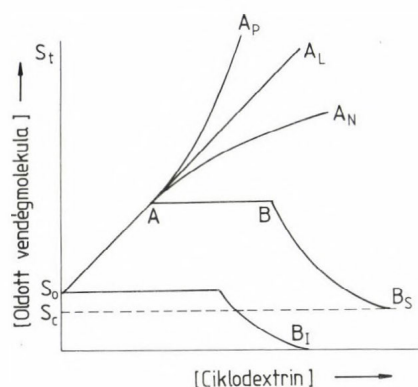
A zárványkomplexek olyan egységek, amelyek két vagy több molekulából állnak, amelyekben egy molekula „gazda” magába zárja teljes egészében vagy részben, fizikai erővel, azaz kovalens kötés nélkül a „vendég” molekulát. A ciklodextrinek tipikus „gazda” molekulák és a legkülönbözőbb molekulákat képesek magukba zárni, olyanokat, amelyeknek a mérete egy vagy két benzolgyűrű nagyságú, vagy nagyobbakat is, amennyiben van olyan oldalláncuk vagy csoportjuk, amely hasonló méretű, mint a ciklodextrin üreg és így képeznek kristályos zárványkomplexet.

Vizes oldatban a gyengén apoláros ciklodextrin-üreget vízmolekulák foglalják el, amelyek energetikailag kedvezőtlen (poláros, apoláros kölcsönhatású) helyzetben vannak és ezért könnyen kicserélhetők alkalmas „vendég” molekulákkal, olyanokkal, amelyek kevésbé polárosak, mint a vízmolekulák. A ciklodextrin a „gazda” molekula és a „hajtóerő” a komplexképzés irányába a magas entalpiájú vízmolekulák kicserélése valamely alkalmas „vendég molekulával” (3. ábra).



3. ábra. A p-xilol ciklodextrinnel történő zárványkomplexképzésének szemléltetése

Ha egy rosszul oldódó potenciális vendégmolekula vizes szuszpenziójához ciklodextrint adunk, akkor a néhány óráig vagy néhány napig tartó rázással elért egyensúlyi állapotban a vendégmolekula oldékonysága megnövekszik oly mértékben, amelyet az oldékonysági izoterma-típus határoz meg. Az oldékonyság növekedés lehet monoton, növekedhet valamely meghatározott határértékig, vagy éppenséggel csökkenhet is. Az ilyen ún. fázisoldékonysági diagramot a 4. ábra szemléltet [4].



4. ábra. Oldékonysági fázisdiagram típusok

Ha csak oldott komplex képződik, akkor a fázisoldékonysági izoterma „A” típusú, ha a komplex oldékonysága limitált, akkor „B” típusú az izoterma. Kivéve azokat az eseteket, amikor csakis oldhatatlan komplex képződik ( $B_1$ -típus, lásd az ábrán) a vendég oldékonysága ( $S_t$ ) először növekszik a vendégmolekula eredeti vizes oldékonysági értékétől ( $S_0$ ), amíg eléri „A” pontot, ahol megközelíti a rendszer a komplex oldékonysági értékhatárát. Tovább növelve a ciklodextrin-koncentrációt a vendégmolekula oldékonysága nem növekszik tovább, hanem megkezdődik a komplex mikrokristályos állapotban történő kicsapódása az oldatból ( $B_S$ -típusú izoterma). A „B” pont elérése azt jelenti, hogy a rendszerben lévő összes szilárd vendégmolekulát átalakítottuk kevésbé oldódó zárványkomplexé, ezért hiába adunk több ciklodextrint a rendszerhez, az asszociációs egyensúly az asszociáció irányába tolódik el és az oldékonyság értéke asszimetrikanusan közeledik a zárványkomplex inherens oldékonysági értékéhez ( $S_c$ ). Elméletileg az oldott koncentráció növekedésének az  $S_0$ -tól A-ig azonosnak kellene lennie az  $S_c$  értékkel (azaz „A” pontnál az



oldat éppen telített mind a vendégmolekulára, mind pedig a komplexére).

Ez azonban csupán elméleti eset, mivel a legtöbb esetben a képződött komplex sztöchiometriája a koncentráció viszonyoktól is függ, és míg kezdetben csaknem kizárólagosan 1:1 molarányú komplex képződik, magasabb ciklodextrin-koncentrációknál a sztöchiometria bonyolultabbá válik (1:2, 2:3 stb.). A domináns sztöchiometria és komplex szerkezet nem szükségszerűen azonos oldatban és szilárd fázisban.

Ha a vizsgált ciklodextrinkoncentráció-tartományon belül a komplex oldékonysági határát nem érjük el, akkor az izoterma „A” típusú. „A” azt jelenti, hogy az oldékonyság lineárisan növekszik, valószínűleg változatlan sztöchiometria mellett. Az „A<sub>p</sub>” típusú izoterma a linearitástól történő pozitív irányú eltérést jelenti, azaz a komplex sztöchiometriája változik, az eredetileg 1:1 molarányú komplex további vendégmolekulákkal asszociálódik és 2:3 stb. molarányú komplexek képződnek. Ha az izoterma „A<sub>N</sub>” típusú, akkor a rendszer még bonyolultabb, mert ez utalhat arra, hogy a komplexen belül a gazdamolekula aránya növekszik 1:1-ről 2:1-re, vagy a vendégmolekula, illetve a komplex hidratációja változik pl. a vendégmolekula ionizációja következtében.

A komplex stabilitási állandó értékét ( $K_c$ , asszociációs konstans) az 1:1 molarányú komplexekre a kezdeti lineáris szakasz tengelymetszetéből és iránytangenséből a következő módon számítjuk ki:

$$K_c = \frac{(S_t - S_o)}{S_o \{ [CD]_t - (S_t - S_o) \}} = \frac{tg \alpha}{S_o(1 - tg \alpha)}$$

A zárványkomplexek sztöchiometriáját az AB plató szakasz hosszából lehet számítani a következő egyenlet szerint:

$$\frac{\text{vendég}}{CD} = \frac{\left( \begin{array}{l} \text{rendszerhez adott} \\ \text{összes vendégmól} \end{array} \right) - \left( \begin{array}{l} \text{a vendégmól oldatban} \\ A\text{-pontnál} \end{array} \right)}{(CD)_t \text{ a platótartományban}}$$

A plató hosszának megfelelő ciklodextrin-mennyiség szükséges az „A” pontnál a rendszerben még megtalálható szilárd szabad vendégmolekulának teljes egészében komplexszé történő alakításához. A „B<sub>I</sub>” típusú diagramnál kezdeti emelkedő szakasz nem figyelhető meg, mert a zárványkomplex gyakorlatilag oldhatatlan, így ez a típusú izoterma nem alkalmas a  $K_c$  értékének számításához.

Az „A<sub>L</sub>” típusú diagramból az első egyenlettel lehet számítani a  $K_c$  értékét. Az „A<sub>p</sub>” típusú diagramból a  $K_c$  értékét iterációval lehet számítani, míg az „A<sub>N</sub>” típusú diagramokból a  $K_c$  érték ugyancsak nem számítható.

A ciklodextrin-komplexek viszonylag stabilisak, vízoldékonyságuk a tiszta ciklodextrinhez képest erősen lecsökken, ezért gyorsan kiválnak az oldatból kristályos formában. Egy, két vagy három ciklodextrin molekula tartalmazhat egy vagy több bezárt „vendég” molekulát. Ez a lényege a molekuláris kapszulációnak.

Ugyanaz a vendégmolekula teljesen különböző stabilitású komplexet képezhet a különböző ciklodextrin-ekkel. Bár a bezárt molekula fizikai-kémiai sajátosságai az üregben nagymértékben megváltoznak, ezek a komplexek könnyen disszociálnak már fiziológiai körülmények között is és így a vendégmolekula ki tudja fejteni a kívánt hatását.

A ciklodextrin zárványkomplexek előállítására egyszerű, de a körülményeknek „testre szabott”-nak kell lenniük mindenfajta vendégmolekulára. A komplexálást el lehet végezni homogén oldatban vagy szuszpenzióban vagy a komponensek egyszerű összekeverésével.

A kristályos ciklodextrin komplexek szerkezete nem szükségszerűen azonos azzal, ami vizes oldatban létezik. Oldott állapotban a vendégmolekulák vagy alkalmas csoportjaik a ciklodextrin üregben helyezkednek el és az egész komplex molekulát többretegű hidrátburok veszi körül. Kristályos állapotban azonban a vendégmolekulák nem csupán a ciklodextrin üregben helyezkednek el, de a ciklodextrin molekulák között is és úgyszintén néhány ciklodextrin molekula csak vizet fog tartalmazni, következésképpen ezek a kristályrácsba víz komplexként épülnek be.

A kristályos komplexek ezért csak ritkán szigorúan sztöchiometrikus összetételűek. Azonban eléggé stabilisak akkor is, ha a ciklodextrin-üreget csak részben telítik az apoláros vendégmolekulák. A zárványkomplexeket lehet tanulmányozni vizes oldatokban különböző spektroszkópiai módszerekkel (UV, fluoreszcencia, cirkulár dikroizmus, NMR) diffúzió, a bezárt molekula modifikált reaktivitása alapján stb. Szilárd állapotban röntgendiffrakció, termoanalízis (különösen a termális evolúciós analízis és a differenciális scanning calorimetria), vákuumszublimáció (szublimálható vendégek esetében), vákuumszárítás (illékony vendég esetében) stb. bizonyíthatják azt, hogy a komplexálási kísérlet eredménye valódi zárványkomplex, vagy pedig csupán egy keveréke a vendégmolekulának és a ciklodextrinnek.

A ciklodextrin-eknek legtöbb ipari alkalmazása a komplexálással kapcsolatos. Sok esetben a komplexeket többé-kevésbé tiszta formában izolálják is és mint kristályos anyagot alkalmazzák (gyógyszer és aromaanyag komplexek), míg más esetekben a komplexálás csak egy átmeneti állapotot jelent és megfigyelhetővé csupán csak a végeredmény (ciklodextrin katalízis, keverékek szétválasztása stb.) válik.

#### A zárványkomplex-képzés primér következményei

A legfontosabb primér következményei a gyengén oldódó vendégmolekula és a ciklodextrin kölcsönhatásának vizes oldatokban a következők:

- A vendégmolekula koncentrációja az oldott fázisban jelentősen megnövekszik, míg az oldott ciklodextrin koncentrációja csökken. Ez utóbbi azonban nem mindig igaz: ionizált vendégmolekulák, vagy hidrogén kötést létesítő (pl. fenolok) vegyületek növelhetik a ciklodextrin oldékonyságát.



- b) A vendégmolekula spektrális sajátosságai megváltoznak. Az anizotróp árnyékolású atomok kémiai eltolódása az NMR spektrumban megváltozik és ha akirális vendégmolekulák épülnek be a királis ciklodextrin-üregbe, akkor optikailag aktívává is válnak, és erős indukált Cotton-effektusokat mutatnak a cirkulár dikroizmus spektrumon, néha az UV maximum néhány nanométerrel eltolódik, a fluoreszcencia erősen fokozódik, mivel a fluoreszkáló molekulák a vizes közegből apoláros környezetbe kerülnek stb.
- c) A bezárt molekulák reaktivitása megváltozik. A legtöbb esetben a reaktivitás csökken, pl. a vendégmolekula stabilizálódik, de sok esetben a ciklodextrin mesterséges enzimeként viselkedve gyorsít bizonyos reakciókat, modifikálja a reakció-utakat.
- d) A diffúzió és az illékonyság (illékony molekula esetében) jelentősen csökkennek.
- e) A korábban hidrofób vendégmolekulák a komplexálás következtében hidrofíllé válnak, ezért pl. kromatográfiás mobilitásuk is megváltozik.

#### *Szilárd állapotban*

- a) A komplexált anyag molekulárisan diszpergálva lesz egy szénhidrát mátrixban, mikrokristályos port képez még gáz alakú vendégmolekulákkal is.
- b) Mindenfajta reakció ellen hatékonyan védve lesznek a vendégmolekulák, kivéve az olyan reakciókat, amelyekben a ciklodextrin hidroxil csoportok szerepet játszhatnak.
- c) A szublimáció és az illékonyság nagyon alacsony szintre csökkennek.

### **Ciklodextrinek a biotechnológiában**

Ha egy vízben rosszul oldódó apoláros szerves vegyület („vendégmolekula”) vizes szuszpenziójához ciklodextrint („gazdamolekula”) adunk, akkor (amennyiben a komplexképzés egyéb feltételei fennállnak) növekedni fog az oldott vendégmolekula koncentráció. Ha a rendszerben a vendégmolekula teljes egészében oldva van, akkor a ciklodextrin hozzáadása azt eredményezi, hogy az oldott vendégmolekulának csak egy része marad „szabad”, másrésze komplexbe lesz zárva és ennek következtében a már ismertett változásokon kívül még egy fontos sajátossága megváltozik: affinitása a sejtmembránokhoz, tehát pl. a toxicitása. Mivel a ciklodextrinek az enzimekre (kivéve az amilolitikus enzimeket) és a mikroorganizmusokra közvetlenül hatást nem gyakorolnak, a mikrobiológiai vagy enzimes folyamatokat meg lehet valósítani ciklodextrin-oldatokban, a megszokottaknál magasabb összes oldott szubsztrát koncentrációknál, ugyanakkor alacsonyabb szabad szubsztrát (kevésbé inhibáló vagy kevésbé toxikus) koncentrációknál. Ezt szemléltetik a következőkben felsorolt példák.

#### *A bioszintetikus aktivitás fokozása*

A pertussis-toxin (=leukocitózis promoting faktor, LPF-hemagglutinin) egyike a fő védőantigéneknek a

számárköhögés ellen. Ezt a Bordatella pertussis termeli. Egy kevésbé reaktogén vakcina termeléséhez szintetikus táptalaj szükséges, de a pertussis-toxin termelése meglehetősen nehéznek bizonyult szintetikus táptalajon, különösen rázott kultúrákban. A Bordatella pertussis nagyon érzékeny számos inhibitorral, pl. zsírsavakkal (palmitin- vagy oleinsav) szemben, már 10  $\mu$ M koncentráció leállítja a sejtszaporodást [5]. Hozzáadva azonban 0,5 mg/ml dimetil-béta ciklodextrint (vagy trimetil-béta-ciklodextrint) fokozott sejtnövekedést lehet megfigyelni, továbbá a pertussis-toxin termelés százszorosáig fokozódott [6,7]. Az eljárást már több országban (Japán, Kanada) alkalmazzák iparilag. A filamentozus hemagglutinin termelése még nagyobb mértékű, néhány százszoros volt a dimetil-béta-ciklodextrin jelenlétében [7]. A Mycobacterium phlei (=M. smegmatis) zsírsav-termelését a ciklodextrinek és különösen a metilézett ciklodextrinek igen jelentős mértékben megjavítják [8].

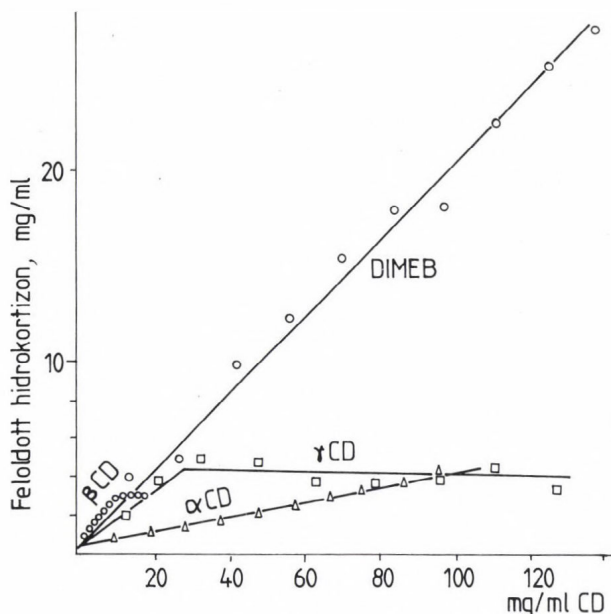
A lankacidin csoporthoz tartozó antibiotikumok termelését a béta-ciklodextrin jelenléte jelentősen megjavította. 11 mM béta-ciklodextrint adva a Streptomyces rochei volubilis tenyészetet tartalmazó fermentorba a lankacidin A és C termelése 0,05, illetve 0,04 mM-ról 0,55 és 4,6 mM-ra növekedett. Béta-ciklodextrin hozzáadása nélkül a fermentáció végére mindössze 0,4 mg/ml lankacidin C koncentrációt sikerült elérni, míg a ciklodextrinnel ez elérte a 3,1 mg/ml-t. A béta-ciklodextrin nem gyakorolt észrevehető hatást a sejtszámra, a szénforrás fogyasztási sebességére, vagy pH-ra és maga a béta-ciklodextrin sem metabolizálódott. A keletkezett antibiotikumot béta-ciklodextrin komplex formájában lehet izolálni [9].

#### *Mikroorganizmusok által végzett biokonverziós folyamatok*

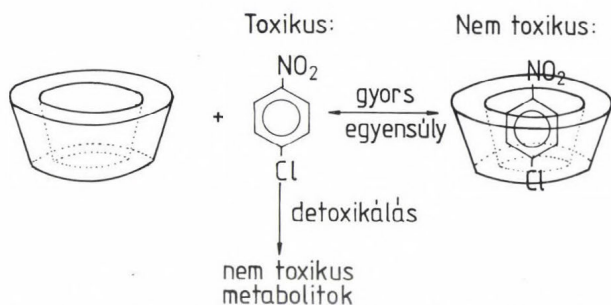
Az 5. ábra szemlélteti a hidrokortizon oldékonyságát különböző ciklodextrin oldatokban. A dimetil-béta ciklodextrin (egyelőre) túlságosan drága ipari célokra, de nagyon jelentős javulást lehet elérni a hidrokortizonnak a prednizolonná történő mikrobiológiai konverziójánál, amely a béta-ciklodextrin oldatban megfigyelhető látszólag kismértékű oldékonyság fokozásán alapszik. A hidrokortizon oldhatósága vízben mindössze 0,4 mg/ml, ezért nagy térfogatokban viszonylag csak kis mennyiségeit lehetett ennek a szteroidnak konvertálni mikrobiológiai úton. A konverziós folyamat lassú, és a végtermék nem volt homogén, mert keverék kristály is képződött (hidrokortizon + prednizolon). Ezt a folyamatot vizes béta-ciklodextrin oldatban megvalósítva a kapacitás több mint 300%-kal fokozódott. A hidrokortizon oldékonysága növekszik, 3-4-szer több hidrokortizont lehet betáplálni egy konverterbe, a reakció gyorsabb és a végtermék homogénebb. Az elvet a 6. ábra szemlélteti. Ezt az eljárást már alkalmazza a Kőbányai Gyógyszerárugyár [10].

Gyakorlatilag minden mikrobiológiai szteroid konverziós folyamatot kipróbáltak már vizes ciklodext-





5. ábra. A hidrokortizon oldékonysági izotermája 25°C-nál 9 órás rázásal



6. ábra. Ciklodextrint adva a toxikus p-nitroklórbenzolt tartalmazó szennyvízhez, a ciklodextrin a vegyület egy frakcióját komplexálja.

A ciklodextrin-komplex — lévén hidrofil — kisebb affinitással rendelkezik a lipoprotein sejtmembránokhoz, ezért kevésbé toxikus a mikróba sejtekre. Csak a nem komplexált frakció hat a sejtmembránon.

rin oldatokban, minden esetben ígéretes eredményekkel. A koleszterin Mycobacteriummal végzett mikrobiológiai konverziója androst-4-én-3,17-dionná 180 óra alatt nem ért el jobb kitermelést, mint 40%-ot a koleszterinre vonatkoztatva. A biokonverzió termékátolt, és a szteroid gyűrű is degradálódik. Béta-ciklodextrin jelenlétében 96%-os kitermeléssel sikerült a konverziót rövid idő alatt megvalósítani [11].

A ciklodextrin stimuláló hatását megfigyelték aromás aldehideknek észterekkel aromás alkoholokká történő biotranszformációjánál is. Mind a kitermelés, mind a folyamat sebessége jelentősen megjavult [12].

#### Enzimes reakciók ciklodextrinek jelenlétében

A triglicerideknek a lipázok általi hidrolízise vizes rendszerekben nagyon lassú folyamat. Vagy valamilyen lipidoldó vízzel elegyedő szerves oldószert kell a

rendszerhez adni — amely csak viszonylag alacsony koncentrációig lehetséges az enzim-protein denaturálódása miatt — vagy pedig egy alkalmas detergenst, pl. természetes epét kell hozzáadni. A 2. táblázat szemlélteti az olívaolajnak a lipáz általi hidrolízisét mindenféle detergens nélkül, vagy pedig sertés-epe vagy dimetil-béta-ciklodextrin jelenlétében. A hidrolízist a felszabaduló zsírsavaknak nátrium-hidroxiddal történő titrálásával követték. Mint látható a dimetil-béta-ciklodextrin számottevő mértékben gyorsította a lipolízist [13]. Egy másik kísérletben glicerintrioleátot hidrolizáltak csirke-epe vagy dimetil-béta-ciklodextrin jelenlétében, hasonló eredménnyel. Ha patkányok vagy nyulak epevezetékét ligálták és az állatokat trigliceridekkel (zsírral) etették, azok nem tudták a lipideket emészteni, az nem szívódott fel. Ha azonban dimetil-béta ciklodextrint is adtak egyidejűleg, akkor helyreállt a lipid emésztés-felzívódás, azaz a dimetil-béta-ciklodextrin képes volt helyettesíteni az epét [14].

2. táblázat

#### Olívaolaj enzimes hidrolízise 37°C-on, a szabadabbá váló zsírsavakat titrálva [11].

| Reakció idő, óra | Fogyasztott 0,005 normál NaOH, ml | a        | b    | c           |
|------------------|-----------------------------------|----------|------|-------------|
|                  |                                   | kontroll | epe  | dimetil-βCD |
| 0,5              | 0,0                               | 0,82     | 1,74 |             |
| 1                | 0,36                              | 1,17     | 2,00 |             |
| 2                | 0,48                              | 1,37     | 2,20 |             |
| 19               | 0,63                              | 2,62     | 4,77 |             |

Reakció sebesség gyorsítás

~ 4 ×      ~ 7,4 ×

Reakcióelegy: 0,5 ml puffer (50 μmol foszfát puffer, pH 7,4) + 3,54 mg olívaolaj + 12,5 mg sertés pankreasz, 0,52 ml víz + a) 0,75 ml víz (kontroll, detergens nélkül) b) 0,25 ml sertés epe, hígítva 1:5 arányban vízzel + 0,5 ml víz, vagy c) 50 mg dimetil-béta-ciklodextrin 0,75 ml vízben.

Az a megfigyelés, hogy a foszfatidok (lignocerin-sav, cerebrozidok, ceramidok) a ciklodextrinokkal szolubilizálhatók, valószínűleg kiaknázásra fog kerülni a lipidek enzimológiájában [15]. Például tanulmányozva a Lignocerin-CoA ligáz enzim aktivitását a patkány agyból készült mikroszómális preparátumokban megfigyelték azt, hogy az alfa-CD-vel szolubizált lignocerin-savat a preparátum beépítette, de a Triton WR-rel szolubizált lipidet nem tudta hasznosítani.

A digitalis lanata jelentős mennyiségű ún. primér glikozidot tartalmaz, amelyekből elő kell állítani a farmakológiailag sokkal hatékonyabb szekunder glikozidokat (pl. digoxin). A hidrolízist savval végezve számos bomlástermék képződik, rossz a kitermelés. Kézenfekvő a specifikus enzimes hidrolízis alkalmazása, de a szubsztrát nagyon kismérvű oldékonysága miatt ez csak vizes, szerves oldószeres elegyben képzelhető el, ami részben az enzim aktivitását csökkenti



jelentős mértékben, másrészt ugyancsak számos mellékreakciót eredményez. Dimetil-béta ciklodextrinnel szolubizálva a lanatozid C glikozidot a hidrolízis viszonylag rövid idő alatt és nagyon jó kitermeléssel, szelektivitással megvalósítható [16].

#### Ciklodextrinek alkalmazása szövettényezetekben

Telítetlen zsírsavak ciklodextrin komplexeit az emlős sejtkultúrákban szérumbeltesítőként lehet alkalmazni. Mind az olajsav béta-ciklodextrin, mind a linolénsav béta-ciklodextrin komplexe a humán lymphoblast sejtek esetében növekedéscsökkentő hatást mutatott 100 mg/l közeg koncentrációig. Nagyobb koncentrációknál a zsírsav béta-ciklodextrin komplex toxikusnak bizonyult, de ez nyilvánvalóan a zsírsavaknak tulajdonítható, 100 mg zsírsav ciklodextrin komplex és 1000 mg szabad béta-ciklodextrin komplex együtt még nem eredményeztek toxikus hatást, viszont stabilis és reprodukálható növekedés elősegítő hatást mutattak. Humán diploid fibroblast kultúrákban a borjú albuminnal szupplementált közeghez hasonló növekedést figyeltek meg, ha a zsírsav-béta-ciklodextrin komplex végső koncentráció 10–20 mg/l volt. A borjú szérumbeltesítő részben vagy egészben helyettesíteni lehet zsírsav-béta-ciklodextrin komplexekkel az emlőssejt kultúrákban [17,18], mint például a humán interferon termelésben [19].

Az oldékonyságfokozás mellett a stabilizálás a másik fontos következménye a Nystatin — egy polyén antibiotikum — gamma-ciklodextrinnel történő komplexálásnak. A Nystatin gyakran alkalmazott antifungális antibiotikum, amelyet a humán gyógyászatban lokális antifungális kezelésre alkalmaznak. A szövetkultúrákban — a biotechnológia egy fontos eszköze — szükség van oldható antifungális ágensekre, amelyeket a tápközegben fel kell oldani. A Nystatin nagyon alkalmas lenne ilyen célokra, azonban gyakorlatilag oldhatatlan a vízben és gyorsan tönkremegy az oxidáció révén. A Nystatin gamma-ciklodextrin komplex egy viszonylag stabilis, könnyen oldódó por, jól alkalmazható ilyen célokra [20].

#### Ciklodextrinek a szennyvíz detoxikálásában

A toxikus szerves vegyületek széles köre (hidroxil-, halogeno-, nitro-, amino- stb. aromás és alifás származékok) található a szerves vegyipar és a gyógyszeripar szennyvízeiben. A biológiai szennyvíztisztítás azt jelenti, hogy ezeket a toxikus vegyületeket bizonyos élesztők és baktériumok degradálják, amelyek a biológiai ún. élőiszapban találhatók. Ezek a mikroorganizmusok a toxikus vegyületeket csak akkor tudják elviselni, ha azok koncentrációja nem halad túl egy kritikus szintet, ez alatt a toxikus anyagokat metabolikus folyamatok révén nem-toxikus anyagokká konvertálják. Megfelelő adaptációs eljárásokkal a toxikus anyagok tolerábilis koncentrációját lehet fokozni, de ha ezt a kritikus koncentráció-szintet túllépik — akár-

csak rövid időre is — akkor az említett mikroorganizmusok elpusztulnak, azaz az élőiszap detoxifikáló kapacitását irreverzibilis károsodás éri. Az ilyen biológiai rendszerek regenerálódása nem gyors folyamat. Ezért a detoxifikáló kapacitás megőrzése az élőiszapban a környezetvédelem egyik elsőrendű célja.

Az ilyen kritikus vagy kritikus feletti koncentrációt úgy lehet például elkerülni, hogy a toxikus anyagokat tartalmazó szennyvizet olyan vízzel vagy szennyvízzel hígítják, amelyik ilyen anyagot nem tartalmaz. Ily módon lehet redukálni a toxikus anyag koncentrációját. Néha az ilyen hígítás több ezer köbméter toxikus anyag mentes vizet igényelne, ami nem mindig áll rendelkezésre.

Az ilyen vizekhez ciklodextrint adva — amelynek természetesen nem kell tisztának lennie, a legolcsóbb technikai minőség is megfelelne erre a célra — az említett organikus toxikus vegyületek számottevő része komplexálódik [21,22,23]. A komplexált molekulák nem tudnak behatolni a sejtmembránon keresztül, ezért nem toxikusak. Ily módon a szabad toxikus anyagkoncentráció erősen redukálódik a kritikus koncentrációs szint alá. Amint ez a koncentráció csökken a metabolikus folyamatok révén, a ciklodextrin komplexek, mint dinamikus tartalékok viselkednek: szabadon eresztik a bezárt toxikus molekulákat, és ezt az egész folyamatot a disszociációs egyensúly határozza meg (6. ábra).

Egy olyan kevert ipari és kommunális szennyvizet, amely fenolt, paraklórfenolt, benzolt és egyéb organikus anyagokat tartalmazott, konvencionális módon kezeltek, illetve oly módon, hogy hozzáadtak 40 mg/l béta-ciklodextrint is. Az eredményeket a 3. táblázat szemlélteti.

3. táblázat

#### A $\beta$ -ciklodextrin hatása a biológiai szennyvíz detoxikálására

| Megnevezés       | Kezelés előtt | 24 óra konvencionális kezelés után, mg/ml | 24 óra kezelés után hozzáadva 40 mg/l $\beta$ -CD-t |
|------------------|---------------|---|---|
| Fenol            | 30            | 10  | 1   |
| Paraklórfenol    | 10            | 5   | 1   |
| Benzol           | 4             | 3   | 0,05  |
| Oxigénfogyasztás | 800           | 200                                       | 60  |

A béta-ciklodextrin jelenlétében történő detoxikáció néha jelentősen lelassul, mint ezt a 4. táblázat szemlélteti.

Ellentétben a para- és a 2,4-diklórfenoloknál megfigyelttel, a béta-ciklodextrin komplexáló hatása gátolja a pentaklórfenol metabolizációját. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a pentaklórfenol nagyon stabilis komplexet képez a béta-ciklodextrinnel és ez védi a bezáródó vendégmolekulát az enzimes támadással szemben.



Nem csupán a természetes ciklodextrinek, de néhány származék is szóba jöhet az ilyen detoxikációs folyamatoknál. Polimer gyöngyökben rögzítve *Candida tropicalis* sejteteket és oldható béta-ciklodextrin polimert, a szennyvizekből a fenol a toxikus szintet jóval meghaladó koncentrációknál is hatékonyan eliminálható [24].

#### 4. táblázat

### A béta-ciklodextrin hatása néhány klórfenol detoxikálására az aktivált iszapban

| Mintavételi idő | Vegyület            | Átalakult, %      |                         |
|-----------------|---------------------|-------------------|-------------------------|
|                 |                     | $\beta$ CD nélkül | $\beta$ CD jelenlétében |
| 2 óra           | <i>p</i> -Klórfenol | 23,3              | 9,5                     |
| 4 óra           |                     | 25,9              | 53,4                    |
| 6 óra           |                     | 27,6              | 54,4                    |
| 1 nap           | 2,4-Diklórfenol     | 7,5               | 1,3                     |
| 2 nap           |                     | 25,4              | 18,5                    |
| 4 nap           |                     | 26,0              | 32,1                    |
| 7 nap           |                     | 29,5              | 73,0                    |
| 1 nap           | penta-Klórfenol     | 0,7               | 0,2                     |
| 2 nap           |                     | 20,4              | 1,7                     |
| 4 nap           |                     | 23,3              | 0,3                     |
| 7 nap           |                     | 56,7              | 2,5                     |

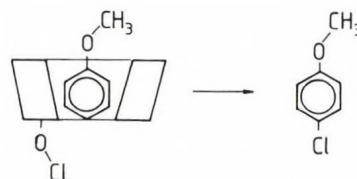
### A ciklodextrin-üreg, mint molekuláris méretű reaktor

A ciklodextrin-üregbe zárt „vendégmolekula” függetlenül attól, hogy a komplex szilárd kristályos fázisban vagy oldott állapotban van, mérsékelten apoláros közegben, nem hidratált állapotban van, anélkül, hogy más, hasonló molekulával érintkezhetne. Így polimerizáció, diszproporcionálódás, oxidáció nem történhet, viszont olyan reakciók, amelyekben a ciklodextrin hidroxilok szerepet játszhatnak, jelentősen felgyorsulnak. A ciklodextrinek önmagukban is, de különösen megfelelő módon szubsztituált származékaik formájában enzimmodellként viselkednek. Ennek már eléggé széleskörű irodalma van, itt azonban csak olyan reakciókra szándékozunk röviden utalni, ahol a ciklodextrin molekula nem enzimmodell, hanem a ciklodextrin-üreg, mint valamely reakció lejátsszódásának a helyszíne, azaz mint molekuláris méretű reaktor viselkedik. Különösen a terner komplexek esetében van ez így, azaz, amikor a „fő” vendégmolekula mellett még egy kis méretű, reaktív második vendégmolekula is belép az üregbe: ilyen esetben gyors és nagymértékben szelektív reakciókra számíthatunk [3].

#### Regioszelektív halogénezés

Anizolt vizes oldatban klórozva kb. 40% orto- és 60% para-klóranizol képződik. Ha a vízben alfa ciklodextrint oldunk, akkor annak koncentrációjával arányosan nő a keletkező para-klóranizol aránya [25]. A reakció úgy is megvalósítható, hogy ciklodextrin

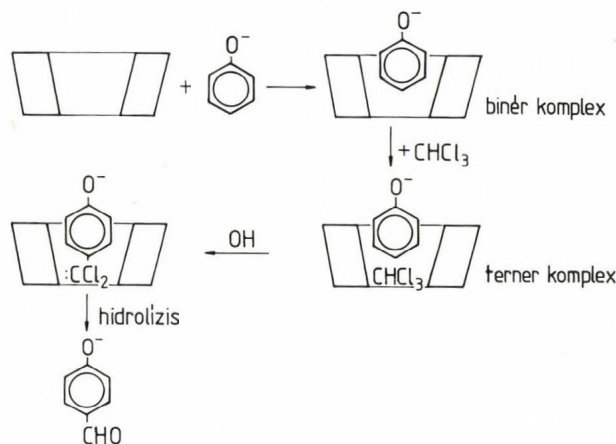
térhálósításával előállított polimerben kötjük az anizolt, majd ezt az anizollal telített polimer-oszlopot hipoklorit oldattal mossuk át. Ilyen esetben a para-klóranizol aránya a 99%-ot is meghaladja [26]. Ciklodextrint immobilizálva grafitelektródok felületén az anizol [27] vagy a toluol [28] anódos klórozása ugyancsak a para-izomer keletkezését fokozza. A reakció első lépése az, hogy a klóratom a ciklodextrin gyűrű primér hidroxiljával lép reakcióba (7. ábra), majd az oxigénatomon kötött klór támadja az aromás gyűrű nem fedett para pozícióját. Az orto és meta pozíció a ciklodextrin gyűrű által fedve van.



7. ábra. Az anizol ciklodextrin jelenlétében történő szelektív *p*-klórozásának valószínű mechanizmusa

#### Reimer-Tiemann formulézés és karboxilezés

Alkálikus vizes oldatban oldott fenolhoz kloroformot, vagy rézpor katalizátort és széntetrakloridot adva a para- és az orto helyzetben aldehyd, illetve karboxil csoport épül be. A reakciót ciklodextrin jelenlétében megvalósítva nagyfokú szelektivitással csak a para helyzetben történik szubsztitúció. A reakciónak az a mechanizmusa, hogy a ciklodextrin-üregbe a fenolmolekula az apoláros részével félig helyezkedik be, az alatta lévő hely azonban alkalmas arra, hogy a halogénezett szénhidrogénből keletkező kation ugyancsak beépüljön és úgy jön létre a szelektív para szubsztitúció [29,30] (8. ábra).



8. ábra. *p*-Hidroxi-benzaldehid szintézis ciklodextrin jelenlétében

#### Diels-Alder reakció

A ciklopentadién és acetonitril kondenzáció sebessége 9-szeresére fokozódik béta-ciklodextrin jelenlétében.



tében, de kb. 20%-kal lassul alfa-ciklodextrin jelenlétében. Molekulamodellek tanulmányozásával megállapítható, hogy míg a béta-ciklodextrinbe mindkét komponens befér, addig az alfa-ciklodextrin üreg túl kicsi ahhoz, hogy mindkét komponenst egyidejűleg magába tudja zárni [31] (9. ábra).



9. ábra. A ciklopentadién és az akril-nitril közötti Diels-Alder reakcióját az alfa-ciklodextrin gátolja, a béta-ciklodextrin pedig gyorsítja

### Eliminációs reakciók

A ciklodextrinek vizes közegben katalizálják a metilfenil-cianocetsav, a szubsztituált acetecetsavak és trihalo-ecetsavak dekarboxileződését [32]. Ez a katalitikus hatás azonban erősen függ a körülményektől. Pl. foszfátpufferben mind az alfa-, mind a béta-ciklodextrin katalizálja a benzoil-ecetsav dekarboxileződését, mivel a disszociált anionnal mindkét ciklodextrin hasonló módon lép kölcsönhatásba. A pH3 körül azonban már zömmel a nem-ionizált sav veszíti el karboxil csoportját, és ekkor már csak a béta-ciklodextrinnek van katalizáló hatása, az alfa-ciklodextrin ellenkezőleg, stabilizálja a molekulát. Ezt konformációs hatással lehet magyarázni. A béta-ciklodextrin üregben a vendégmolekula feszültséggel rendelkező konformációban tud behelyeződni. Az alfa ciklodextrin oly mértékben korlátozza a molekula mozgási szabadságát, hogy nem reaktív konformációba kényszeríti a molekulát.

Jelentős és egyre növekvő számú publikáció foglalkozik a fentiekhez hasonló megfigyelések leírásával, és már több szabadalom is foglalkozik az ilyen lehetséges esetleges ipari hasznosításával.

A kézirat beérkezett: 1989. máj. 30.

### IRODALOM

- [1] French, D.: Adv. Carbohydrate Chem., 12 189 (1957).
- [2] Szejtli, J.: „Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes” Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.
- [3] Szejtli, J.: Cyclodextrin Technology, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, 1988.
- [4] Hirayama, F. — Uekama, K.: in „Cyclodextrins and their Industrial Uses, (Ed.: Duchéne, D.), Editions de Santé, Paris, 1987.
- [5] Suzuki, Y. — Imaizumi, A. — Sato, H. — Sato, Y.: Ipn. J. Med. S. 36 111 (1983).
- [6] Imaizumi, A. — Suzuki, Y. — Onos, S. — Sato, H. — Sato, Y.: Infection and Immun. 41 1138 (1983).
- [7] Suzuki, Y. — Imaizumi, A. — Ono, S. — Sato, H. — Sato, Y.: Abstract Book of 3rd Int. Symp. Clathrate Comp. and 2nd Int. Symp. on Cyclodextrins, Tokyo, (1984) July 23–27.
- [8] Bergeron, A. R. — Machida, Y. — Bloch, K.: J. Biol. Chem. 250 1223 (1975).
- [9] Sawada, H. — Suzuki, T. — Akiyama, S. — Naka, Y.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 26 522 (1987), C. A. 107:196443.
- [10] Udvardy, N. É. — Bartha, I. — Hantos, G. — Trinn, M. — Vida, Zs. — Szejtli, J. — Stadler-Szőke, Á. — Habon, I. — Balázs, M.: (Richter Gedeon) Belg. Pat. (1983) 894, 501, C. A. 99:4069.
- [11] Hesselink, P. G. M. — de Vries, H. — Witholt, B.: in Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology. (1987) Vo.2. (Neijssel, O. M., van der Meer, R. R. and Luyben, K. C. A. M., eds), Elsevier, pp. 299.
- [12] Bar, R.: Trends in Biotechnol. 7 2 (1989).
- [13] Szejtli, J. — Szenté, L. — Kálói, K. — Marton, J. — Gerlóczy, A.: Hung. Pat. Appl. 75/85.
- [14] Gerlóczy, A. — Szenté, L. — Szejtli, J. — Fónagy, A.: in Inclusion Phenomena in Inorganic Organic, and Organometallic Hosts (Eds.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies), Reidel Publ. Co., Dordrecht, 1987. p. 415.
- [15] Singh, I. — Singh, R. — Bhushan, A. — Singh, A. K.: Arch. Biochem. Biophys. 236 418 (1985), C. A. 102:91817.
- [16] Nánási, P. — Lenkey, B. — Szejtli, J.: Nem publikált eredmények (1980).
- [17] Yamane, I. — Kan, M. — Minamoto, Y. — Amatsuji, Y.: Proc. Jpn. Acad. Ser. B. 57 385 (1981), C. A. 96:100488.
- [18] Yamane, I. — Kan, M. — Minamoto, Y. — Amatsuji, Y.: Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation (1982) p. 87, C. A. 97:212006.
- [19] Ajinomoto Co.: Jpn. Kokai (1982) 82, 194, 787, C. A. 98:124208.
- [20] Szejtli, J. — Stadler-Szőke, Á. — Vikmon, A. — Piukovich, S. — Inczefy, I. — Kulcsár, G. — Zlatos, G.: Hung. Pat. 4508/83 (1983).
- [21] Oláh, J. — Cserhádi, T. — Szejtli, J.: Magyar Kémikusok Lapja 43 104 (1988).
- [22] Farkas, P. — Oláh, J. — Szejtli, J. — Szenté, L. — Cserhádi, T.: Hung. Pat. (1984) 2650/84.
- [23] Oláh, J. — Cserhádi, T. — Szejtli, J.: Water Res. 22 1345 (1988).
- [24] Bánky, B. — Recseg, K. — Novák, B.: Magy. Kém. Lapja 40 189 (1985).
- [25] Breslow, R. — Campbell, P.: Bioorg. Chem. 1 140 (1971).
- [26] Breslow, R. — Kohn, H. — Siegel, B.: Tetrahedron Lett. 20 1645 (1976).
- [27] Kureha Chem. Ind. Co.: Jpn. Kokai (1980) 80, 85, 684, C. A. 93:194463.
- [28] Osa, T. — Fujihara, M. — Matuse, T. — Senda, J. M. — Yamamuchi, T.: Kuhera Chem. Ind. Co. (1980), Ger. Offen 2, 951, 503, C. A. 93:103846.
- [29] Hirai, H. — Komiyama, M. (Asahi Chemical Industry Co.) PCT Int. Appl. (1982) WO 8203073, 16 .09. 1982, C. A. 98:71670.
- [30] Komiyama, M. — Hirai, H.: Makromol. Chem. Rapid Commun. 2 661, (1981), C. A. 96:34749.
- [31] Breslow, R.: in: „Inclusion Compounds” (1984), Vol. 3. (Eds.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol), Academic Press, London, 1984. p. 473.
- [32] Cramer, F. — Kampe, W.: J. Am. Chem. Soc. 87 1115 (1965).



## Bevezetés

A ciklodextrinek\*\* gyártása elvileg két fázisból áll:

- Az előhidrolizált keményítő enzimes konverziója gyűrűs és nyílt láncú dextrinek keverékévé.
- A ciklodextrinek izolálása a konverziós elegyből, tisztításuk és kristályosításuk.

A ciklodextrinek (CD-k) gyártásának alapanyaga a keményítő. Minél tisztább a kiindulási keményítő, annál könnyebben biztosítható a végtermék nagyfokú tisztasága is. Az ideális a burgonyakeményítő lenne, de Magyarországon a kukoricakeményítőt használjuk, mert ez áll nagyobb mennyiségben és legolcsóbban rendelkezésre. Ennek az a hátránya, hogy jelentős mennyiségű (közel 1%) zsírtartalma van, ami a ciklodextrinek egy részével oldhatatlan komplexet képez.

A nyíltláncú (lineáris amilóz, illetve elágazó szerkezetű amilopektin) keményítő-komponensekből a ciklodextrin-glükoziltranszferáz (CGT-áz) enzim hatására keletkeznek a gyűrűs szerkezetű ciklodextrinek. Ennek az enzimnek a forrása eredetileg a *Bacillus macerans* volt. Pár évvel ezelőtt még könnyen fel lehetett sorolni azt a néhány mikroorganizmust, amely ilyen enzimet tudott termelni, újabban azonban egyre több pontosan nem is azonosított mikroorganizmusról írnak le, hogy képesek ilyen enzimet termelni. A jövő minden valószínűség szerint a géntechnikával módosított mikroorganizmusok, illetve enzimek alkalmazása. Így pl. a patogén *Klebsiella pneumoniae* nagyon hatékony CGT-áz enzimet termel, de a *Klebsiella*-val iparilag dolgozni veszélyes lenne. A megfelelő gént átvitték

*Bacillus subtilis*-be, így most veszélytelenül könnyedén termelhető a szükséges enzim. Újabban évente átlag 2-3 új módosított enzimet írnak le, iparilag azonban ma még csak a *Bacillus macerans* és az alkalofil Baktérium N<sup>o</sup> 38-2 eredetű CGT-áz enzimeket gyártják és alkalmazzák.

A CGT-áz enzim gyártása is két fázisból áll:

- A ciklodextrin glükozil-transzferáz enzim (CGT-áz enzim) termelő mikroorganizmus tenyésztése.
- Az enzim izolálása a fermentléből, koncentrációja és tisztítása.

Az enzimgyártás tipikusan fermentációs technológiát igényel, így az rendszerint a ciklodextrin-konverziótól teljesen elkülönítve történik. (Magyarországon pl. az enzimet a Chinoin leányvállalata, a Biochin gyártja, a ciklodextrin konverziót pedig a Győri Szeszgyár végzi a Chinoin technológiája alapján.) Az enzim termelésével a jelen munka nem foglalkozik.

Igen nagy számú közlemény és szabadalom (lásd az 1. táblázatot) foglalkozik a ciklodextrin gyártás fenti fázisaival. Egyes szabadalmak, illetve publikációk általában foglalkoznak a ciklodextrin gyártással, mások specifikusan  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD, vagy a  $\gamma$ -CD előállításával.

A következőkben a ciklizáló enzimes konverziót kényszerűen megelőző hidrolízist, a keletkező  $\alpha$  :  $\beta$  :  $\gamma$  :  $\gamma$  -ciklodextrinek közötti arány befolyásolását, valamint az egyes ciklodextrinek homogén állapotban történő előállítását, majd az általánosítható megfigyeléseket, következtetéseket, és további fejlesztések lehetséges irányait tárgyaljuk.

1. táblázat

## Eljárások és szabadalmak a ciklodextrinek gyártására

| Szerző, ill. szabadalmas    | Keményítő fajta és koncentráció, % | Előhidrolízis | Komplexáló ágens             | A képződött CD kinyerése   | Főtermék     | Megjegyzés |
|-----------------------------|------------------------------------|---------------|------------------------------|--|--------------|------------|
| Armbruster et al (1969) [1] | burgonya, 30%                      | amiláz        | toluol                       | A maradék keményítőt (a toluol eltávolítása után) amilázzal hidrolizálják      | $\beta$ CD   |            |
| Armbruster et al (1970) [2] |                                    | amiláz        |                              | A keverékben az összes ciklodextrinnek kb. 45%-a $\alpha$ , 55%-a $\beta$ CD   | $\alpha$ CD, |            |
| Hiteka et al (1971) [3]     | burgonya, 5%                       |               | anion cserélő (Diaion S-200) | A CD-t az ioncserélőn adszorbeálják majd eluálják vizes NaOH v. HCl oldatokkal |              |            |

\* CYCLOLAB, Cyclodextrin Kutató-Fejlesztő Leányvállalat, Budapest

\*\* A ciklodextrinek szerkezetét, fizikai-kémiai sajátosságait, és igen széles körű felhasználási lehetőségeiknek egy részét a jelen számban található többi ciklodextrin-tárgyú cikk ismerteti



| Szerző, ill. szabadalmaz  | Keményítő fajta és koncentr., %   | Előhidrolízis                | Komplexáló ágens  | A képződött CD kinyerése  | Főtermék   | Megjegyzés  |
|---|---|------------------------------|---|---|--|---|
| Armbruster et al (1972) [4]   | burgonya, 30%   | amiláz                       | 1-decanol vagy 1-butanol (vagy egyéb alkalmas komplexáló szer) triklóretilén              | Komplexálás triklóretilénnel  | $\alpha$ CD<br>$\beta$ CD                              |   |
| Hayashibara et al (1973) [5]<br>Sato et al (1974) [6]   | oldható keményítő vagy kukorica keményítő, 10%<br>5-30%   | amiláz v. oxálsav            | triklóretilén   | Újralecsapás brómbenzollal  | $\beta$ CD<br>keverék                                  | pullulanázt adva a konverzió során a rendszerhez a CD kitermelés megjavul |
| Horikoshi et al (1974) [7]<br>Suzuki et al (1975) [8]   | burgonya, 10%<br>alacsony D. E. értékig elhidrolizált édes burgonyakeményítő, 34%<br>burgonya, 5% | 1N NaOH                      |   | Leccsapva kloroformmal  | $\beta$ CD   |   |
| Yoritomi és Yoshida et al (1975) [9]<br>Suzuki et al (1970) [10]  | kukorica, 3%  |                              |   | Hidrolízis amilázzal és szeparálás anion cserélőn.<br>A maradék keményítő glukoamilázzal hidrolizálják  | $\beta$ CD   | pullulanáz alkalmazásával a kitermelés 70%-ra növelhető                   |
| Kawano et al (1977) [11]<br>Kobayashi et al (1977) [12]<br>Horikoshi et al (1978) [13]<br>Horikoshi et al (1979) [14] | burgonya, 23%<br>burgonya, 5%<br>kukorica, 1%<br>burgonya, 4%                                     | CGT-áz                       | Na-laurilszulfát  | A maradék keményítőt glukoamilázzal hidrolizálják<br>Leccsapás acetonnal<br>Porlasztva szárítás   | $\beta$ CD<br>$\alpha$ CD<br>keverék                   |   |
| Vakaliu et al (1979) [15]<br>Rikagaku Kenkyushu (1980) [16]   | kukorica, 33%<br>burgonya, 4%   | amiláz<br>CGT-áz             | toluol  | Toluol-komplekként<br>A maradék keményítőt glukoamilázzal hidrolizálják és a CD-t ioncserélő oszlopon abszorbeáltatják  | $\beta$ CD<br>$\alpha$ CD<br>$\beta$ CD<br>$\gamma$ CD | kromatográfias elválasztás alacsony koncentrációnál                       |
| Toyo Jozo (1980) [17]<br>Kobayashi et al (1980) [18]<br>Yagi et al (1980) [19]  | burgonya, 25%<br>kukorica, 20%  |                              | $C_{1-8}$ szénatomos alifás alkoholok, vagy $C_{2-4}$ szénatomos ketonok<br>triklóretilén | Kristályosítás 3-5°C-on<br>Triklóretilén komplekként  | keverék<br>$\beta$ CD                                  | a konverzió <i>Micrococcus varians</i> CGT-ázzal                          |
| Japan Maize Prod. (1980) [20]<br>Avebe (1981) [21]<br>Horikoshi et al (1982) [22]                                     | 15% $\beta$ CD<br>6% glükóz<br>burgonya, 20%<br>burgonya, 4%                                      | jet-cooker 150°C-nál<br>NaOH |   | A $\beta$ CD-t és $\gamma$ CD-t amilázzal hidrolizálják, az $\alpha$ CD-t tetraklórétánnal csapják le<br>A konverziót membrán reaktorban végzik folyamatos ultraszűréssel<br>Hidrolízis glukoamilázzal, adszorpció erősen savas kation cserélőn, eluálás vízzel | $\alpha$ CD<br>$\beta$ CD                              | CD+glükózt kezelnek CGT-ázzal   |



| Szerző, ill. szabadalmaz          | Keményítő fajta és koncentráció, % | Előhidrolízis | Komplexáló ágens   | A képződött CD kinyerése   | Főtermék                   | Megjegyzés   |
|-----------------------------------|------------------------------------|---------------|--|--|----------------------------|--|
| Min. Agr. For. (1982) Japán [23]  | burgonya, 20%                      | CGT-áz        |  | Ultraszűrés reverz ozmózis   | keverék                    |  |
| Flaschel et al (1982, 1984) [24]  | burgonya, 10%                      |               | dekanol  |  | $\alpha$ CD                |  |
| Seres et al (1983) [25]           | kukorica, 33%                      | amiláz        | metil-etilketon+ anionos detergens metil-etilketon+ $\alpha$ -naftol | Lecsapás ciklohexánnal<br>Lecsapás metanollal  | $\alpha$ CD<br>$\gamma$ CD |  |
| Japán Maize Prod. Co. (1984) [26] | burgonya, 25%                      | CGT-áz        |  |  |                            | Két különböző CGT-áz enzimet: B. macerans+ B. No. 38-2 alkalmaz, jobb kitermelés |
| Bender et al (1984) [27]          | burgonya, 15%                      |               | brómbenzol   |  | $\gamma$ CD                | Klebsiella pneumoniae CGT-áz   |
| Norin S. Shokuhin (1984) [28]     |                                    |               | kalciumhidroxid-dal csapja le az aciklikus dextrineket               | A szűrletet CO <sub>2</sub> -vel kezeli  |                            | A CD-k elválasztása a lineáris dextrinektől                                      |
| Hashimoto et al (1987) [29]       |                                    |               |  | A konverziót immobilizált enzimmel végzi membrán reaktorban folyamatos ultraszűréssel eltávolítva a képződött terméket | keverék                    |  |
| Sakai et al (1986) [30]           |                                    |               |  | Folyamatos konverziót porózus anioncserélőn immobilizált enzimmel végzi  | keverék                    |  |
| Horikoshi, Kato (1987) [31]       | burgonya, 5%                       |               |  |  | $\gamma$ CD                | Bacillus No. 313 CGT-áz  |
| Nagano et al (1987) [32]          | burgonya                           |               |  |  | $\alpha$ CD                | Bacillus ohbensis CGT-áz   |
| Ammeraal et al (1987) [33]        | kukorica, 35%                      |               | limonén  |  | $\beta$ CD                 |  |
| Schmid et al (1988) [34]          | burgonya                           |               | ciklohexadecenol   |  | $\gamma$ CD                |  |
| Nishida et al (1988) [35]         |                                    |               |  | Adszorpció kémiaiilag modifikált szilikán, azután elució vizes etanollal   |                            |  |
| Ozaki et al (1988) [36]           | burgonya, 15%                      |               | etanol   |  | keverék                    |  |

### A keményítő előhidrolízise

Keményítőt előzetes hidrolízis nélkül csak 5%-ot meg nem haladó koncentrációban lehet alkalmazni a ciklodextrinnel történő konverzióhoz. 5% feletti keményítő tartalmú oldatok retrogradálni kezdenek, azaz a keményítőtől hidrogén kötések létrejötte és konformáció változása következtében oldhatatlan csapadék képződik, amely jelentősen rontja a ciklodextrinkitermelést. Az előhidrolízis a keményítő oldhatóságát, az oldat stabilitását jelentősen fokozza és csökkenti a viszkozitást. A ciklodextrin kitermelés az előhidrolízis mértékének függvényében maximumot mu-

tat. A túlzott hidrolízis már ismét csökkenti a kitermelést. Könnyen előállítható egy 45 g/100 ml-es koncentrációjú keményítő oldat, ha a keményítőt 10 dextróz ekvivalens értékig előhidrolizáljuk, a 2 dextróz ekvivalens értékig hidrolizált keményítőtől csak 20 g/100 ml koncentrációjú oldat állítható elő. Egy 5 dextróz ekvivalens értékig hidrolizált 11 súly% keményítő tartalmú oldatból triklóretilén hozzáadásával 34°C-on a Bacillus macerans CGT-áz enzim hatására 58%-os konverzió érhető el. Ugyanilyen körülmények között a 35 súly% keményítő tartalmú oldatból csak 35%-os kitermelés érhető el. A 8% szárazanyag-tartal-



mat meghaladó kukoricakeményítő oldatból elfogadható ciklodextrin kitermelést csak akkor lehet elérni, ha az oldat viszkozitása nem haladja meg a 4000 cP értéket 70°C-nál.

### Az alfa-: béta-: gamma-ciklodextrin arány szabályozása a konverzió során

Az irodalomban gyakran lehet olvasni olyan törekvésekről, amelyek olyan enzimek előállítását célozzák meg, amelyek csak  $\alpha$ -, vagy csak  $\beta$ -, vagy csak  $\gamma$ -ciklodextrint termelnek. Az ilyen törekvéseknek nincs meg a termodinamikai alapjuk. Az enzim ugyanis csak a biokatalizátor, amely a ciklizálási reakció egyensúlyának az eléréséhez szükséges időt rövidíti le. Az tény, hogy a különböző eredetű enzimek különböző sebességgel termelik a különböző ciklodextrineket és különböző sebességekkel vezetnek el az egyensúlyi állapothoz és így valóban el lehet érni azt, hogy megfelelő enzimmel, megfelelő körülmények között zömmel csak egyik vagy másik ciklodextrin képződjék. Pl. a konverzió első óráiban a *Bacillus macerans* és a *Klebsiella pneumoniae* CGT-áz enzim főként  $\alpha$ -ciklodextrint termel, míg az alkalofil baktérium CGT-áz főképpen  $\beta$ -ciklodextrint. Ha toluolt adunk a konverziós rendszerhez, akkor az a  $\beta$ -ciklodextrinnel oldhatatlan kristályos zárványkomplexet képez, a rendszerből kicsapódik, így a keletkező  $\alpha$ -ciklodextrint az enzim újra felnyitja és átalakítja  $\beta$ -ciklodextrinné. Ily módon a keletkező ciklikus dextrineken belül a  $\beta$ -ciklodextrin több, mint 90%-ban lesz jelen. Ha viszont a konverziót viszonylag hamar leállítjuk, akkor az izolált ciklikus dextrinek között zömmel  $\alpha$ -ciklodextrin lesz megtalálható. 1-dekanol jelenlétében a konverzió viszont 35,9%  $\alpha$ -CD-t és 3,7%  $\beta$ -CD-t eredményezett.

Jelenleg alkalmazott ipari körülmények között toluol jelenlétében a kukoricakeményítőből kb. 49%  $\beta$ - és 1%  $\alpha$ -ciklodextrin keletkezik. A tisztítások és kristályosítás után a  $\beta$ -ciklodextrinre vonatkozó kitermelés átlagosan 33% körül van és ezeknek a termékeknek a tisztasága szárazanyagra vonatkoztatva jobb mint 99,7%. A termékekben sem  $\alpha$ -, sem  $\gamma$ -ciklodextrin nem mutatható ki.

A konverzió mértékét jelentősen befolyásolja az alkalmazott enzim mennyisége is. A konverzió során ugyanis az enzim folyamatosan inaktiválódik. Pl. a ciklodextrin-kitermelés egy 10,2 dextróz ekvivalensre előhidrolizált 40 g/100 ml koncentrációjú keményítőből 45°C-on 90 óra alatt a következő függést mutatta az enzimmennyiségtől:

15 enzim egység/g keményítő 23,7% ciklodextrint  
45 enzim egység/g keményítő 53,1% ciklodextrint  
90 enzim egység/g keményítő 56,2% ciklodextrint eredményezett.

A konverziós idő megnyújtásával ezek a kitermelések még javíthatók, ennek viszont határt szab a gazdaságosság.

### A béta-ciklodextrin konverzió technológiája

Ipari méretekben két eljárást alkalmaznak: komplexáló szer nélküli eljárást, amikor is a nem ciklikus dextrinekké konvertált keményítő dextrineket alkalmas enzimmel (glükamilázzal) lebontják könnyen eltávolítható kis molekulájú cukrokká, vagy pedig komplexáló szert (pl. toluolt) alkalmazva a  $\beta$ -ciklodextrint folyamatosan eltávolítják a rendszerből. A két eljárástípus tehát nem csak a konverziós fázist tekintve, de a keletkezett ciklodextrinek izolálását tekintve is különbözik egymástól.

Tipikus oldószer-nélküli technológia — melyet Japánban alkalmaznak — a következő. 15 súly% burgonya-keményítőt tartalmazó szuszpenzióhoz 10 mmol kalcium-kloridot adnak, ezt a *Bacillus* N° 38-2 CGT-áz enzimjével 85–90°C-on pH 8,5-nél elfolyósítják. Lehűtik 60–65°C-ra, a pH-t kalciumhidroxiddal beállítják 8,5-re, majd hozzáadják a teljes CGT-áz enzim mennyiségét. A konverziót 60°C-nál állandó keverés mellett 30 órán át folytatják, majd az enzimet inaktíválják 100–120°C-ra történő felhevítéssel. A reakcióelegy pH-ját 5,1–5,2-re beállítják és bakteriális eredetű alfa amilázzal a nem ciklizált keményítőt, illetve dextrineket elhidrolizálják. Az oldathoz aktív szenet adnak, szűrik, majd ioncserélő gyantán átvezetve kb. 60 súly% koncentrációig vákuumban bepárolják és a hűlő oldatot oltókristályokkal keverik. A nyers  $\beta$ -ciklodextrint centrifugálják, mossák, majd átkristályosítják. A kitermelés 18–24%. A centrifugából kilépő oldat össz-szárazanyag tartalmának közel 20%-a  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -ciklodextrin keverékéből áll.

Tipikus oldószert alkalmazó technológia a következő. 33 súly% kukorica-keményítőt tartalmazó szuszpenzió pH-ját sósavval és kalcium-hidroxiddal 7,2-re állítják, majd *Bacillus subtilis* alfa amilázzal 80°C-on 10 perc alatt az optimális mértékű viszkozitásig hidrolizálják. Ezt követően az enzimet 120°C-ra történő hevítéssel (30 perc) inaktíválják és 50°C-ra hűtik vissza a rendszert, majd hozzáadják a szükséges CGT-áz enzimet. 30 perc után tovább hűtik 45°C-ra, hozzáadnak 5 térfogatszázalék toluolt és intenzív keverés közben 105 órán át végzik a konverziót. A toluol  $\beta$ -ciklodextrin komplexet szűréssel izolálják, a komplexet mossák, majd vízzel felzagyolva vákuumbepárlóban a toluolt eltávolítják. Aktív szenet kevernek hozzá, szűrik és kristályosítják. Az eljárás hátránya, hogy ppm-es szinten toluol marad a termékben, előnye viszont a jobb kitermelés és az, hogy nyomokban sem tartalmaz kis molekulájú cukrokat. Ezek ugyanis a kémiai feldolgozás során (pl. származékok előállítása) a termék sárgulását eredményezik.

### Alfa-ciklodextrin előállítása

Az  $\alpha$ -ciklodextrin izolálása a komplexáló szert nem tartalmazó konverziós elegyből szektív lecsapással vagy kromatográfiával lehetséges, de ipari termelés céljára túlságosan drága. Mivel az  $\alpha$ -ciklodextrin vízzoldékonysága közel 10-szerese a  $\beta$ -ciklodextrinének,



a konverziós elegyből kristályosítani gyakorlatilag nem lehet. Ezért célszerű az  $\alpha$ -ciklodextrint is komplexáló szer jelenlétében előállítani. Ilyen célra számos anyagot leírtak, pl. vajsavat, vagy vajsav sókat. Tapasztalataink szerint a dekanol a legalkalmasabb, amit könnyű vízgőzzel eltávolítani, továbbá élelmiszerekben 5 ppm-ig minden további nélkül engedélyezett adalékanyag. Az  $\alpha$ -ciklodextrin oldékonysága vízzel telített dekanolban 40°C-on csak a 6,5 mg/ml (dekanol nélkül már szobahőfokon 140 mg/ml körül van). A kitermelés alkalmas körülmények között könnyen eléri az 50%-ot. A dekanol koncentráció növelése növeli a reakció sebességét is. A konverzió-elegyben a  $\beta$ - és a  $\gamma$ -ciklodextrin mennyisége elhanyagolható. Metiletil-keton, és valamilyen anionos detergens pl. nátriumdodecil szulfát, együttesen szintén alkalmas az  $\alpha$ -ciklodextrin kitermelés fokozására, ez esetben az  $\alpha$ -ciklodextrin azonban oldatban marad és a nem konvertált keményítőt, illetve az aciklikus dextrineket alfaamilázzal kell elhidrolizálni, ezt követően az  $\alpha$ -ciklodextrin ciklohexánnal lecsapható. A keményítőre vonatkoztatva így is elérhető 20–25%-os kitermelés.

### Gamma-ciklodextrin előállítása

A legnagyobb méretű gyűrű a  $\gamma$ -ciklodextrin és ennek a legjobb az oldékonysága vízben. Egyes molekulák (pl. a szteroidok) komplexálására éppen a  $\gamma$ -ciklodextrinre lenne szükség, de ezt a legnehezebb előállítani. Részben termodinamikai okok miatt (a gyűrű nagymértékű flexibilitása) ez keletkezik legkisebb mennyiségben, másrészt a nagymértékű vízdoldékonysága következtében (szobahőmérsékleten már 230 mg/ml felett) a kitermelése általában gyenge. A  $\gamma$ -ciklodextrin előállításának egyik lehetősége az, hogy a komplexképző szert nem alkalmazó  $\beta$ -ciklodextrin gyártás anyalúgijából nyerik kie speciális ioncserélő műgyanta oszlopokon történő frakcionált eluálással. Ily módon pl. 750 kg keményítő szárazanyagból 14 kg  $\gamma$ -ciklodextrint lehet előállítani, amelynek tisztasága jobb mint 98,5%.

Jobb kitermelés érhető el, ha az előhidrolizált keményítőt  $\gamma$ -ciklodextrinre specifikus komplexáló szer, pl. metiletilketon és alfa-naftol keverékének jelenlétében konvertáljuk a CGT-áz enzimmal. Ez a két vendégmolekula ún. terner komplexet képez a  $\gamma$ -ciklodextrinnel. Az oldhatatlan  $\gamma$ -ciklodextrin metiletilketon+alfanaftol komplexét metanolban szuszpendálják, így lehet eltávolítani az alfa-naftolt. A metanolos oldatot további ioncserélős és aktív szerves tisztítás után bepárolják, majd vízből kristályosítva a keményítőre vonatkoztatva kb. 20% kitermeléssel nyerhető a  $\gamma$ -ciklodextrin. Leírtak olyan eljárást is, amelynél a komplexáló szer brómbenzol, és ezt egyszerűen desztillálással lehet eltávolítani. A pentaciklikus terpenoidok (glycirrhizin) jelenléte is javítja a  $\gamma$ -ciklodextrin kitermelést. A jelenleg legnagyobb sikerrel kecsegtető eljárás a  $\gamma$ -ciklodextrin ipari gyártására ciklohexadecenolt alkalmaz komplexálásra. Ez a mesterséges moszusz illatanyag, amely szerencsére nem toxikus.

A jövő kétségkívül az immobilizált, géntechnikával módosított, reakciótermékkel nem gátolt enzim alkalmazó eljárásé. A CGT-áz enzim a szokásos módon immobilizálható szilárd polimer hordozókon vagy porózus üvegfelületen. A különböző mikroorganizmusok által termelt CGT-áz enzimek sajátosságai kismértékben különböznek ugyan egymástól, de általában az ipari szempontból kedvező stabilitású enzimek közé tartoznak. Pl. a *Bacillus macerans* eredetű CGT-áz enzimet vízdoldható karbodiimididdel aktiválva az könnyen immobilizálható cellulóz- vagy dextrán-származékokon, illetve akrilsav- vagy akrilamid-kopolimereken. Az immobilizált enzim pH-optimuma 5,5 körül van, és a hőmérsékleti optimum 40–60°C között található, míg a szabad enzimnek egy viszonylag éles aktivitás csúcsa van 60°C körül. Az enzim felezési ideje minden pH-értéknél és hőmérsékletnél megjavult az immobilizálás következtében. Míg pl. az oldható enzim felezési ideje 70°C-on, 5,9 pH-nál csak 1 perc, az immobilizált enzimé 24,3 perc.

Ipari ciklodextrin termelésben ma még nem alkalmaznak immobilizált enzimágyas reaktorokat. Természetesen ilyen esetben a feldolgozási technológiának is módosulnia kell. A kutatás irányai arra mutatnak, hogy a konverziós elegyből specifikus komplexképző adszorbensekkel kötik meg a megfelelő ciklodextrineket (más-más típusú immobilizált komplexképző ágenset tartalmazó polimerek lesznek szükségesek az  $\alpha$ -, a  $\beta$ -, illetve  $\gamma$ -ciklodextrinhez). Az ilyen adszorbensekről aztán a ciklodextrin egyszerűen vízzel eluálható, így módon elkerülhető lesz a szerves oldószerek alkalmazása.

### „Elágazó”-ciklodextrinek és egyéb ciklodextrin származékok

A ciklodextrinek gyártásánál — a keményítőben előforduló alfa-1,6-elágazási pontok következtében — mindenképpen keletkezik ún. „elágazó” ciklodextrin is. Ez azt jelenti, hogy a ciklodextrin-gyűrűn a primer hidroxilos oldalhoz alfa-1,6 kötéssel glükóz, maltóz, esetleg maltotrióz egység (vagy akár több egység) csatlakozik. Az ilyen ciklodextrinek csak tiszta állapotban lennének kristályosíthatók, de mivel általában több ilyen „elágazó” ciklodextrin is keletkezik, gyakorlatilag ezeket nem lehet kristályosítani. Vízdoldékonyságuk sokkal nagyobb, mint az eredeti, nem szubsztituált ciklodextrinekké. Ezeknek kémiai szintézissel történő előállítása leírt, de ez gyakorlati célokra rendkívül drága lenne. Az elágazó kötéseket létrehozó pullulanáz enzim alkalmazásával ciklodextrinből és maltózból vagy glükózból előállíthatók olyan keverékek, melyekben kb. 50% az elágazó ciklodextrinek aránya, a maradék pedig nem szubsztituált ciklodextrin. Ilyen terméket Japánban már gyártanak, mivel ezeknek jobb a vízdoldékonysága és a glükózzal, illetve maltózzal történő szubsztitúció nem vethet fel semmilyen toxikológiai problémát.



A ciklodextrin-származékok közül több száznak az előállítását és sajátosságait írták le, iparilag azonban — éppen az ára miatt — jelenleg még csak a béta-ciklodextrinnek ( $\beta$ -CD) gyártják iparilag néhány származékát, metilezett és a hidroxialkilezett  $\beta$ -CD-eket. Kis mennyiségekben, pl. kromatográfias célokra használnak peracetil  $\beta$ -CD-t vagy perpentilezett CD-t is, de ezek nem ipari termékek.

A hidroxipropil- $\beta$ -ciklodextrin bevezetése az injekciógyártásban küszöbön áll. Vízben oldhatatlan hatóanyagokból lehet vizes, injektálható oldatokat készíteni segítségével, és ez a származék minden eddig alkalmazott szolubilizáló szernél kevésbé toxikus. Jelenleg (1989) több hidroxipropil- $\beta$ -ciklodextrinnel készült parenterális készítmény a klinikai vizsgálatok végső fázisában van.

Figyelembe véve valamennyi ciklodextrint és származékaikat, az prognosztizálható, hogy 1987-től 1995-ig évente megduplázódik a ciklodextrin piac és eléri a 10 ezer tonnát, illetve 100 millió USD nagyságrendet.

### Általánosítható következtetések a ciklodextrinek gyártására

A rendkívül terjedelmes irodalomból és saját tapasztalatainkból az alábbi általános következtetések vonhatók le a ciklodextrin-gyártásra vonatkozólag:

1. Ha az enzim konverziót magasabb szubsztrát (keményítő) koncentrációnál végezzük, akkor alacsonyabbak a műveleti költségek, de ugyanakkor csökken a ciklodextrin-kitermelés is. Az optimális keményítő koncentráció (30% körül), ezért több tényező közti kompromisszum következménye.
2. Ha nagyobb keményítő-koncentrációnál dolgozunk, a viszkozitást csökkenteni kell, vagy részleges előhidrolízissel (alfa-amilázzal, az alkalmazott CGT-áz enzim egy részével, vagy savakkal) vagy pedig mechanikailag kell a gélstruktúrát dezintegrálni, pl. injektoron átvezetve a forró, nagy viszkozitású oldatot, hirtelen nyomáseséssel.
3. A CGT-áz enzim mind a három alap ciklodextrint (és néhány %-os mennyiségben elágazó ciklodextrineket is) termeli. Ezek aránya a konverziós időtől, az alkalmazott enzimtől függ, de erősen befolyásolható a reakció körülményekkel, különösképpen, ha komplexképző ágenst adunk a rendszerhez.
4. Ha nem alkalmazunk szerves komplexképző szert, akkor ciklodextrinek és lineáris dextrinek keverékét kapjuk, amelyből a kristályos  $\beta$ -ciklodextrin csak viszonylag alacsony kitermeléssel állítható elő, tipikus ipari körülmények között (20% feletti keményítő-koncentráció) a keményítőnek kevesebb mint 20%-a nyerhető ki kristályos  $\beta$ -ciklodextrinként. Itt további problémát okoz a nagy mennyiségű melléktermék, amely jelentős mennyiségű, nem kristályosítható ciklodextrint is tartalmaz.
5. A komplexképző szer nélkül előállított konverziós elegyből laboratóriumi körülmények között kromatográfias eljárással elő lehet állítani a tiszta ciklo-

dextrineket, de ipari körülmények között ez nem lehet gazdaságos.

6. Döntő mértékben csak egyik vagy másik ciklodextrint termelni, csak megfelelő komplexáló szer alkalmazásával lehetséges.
7. Ha szerves komplexáló szert alkalmazunk a ciklodextrin-kitermelés fokozásához, nagyon gondos komplexáló szermaradvány analitikára van szükség. A komplexáló szerek maradéka a ciklodextrinben ppm vagy ppb nagyságrendű lehet csak.
8. Az elágazásokat bontó enzim (pullulanáz) alkalmazása a ciklodextrin kitermelését 4–6%-kal megjavítja. Az amilopektinben alfa-1,6 kötések ugyanis blokkolják a CGT-áz enzim hatását, ezeket a kötések bontja a pullulanáz (vagy alkalmas körülmények között ezeket hozza létre és így is képződnek elágazó ciklodextrinek).
9. A glükóz és maltóz együttes mennyisége a reakciókeverékben nem haladhatja meg a keményítő-tartalom 5%-át. Amíg a glükóz és maltóz mennyisége ezen határ alatt van a konverziós elegyben, a ciklodextrin kitermelést a többi tényező határozzák meg. Pl. 30–70% közötti konverzió elérhető el különböző reakció-körülmények között, de ha a glükóz és maltóz együttes mennyisége a 20%-ot meghaladja, akkor a ciklodextrin konverzió kb. 15%-ra csökken.

A kézirat beérkezett: 1989. júl. 18.

### IRODALOM

- [1] Armbruster, F. C. — Kooi, E. R. (Corn Prod. Co.): US Pat. 3, 425, 910, Ger. Offen. 1, 643, 815 (1969).
- [2] Armbruster, F. C. (Corn Prod. Co.): US Pat. 3, 541, 077.
- [3] Hitaka, H. — Sawata, M. — Yano, S. (Mitsutani Chem. Ind. Co.): Jpn. Kokai 71, 09, 223 (1972) C. A. 76:32882.
- [4] Armbruster, F. C. — Jacaway, W. A.: US Pat. 3, 640, 847 (1972).
- [5] Okada, S. — Tsujama, M. (Hayashibara Biochem. Lab.): Jpn. Kokai 73, 40, 996; Fr. Demande 2, 154, 396, US Pat. 3, 812, 011 (1973) C. A. 79:113990.
- [6] Sato, M. — Nakamura, N. (Japan Food Proc. Co.): Jpn. Kokai 74, 92, 288 (1974) C. A. 84:119962.
- [7] Horikoshi, K. — Yoshida, K. (Inst. Phys. Chem. Res.): Jpn. Kokai 74, 117, 691 (1974) C. A. 82:153799. Horikoshi, K. (Rikagaku Kenkyusho): US Pat. 3, 923, 598 (1975).
- [8] Suzuki, Y. — Shima, A. — Kochi, T. — Kato, T. — Misawa, F. — Okimoto, M. — Saito, N. (Teijin): Ger. Offen. 2, 532, 051, Jpn. Kokai 76, 12, 941 (1975) C. A. 84:162908.
- [9] Yoritomi, K. — Yoshida, T.: Jpn. Kokai 76, 136, 889 (1975) C. A. 86:137968.
- [10] National Inst. of Food Res. Jpn. Kokai 77, 08, 385 (1977). Suzuki, S. — Kobayashi, S. — Kainuma, K.: Jpn. Kokai, 77, 38, 038 (1977) C. A. 87:20639.
- [11] Kawano, M. — Matsuzawa, M. — Nakamura, N. — Hara, K. (Japan Maize Prod.): Jpn. Kokai 77, 25, 043 (1977) C. A. 86:153972.
- [12] Kobayashi, S. — Kainuma, K. — Suzuki, S. (Nat. Inst. Food Res.): Jpn. Kokai 77, 79, 039 (1977) C. A. 87:150201.
- [13] Horikoshi, K. — Nakamura, N. — Matsuzawa, M. (Inst. Phys. Chem. Res.): Jpn. Kokai 78, 52, 693 (1978) C. A. 89:147188. Rikagaku Kenkyusho: Jpn. Kokai 78, 52, 693 (1978).
- [14] Horikoshi, K. — Nakamura, N. (Inst. Phys. Chem. Res.): US Pat. 4, 135, 977 (1979) C. A. 90:136264.
- [15] Vakaliu, H. — Miskolczi-Török, M. — Szejtli, J. — Járasi, M. — Seres, G.: Hung. Patent 16, 098 (1979) C. A. 91:91923.



- [16] *Inst. Phys. Chem. Res., Japan Maize Prod. Co.*: Belg. Pat. 883, 579 (1980) C. A. 94:49121.
- [17] *Toyo Jozo Co.*: Jpn. Kokai 80, 156, 595 (1980) C. A. 94:172894.
- [18] *Kobayashi, S. — Kainuma, K. — Tsumura, S. (Nat. Inst. Food Res.)*: Jpn. Kokai 80, 19, 013 (1980) C. A. 93:44384.
- [19] *Yagi, Y. — Kouno, K. — Inui, T. (Sanraku-Ocean Co.)*: Eur. Pat. Appl. 17, 242 (1980) C. A. 94:45606.
- [20] *Japan Maize Prod. Co.*: Jpn. Kokai 80, 102, 396 (1980) C. A. 93:219321.
- [21] *Hokse, H. — Kaper, F. S. — Wijpkema, J. T. (Avebe)*: Netherlands Appl. NL 81, 04, 410 (1981) C. A. 99:20925.
- [22] *Horikoshi, K. — Yamamoto, M. — Nakamura, N. — Okada, M. — Matsuzawa, M. — Ueshima, O. — Nakakuki, T. (Inst. Phys. Chem. Res. Jpn. Maize Prod. Co.)*: Eur. Pat. Appl. EP 45, 464 (1982) C. A. 96:144856.
- [23] *Ministry of Agric. Forestry and Fishery, Food Res. Inst.*: Jpn. Kokai 82, 202, 298 (1982) C. A. 98:141869.
- [24] *Flaschel, E. — Lander, J. P. — Renken, A.*: Proc. 1st Inst. Symp. Cyclodextrins (Ed.: J. Szejtli) Reidel, Dordrecht p. 41 (1982).  
*Flaschel, E. — Landert, J. P. — Speisser, D. — Renken, A.*: Ann. N. Y. Acad. Sci. 434 70 (1984) C. A. 102:111355.
- [25] *Seres, G. — Járny, M. — Piukovich, S. — Szigetváry-Gabányi, M. — Szejtli, J.*: Hung. Pat. Appl. 4406/83 (1983).
- [26] *Japan Maize Prod. Co.*: Jpn. Kokai 80, 102, 396 (1980) C. A. 93:219321.
- [27] *Bender, H. (Consortium Elektrochem. Ind.)*: Ger. Offenl. 3, 317, 064 (1984) C. A. 102:26775.
- [28] *Norin Suisansho Shokuhin Co.*: Jpn. Kokai 84, 18, 702 (1984) C. A. 101:40171.
- [29] *Hashimoto, H. — Hara, K. — Kobayashi, S. — Kainuma, K.*: Jpn. Kokai 87, 104, 580 (1987) C. A. 107:174810.
- [30] *Sakai, S. — Yamamoto, N. — Hashimoto, H. — Hara, K.*: Jpn. Kokai, 86, 185, 196 (1986) C. A. 105:224630.
- [31] *Horikoshi, H. — Kato, T.*: Jpn. Kokai 87, 25, 976 C. A. 107:54766.
- [32] *Nagano, H. — Sato, M. — Yagi, Y. — Nomura, H. — Matsuoka, H. — Osada, T.*: Jpn. Kokai, 87, 11, 071 C. A. 107:5579.
- [33] *Ammeraal, R. N.*: Deutsche Offenl., D. E. 3, 716, 509A1 (1987).
- [34] *Schmid, G. — Huber, O. S. — Eberle, H. J.*: Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins (Huber O. és Szejtli J.) Kluwer Academic Publ., Dordrecht, 1988, p. 87.
- [35] *Nishida, K. — Takahashi, C. — Kawaguchi, T.*: Jpn. Kokai 88, 154, 701, C. A. 109:172465, és Jpn. Kokai 88, 154, 701 C. A. 109:172466.
- [36] *Ozaki, A.*: Jpn. Kokai 88, 133, 998 (1988) C. A. 110:37811.

## Könyvismertetés

### Chromatography '87

(Szerk.: *Kalász H. és Ettre L.S.*), megjelent a Symposia Biologica Hungarica sorozat 37. köteteként 1988-ban az Akadémiai Kiadó (Budapest) kiadásában, ISBN 963 05 44946.

A kötet összesen 539 oldalon (+ 11 oldal bevezetés és tartalomjegyzék) adja közre az 1986-ban Balatonszéplakon és 1987-ben Budapesten tartott kromatográfiai kongresszusokon elhangzott előadások egy részéből készült közleményeket. A balatonszéplaki kongresszus (Advances in Liquid Chromatography) szempontjából tehát meglehetősen lassan jelent meg a könyv, míg a budapesti találkozó (Budapest Chromatography Conference) anyaga hazai nyomtatási lehetőségekhez képest gyorsan öltött nyomtatott formát.

A könyv a szerzők (első szerzők) vezetéknevének ABC sorrendjébe rendezte a közleményeket, egyetlen cikk, a bevezető közlemény kivételével. La-

font közleménye, mely az első kötetben a nyomtatás (gépelés) betűivel is elüt — valamint a kötet többi közleményével ellentétben ez a cikk egy általános áttekintést ad, nemcsak az „edysteroid” vegyületek kromatográfiai viselkedését, hanem metabolizmusát is áttekinti.

Metabolizmus tanulmányozással több közlemény foglalkozik. *Biacs* és munkatársai szerves savakat, cukrokat és festékanyagot vizsgáltak paradicsomban. *Danck* és munkatársai az ipsapirone metabolizmusát vizsgálták (patkányon), *Hoogmartens* et al. tetraciklin származékokat és metabolitokat analizáltak HPLC-vel, *Kalász* és munkatársai az antitumor hatású anyagok által előidézett metabolikus változásokat vizsgálták, *Werner* és munkatársai nukleotidok komplex metabolizmusát tanulmányozták. *Urbán-Szabó* és munkatársai indomethacint határozták meg szérumból, *Pálosi-Szánthó* és munkatársai hidroklorotiazidot ele-

meztek, *Kobylnska-Luczkó* és munkatársai fenotazol-hidrokromidot analizáltak, *Kalambet* és munkatársai DNS-fehérje kötési állandót mértek, *Fellegvári* és munkatársai benzodiazepin izomereket választottak el HPLC-vel. *Bogarski* a királis elválasztás jelen lehetőségét tekinti át, *Corradini* és munkatársai a HPLC során bekövetkező konformációs változásokat tárgyalja, míg *Fürst* (társszerzőkkel írt) két cikke aminosavak és peptidok HPLC-jével és izotacho-forézisével foglalkozik.

Új álló fázis a kitin, melyről *Rozylo* és munkatársai írnak, *Szabó* és munkatársai a diol- és fenil-álló fázisok alkalmazását részletezik.

Az összesen 44 közleményt tartalmazó kötet hasznos olvasmányt jelent kromatográfiai alkalmazó, felhasználó vagy továbbfejlesztő vegyészeknek, biológusoknak, orvosoknak. A könyv beszerzése könyvtáraknak, kutatóintézeteknek melegen javasolható.

*Dr. Matkovic Béla*