

1. MIKROBIÁLIS POLISZACHARIDOK GYÁRTÁSA

1.1. Általános bevezetés

A nagy mennyiségben rendelkezésre álló növényi poliszacharidokat már régóta alkalmazzák a háziipar és az ipar területén (keményítő, cellulóz, agar-agar, alginát, pektin, inulin, karragén, guar gumi, módosított keményítő, gabonaglükánok, gumiarábikum stb.). A növényi forrásokból izolált poliszacharidokkal összehasonlítva a hasonló célokra is felhasznált mikrobiális poliszacharidok előnye, hogy a gyártás nagy volumenben, viszonylag kis terület- és időigénnyel, jól szabályozottan megoldható. A termék állandó minőségű, a piaci igényeknek megfelelően állítható elő, szemben a növényi eredetű termékekkel, amelyek termelése a tenyésztéstől, évszaktól, időjárástól függ és kémiai jellemzői sem állandóak.

A növényi alapú hidrokolloidokkal összehasonlítva fermentált anyagok előnye, hogy a termelés időigénye rövidebb, a több hónapos tenyésztővel szemben csak néhány nap, és nem foglal el mezőgazdasági területeket. Ezzel együtt a termelési költség a döntő tényező, amely meghatározza a mikrobiális eredetű anyagok elterjedését. A költségek meghatározó elemei a szubsztrát ára, valamint a (nagy méretű) fermentor beruházása és üzemeltetése.

Számos érdekes tulajdonságokkal rendelkező, jól alkalmazható biopolimert fedeztek fel és vizsgáltak meg laboratóriumban, de mégis csak néhány vált nagy léptékben gyártott terméké. Ennek okai többfélék, de elsősorban a gyártási nehézségek teszik gazdaságtalanná a termelést. A magas termelési költségek, az alacsony poliszacharid hozamok, melléktermékek képződése és a feldolgozási műveletek (downstream) bonyolultsága egyaránt problémát jelentenek. Ezek megfelelő mérnöki optimalizálással csökkenthetők. Ehhez a folyamat mélyebb megértésére (process understanding) van szükség, mind a mikrobiális fiziológia, mind a bioszintézis és genetika, mind az upstream és downstream műveletek területén.

Gondot okozhat, hogy a termelő törzs gyakran többféle poliszacharidot is termel párhuzamosan, illetve az egyes termékek sem homogének, móltömegük és elágazási fokuk nem egységes. Ez a törzs tulajdonságain túl a tápoldat összetételétől, a fermentációs körülményektől és a tisztítási lépések hatásosságától is függ.

Egyes mikrobiális poliszacharidok közvetlenül helyettesíthetik a növényi (pl. guar gumi, gumiarábikum vagy pektin) vagy alga eredetű (pl. karragén vagy alginát) anyagokat. Mások viszont speciális egyedi tulajdonságaikkal újabb alkalmazási lehetőséget teremtettek. Azok váltak iparilag fontos terméké, amelyek kitűntek kedvező reológiai tulajdonságaikkal, vagy helyettesítettek valamilyen nehezen vagy korlátozottan hozzáférhető anyagot. Több, eredetileg összetett élőlényekből kivont poliszacharid termelését is megoldották már mikrobákkal. Így gyártanak már mikrobiális cellulózt, alginátot, hialuronsavat, sőt heparint is.

A hidrokolloidok globális piacát a mikrobiális polimerek növekvő aránya ellenére még a növényi- és alga eredetű poliszacharidok (pl. keményítő, galaktomannánok, pektin, karragén és alginát) dominálják. Az összes piaci forgalomból a xantán, a legjelentősebb fermentált anyag is csak 6%-kal részesedik.

A mikrobiális poliszacharidok vagy extracelluláris vegyületek vagy a sejthez kötött anyagok. Lehetnek elsődleges (pl. sejtfal biopolimerek) vagy másodlagos anyagcseretermékek. Funkciójuk többféle lehet. Egy részük a sejtfal alkotórésze (mint például a gombák β -glukánjai), vagy tartalék tápanyag (mint például a poli-hidroxibutirát), vagy a kiszáradás ellen védő nyálkaanyag. Alkothatnak külső nyálkás réteget, ami valamilyen felületre ragasztja a sejtet (mint például xantán és gellán) vagy képezhetnek merev kapszulát, ami megvédi a sejtet a kedvezőtlen körülmények (pl. szélsőséges pH, kiszáradás, oxigén stressz, antibiotikumok, fagociták) hatásai ellen.

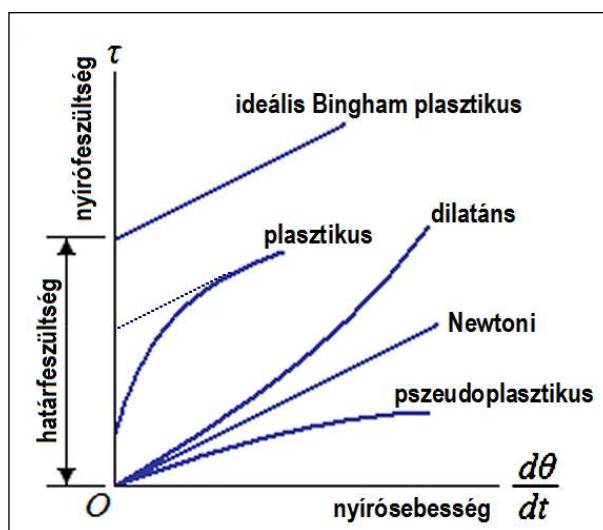
Sokuk természetes összetevő az élelmiszereinkben (pl. az ehető gombákban vagy a sör-élesztőben), másokat évtizedek óta adalékként használnak az élelmiszeriparban, valamint a gyógyszerekben, kozmetikai és egyéb ipari területeken, az olajiparban, a biológiailag lebomló műanyagokban.

1.1.1. Tulajdonságok

1.1.1.1. Reológiai tulajdonságok

A poliszacharidok használata vizes oldataik érdekes reológiai tulajdonságain alapul. Egyesek viszonylag kis koncentrációban is gélt képeznek, amit sok területen fel lehet használni. Mások nagy viszkozitásukkal és nem-newtoni viselkedésükkel tűnnek ki. Az időtől független reológiai alaptípusokat mutatja be a 1. ábra. A newtoni folyadékok folyásgörbéje az origóból induló egyenes, meredeksége a dinamikai viszkozitás.

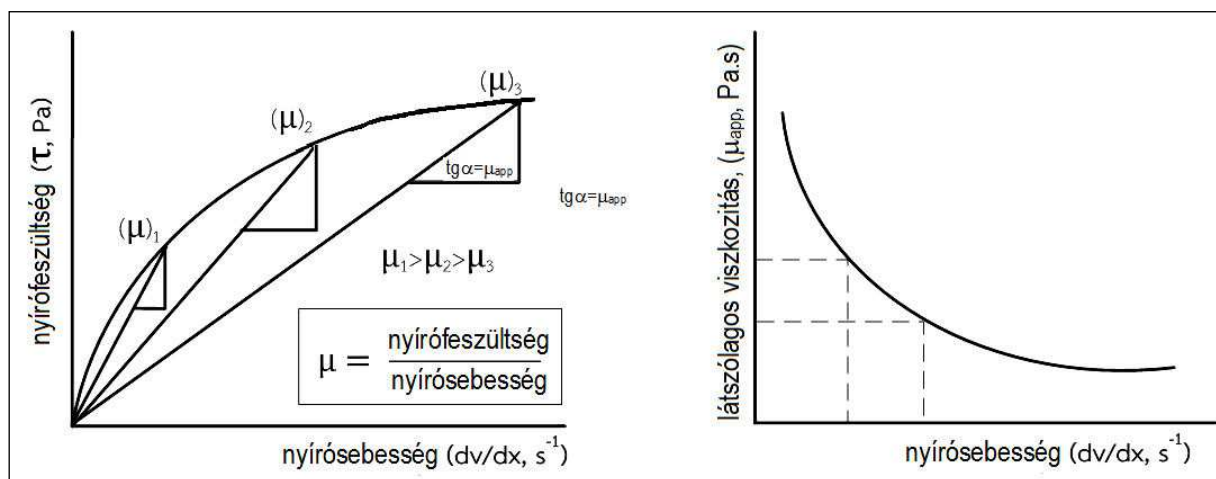
A poliszacharid oldatok általában pszeudoplasztikus viselkedésűek, ami leegyszerűsítve



1. ábra A reológiai folyásgörbék alaptípusai

azt jelenti, hogy az oldat kis nyírósebességnél nagy viszkozitású, nagy nyírósebességnél viszont kis viszkozitást mutat. Az kapcsolat hatványfüggvénnyel írható le: Newtoni fluidum esetén n értéke 1, pszeudoplasztikus esetben egynél kisebb, dilatáns esetben egynél nagyobb.

A látszólagos viszkozitást egy adott pontban úgy értelmezzük, hogy az adott ponthoz



2. ábra A látszólagos viszkozitás értelmezése pszeudoplasztikus fluidumnál

tartozó feszültség és sebesség adatok hányadosát képezzük. Grafikusán ez az origóból az adott pontba húzott egyenes meredekségeként olvasható le (2. ábra). (Nem tévesztendő össze az aktuális viszkozitással, ami az adott pontban a görbéhez húzott érintő meredeksége.)

$$\tau = \dot{\gamma}^n$$

1.1.1.2. A poliszacharidok szerkezete:

A szacharidok gyűjtőnévbe sokféle cukor fér bele, a leggyakoribbak a glükóz, fruktóz, és a mannóz. Emellett jellemzőek a cukorsavak is, sokféle cukorból levezethető -on-savak és -uron-savak is előfordulnak. Ezek viselkedése az anionos csoportok miatt pH-függő. A cukrok -OH csoportjaihoz szerves savak kapcsolódhatnak (ecetsav, piroszőlősav, glicerinsav, borostyánkősav) észter vagy ketál formában.

Az alkotó elemek fajtái szerint megkülönböztethetünk homo- és hetero-poliszacharidokat. A homopoliszacharidok egyféle monoszacharid egységből épülnek fel, például a dextrán, a pullulán, a szkleroglükán, a kurdlán glükóz homopolimerek, eltérő kötésekkel. A xantán és a (mikrobiális) alginát többféle cukorból álló, ismétlődő egységeket tartalmaz.

EPS	Alkotó komponensek	Töltés	Molekulatömeg	Főbb tulajdonságok	Alkalmazási területek	Piac (tonna/év)	Piac (US\$)	Ár (US\$/kg)
Xantán	Glükóz Mannóz Glükuronsav Acetát Piruvát	Anionos	$(2.0-50) \times 10^6$	Hidrokolloid - Nagy viszkozitás kis koncentrációban és kis nyírósebességnél is; - Stabilitás széles pH, sókoncentráció és hőmérséklet tartományban	Élelmiszerek Olajipar Gyógyszerek Kozmetikumok és testápoló cikkek Mezőgazdaság	96 000	235 millió	3 - 5
Gellán	Glükóz Ramnóz Glükuronsav Acetát Glicerát	Anionos	5.0×10^5	Hidrokolloid - Stabilitás széles pH tartományban Gélesítő kapacitás Termoreverzibilis gélek	Élelmiszerek Állateledel Gyógyszerek Kutatás: agar helyettesítő és elektroforézis gél	N.A.	15 millió	55-66
Alginát	Guluronsav Mannuronsav Acetát	Anionos	$(0.3-1.3) \times 10^6$	Hidrokolloid Gélesítő kapacitás Filmképzés	Élelmiszerek Hidrokolloid Orvosi: - Sebészeti kötszerek - Sebkezelés - Szabályozott gyógyszer bevitel	30 000	N.A.	5-20
Cellulóz	Glükóz	Neutrális	10^6	Kristályos szerkezet Oldhatatlan a legtöbb oldószerben Nagy szakítószilárdság Formázható	Élelmiszerek (emészthetetlen rost) Orvosi: - Sebkezelés - Véredények - Hangszóró membránok	N.A.	N.A.	5.8-12
Dextrán	Glükóz	Neutrális	$10^6 - 10^9$	Nem-ionos Newtoni folyadékként viselkedik	Élelmiszerek Orvosi: Vérplazma pótló Kromatográfiai töltet	2 000	N.A.	N.A.

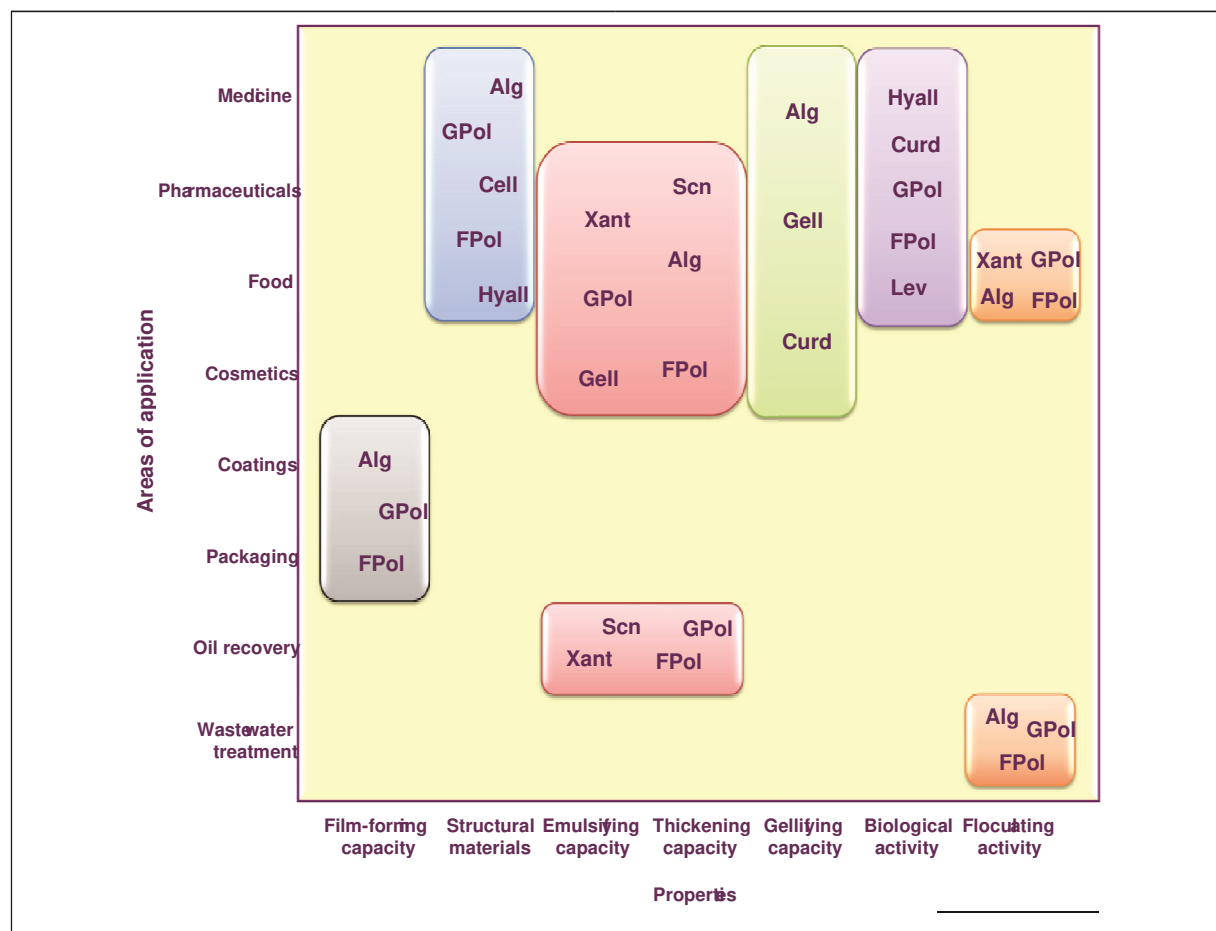
Kurdlán	Glükóz	Neutrális	$5 \times 10^4 - 2 \times 10^6$	Gélképző Vízben oldhatatlan Ehető és nem toxikus Biológiailag aktív	Élelmiszerek Gyógyszeripar Nehézfémek eltávolítása Beton adalék	N.A.	N.A.	55
Hialuronsav	Glükuronsav Acetil- glükózamin	Anionos	2.0×10^6	Biológiailag aktív Erősen hidrofil Biokompatibilis	Orvosi Táptalaj gél	N.A.	1 000 millió	100 000
Szukcino- glikán	Glükóz Galaktóz Acetát Piruvát Szukcinát 3-hidroxi- butirát	Anionos	LMW < 5×10^3 HMW > 1×10^6	Pszudoplasztikus viszkozitás szabályozó Savtűrő	Élelmiszerek Olajkinyerés	N.A.	N.A.	N.A.
Leván	Fruktóz	Neutrális	3.0×10^6	Kis viszkozitás Jó vízoldhatóság Biológiailag aktív: - Antitumor aktivitás - Gyulladáscsökkentő Jól tapad Filmképzés	Élelmiszerek (prebiotikumok) Takarmány Gyógyszerek Kozmetikumok Egyéb ipar	N.A.	N.A.	N.A.

1. táblázat A legismertebb mikrobiális poliszacharidok: a fizikai-kémiai és funkcionális tulajdonságok, a fő alkalmazási területek és a piaci adatok áttekintése

1.1.1.3. **Funkcionális tulajdonságok és alkalmazások**

A molekulák vizes oldatban sokféleképpen rendeződhetnek el és ez meghatározza tulajdonságaikat és ipari alkalmazhatóságukat. Jó példa erre a gellán és xantán különböző viselkedése. Mindkettő negatív töltésű heteropoliszacharid, de más a polimer összetétele és szerkezete. A lineáris gellán molekulák magasabb hőmérsékleten rendezetlen tekercest alkotnak, de lehűtve kettős spirál formába mennek át. Nagyobb koncentrációban ezek vastagabb rúd-szerű aggregátumokká alakulnak át és makroszkopikus gélt képeznek. A kialakuló gél tulajdonságai az acilcsoportok jelenlététől függenek: az acilezett forma rugalmas és hőálló zselét ad, míg a dezacilált anyagból merev, kemény gél lesz. Ennek megfelelően a gellánt több iparágban is gélesítő adalékként használják (1. táblázat). A xantán viszont elágazó láncú, és bár alkot kettős spirált, de nem hoz létre gélstruktúrát. Ehelyett az összefonódott polimer láncok nagyon viszkózus oldatot eredményeznek. Így a xantánt viszkozitás-fokozóként alkalmazzák (1. Táblázat).

Az egyes polimerek tulajdonságai drámaian megváltoztathatók a más biopolimerek hozzákeverésével. Jól ismert példa a galaktomannánok (pl. szentjánoskenyérmag, locust bean gum) összekeverése xantánnal, ami az előbbiekkal ellentétben gélstruktúra kialakulásához vezet.



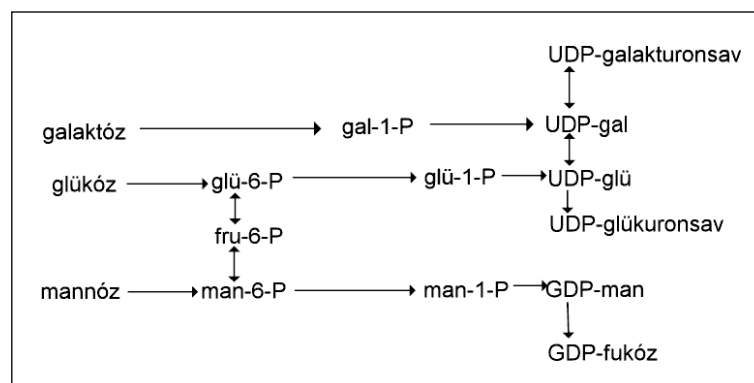
3. ábra A poliszacharidok tulajdonságai és alkalmazási területei közötti összefüggések. Rövidítések: Alg = bakteriális alginát; Curd = kurdlán; Fpol = FucoPol; Gell = gellán; Gpol = GalactoPol; Hyall = hialuronsav; Lev = leván; Scn = szukcinoglikán; Xant = xantán.

Ezen túlmenően a kémiai átalakítások is jelentősen megváltoztathatják a funkcionális tulajdonságokat. A savcsoportok eltávolítása, keresztkötések létrehozása, kovalens kötések más biopolimerekkel mind javíthatják a polimerek tulajdonságait.

A poliszacharidokat nem-newtoni viselkedésük és a nagy viszkozitásuk miatt már széles körben használják értékes termékek (élelmiszer-, gyógyszer-, és kozmetikai ipar) gyártásánál, legtöbbször töltő-, stabilizáló-, kötő- és szerkezetjavító adalékként (3. ábra), (1. táblázat). Az élelmiszeripari termékekben alkalmazott anyagoknak kompatibilisnek kell lenniük az élelmiszer-összetevőkkel és az előforduló sokféle pH és ionerősség mellett is meg kell tartaniuk kedvező tulajdonságaikat.

1.1.2. 3. A poliszacharidok bioszintézise

A poliszacharidok bioszintézisének a sejtek belsejében lévő monoszacharidok előbb foszfo-nukleotiddá alakulnak át (pl. UDP-, TDP-, GDP-cukor), amelyek azután a sejtmembránba kötött lipid templát molekulákra teszik át a cukrokat. A glükóz polimereknél elsőként a glikolízis köztiterméke, a glükóz-6-foszfát alakul át glükóz-1-foszfáttá és ez kapcsolódik a nukleotidokhoz (4. ábra).



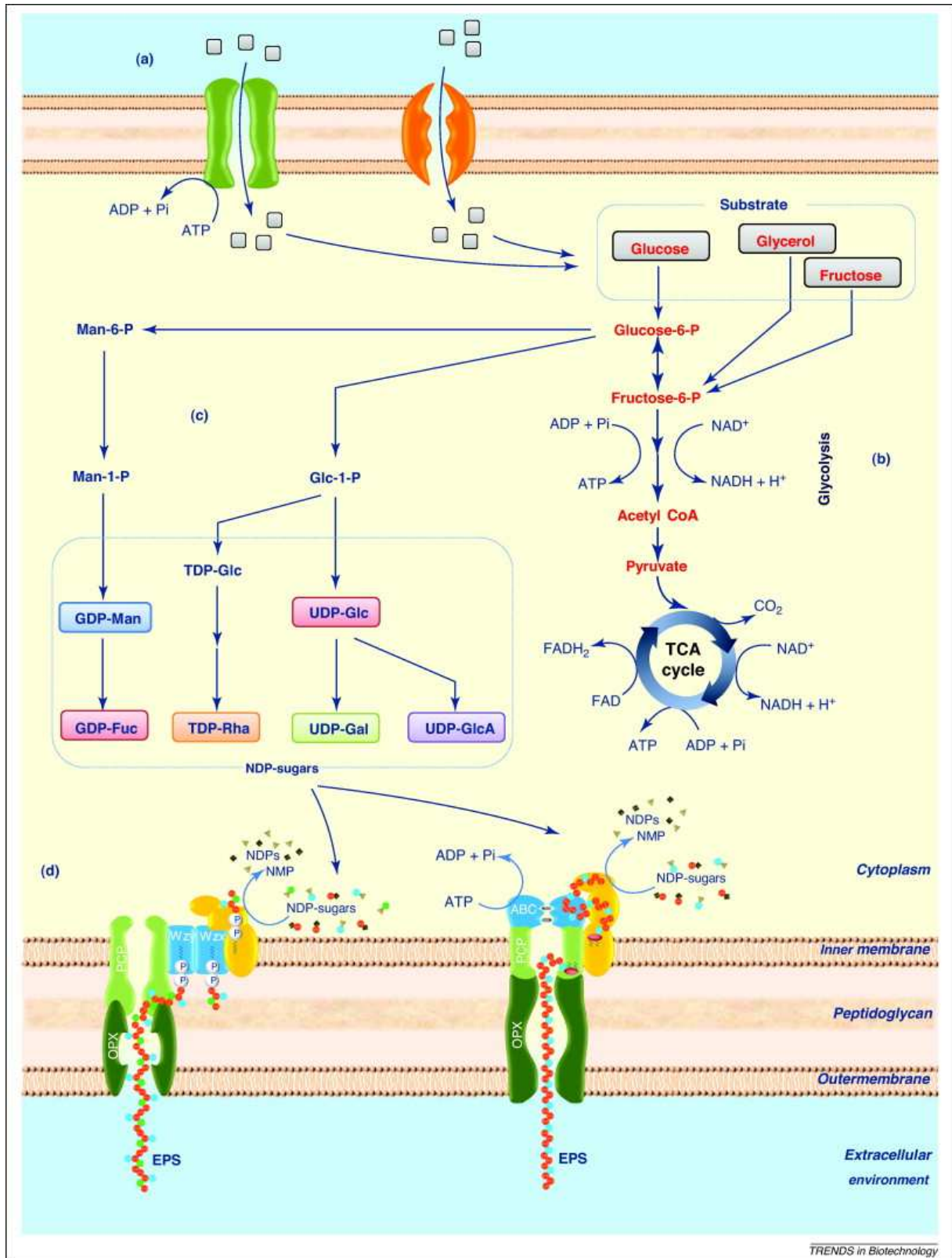
4. ábra A nukleotid-cukrok kialakulása

A sejtfa poliszacharidok és számos exopoliszacharid részben vagy teljesen intracellulárisan, a sejten belül alakul ki, de például a dextrans, levánt, alternánt a sejt felszínén lévő enzimek szintetizálják.

A részlegesen intracelluláris exopoliszacharid-szintézisben a lipid karrerek is jelentős szerepet játszanak. Ezek hosszú szénláncú foszforsav-észterek és izoprenoid alkoholok, amelyek apoláris láncukkal a sejtmembrán lipidrétegében rögzülnek. A foszfát csoportok kezdetben befelé állnak és ezen szerelődnek össze a polimer részegységei. A továbbiakban ezek átfordulnak a membrán külső oldalára, és ott következik be a polimerizáció (5. ábra).

Néhány speciális esetben az általános mechanizmustól eltérően a polimerizáció a membrán belső oldalán zajlik, és az egész láncot viszik ki a sejtől a lipid hordozóhoz kapcsolt exportőr fehérjék.

A komplex heteropoliszacharidok, mint például a xantán és a gellán bioszintézis útja rendszerint bonyolultabb, több lépésből áll, mint a homopoliszacharidoké.



5. ábra A poliszacharidok bioszintézise

1.1.3. 4. Termelő törzsek

A poliszacharid képzés általánosnak mondható minden nagyobb rendszertani egységben. A termelő baktériumtörzsek mellett ott vannak az élesztők (BYG = bakers yeast glucan), a fonalas gombák (pullulán, szkleroglükánok), sőt a kalapos gombák is (shii-take – lentinán).

A legtöbb mikroorganizmus termel felületi poliszacharidokat, de néhányuk stresszes állapotban képes nagyobb mennyiséget (>40 g/l) is előállítani.

A mai napig, csak néhány bakteriális poliszacharid vált ipari terméké, ezeket a 2. táblázat foglalja össze. A közeli rokonságban álló fajok bioszintetikus útjai hasonlóak, ezért a termelt poliszacharidok szerkezete és tulajdonságai is hasonlóak.

<i>Termelő törzs</i>	<i>Poliszacharid</i>
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Szukcinoglikán
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Szukcinoglikán
<i>Rhizobium meliloti</i>	Szukcinoglikán
<i>Halomonas eurihalina</i>	Leván
<i>Zymomonas mobilis</i>	Leván
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	Glükán
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dextrán
<i>Gluconacetobacter xylinum</i>	Cellulóz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alginát
<i>Pseudomonas putida</i>	Alginát
<i>Sphingomonas elodea</i>	Gellán
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Gellán
<i>Xanthomonas sp.</i>	Xantán

2. táblázat Ipari jelentőségű poliszacharidokat termelő baktériumok

A törzsek termelőképességének javítására genetikai módosítással kevés lehetőség van. A bioszintézis megszakítása mutációval egyszerűbb termékeket eredményezhet (például nem kerülnek rá a cukrokra a szerves savak), de ez nem változtatja meg alapvetően a termék minőségét és mennyiségét.

1.1.4. 5. A poliszacharidok gyártása (általános elvek)

A mikrobiális poliszacharidokat nagyrészt fermentációval állítják elő, a folyamatnál a szokásos technológiai paramétereket kell beállítani, optimalni: tápoldat összetétel, pH-érték, hőmérséklet, levegőztetés, oldott oxigén szint. A tápoldat lehet szintetikus, glükóz vagy szacharóz szénforrással, illetve állhat komplex, mezőgazdasági vagy élelmiszeripari melléktermékekből (pl. melasz, kukorica szirup, deproteinizált savó, burgonya és gyümölcs maradék, stb). Néhány esetben a de novo fermentáció helyett enzimes biokonverzióval termelik a poliszacharidokat.

A termelt biopolimer mennyiségére és minőségére egyaránt hatással van a törzs kialakítása (metabolikus és géntechnológia), az (upstream) folyamatoptimalizálás, és a termékizolálás hatékonysága. Ez utóbbi a végtermék kinyerése és tisztítása centrifugálással vagy szűréssel, csapadékképzéssel és szárítással.

A technológiai optimalásról vannak adatok a xantán, gellán, pullulán és szkleroglükán gyártásáról, ugyanakkor más mikrobiális poliszacharidok előállításáról alig van információ. Azonban megfogalmazható néhány általános szabály, amely legtöbb folyamatra érvényes.

Tápközeg:

A nagy C/N arány bizonyítottan minden poliszacharid termelését elősegíti, kevesebb biomassza és több poliszacharid keletkezik. A nitrogén és foszfát limitáció egyaránt fokozza a termékképzést, célszerű ezek indulási koncentrációját úgy megválasztani, hogy a sejtzaporodási szakasz végére elfogyjanak. A szénforrás általában 20-40 g/l cukornak felel meg.

A szén és nitrogén forrás megválasztása befolyásolja a biopolimer termelést. A xantánt többféle szénforráson is elő lehet állítani, de a kihozatal változó. A glükózon, szacharózon, maltózon és oldható keményítőn kapott hozamok ebben a sorrendben csökkennek. A fermentációs tápoldatban lévő cukrok aránya befolyásolhatja a heteropoliszacharidokat alkotó cukromonomerek arányát. A dextrán és a leván gyártásának szubsztrátja egyértelműen a szacharóz.

Szénforrásként előnyös mezőgazdasági, élelmiszeripari vagy ipari melléktermékeket (melasz, sajtgyári savó vagy glicerin) felhasználni, azonban ezek alkalmazásánál problémák léphetnek fel. Az eltérő tápanyag összetétel és a szennyező anyagok hatására más anyagcsereutak is működésbe léphetnek, így más polimerek és/vagy (nem kívánt) melléktermékek is képződhetnek. A nem hasznosuló komponensek inhibitorokként működhetnek, csökkentve a termékképzést.

A nagy tisztaságú (pl. orvosi célú) termékek előállításához jó minőségű, tiszta alapanyagokat kell felhasználni, hogy csökkenthessük a tisztítás költségeit, a szennyeződésnek átvitelének kockázatát. Ilyen esetekben a hulladékok vagy melléktermékek használatáról le kell mondani, vagy a downstream lépések költségei jelentősen megnőnek.

A nitrogénforrás minősége a törzsek igényétől függ. A fonalas gombáknál megfelelnek a szerves nitrogén sók is, de más törzsek szerves N-forrást igényelnek (pl. a *Xanthomonas*-ok és a tejsav baktériumok, mint a *Leuconostoc mesenteroides*).

A minimál táptalaj komponensein túl egyes esetekben vitamin, aminosav és prekursor kiegészítésre is szükség van.

A poliszacharidok termelése a termékképzési kinetika szempontjából is változatos, többféle típust is azonosíthatunk, de a poliszacharidok általában másodlagos anyagcsere-termékeknek, szekunder metabolitoknak tekinthetők. De akad példa a növekedéshez kötött bioszintézisre (gellán, bakteriális cellulóz és az élesztő glikánok) és a limitált szakaszban megjelenő, sejtszámhoz kötött termékképzésre (kurdlán) is.

A tápanyag adagolás stratégiája is befolyásolja a fermentáció hatékonyságát. Ipari méretben a szakaszos technológia az általános, de sokszor kiegészítik rátáplálással (fed batch). Ezzel kiküszöbölhető a szubsztrát inhibíció, és javulhat a végtermék koncentráció. Az elérhető termék koncentrációnak viszont gátat szab az a jelenség, hogy a felhalmozódó polimer olyanira viszkózussá teszi a fermentlevet, hogy a tápanyag transzport gyakorlatilag megszűnik, és ezzel a tenyészet saját magát fojtja meg. A nagy oxigén igényű xantán fermentációnál ez kb. 3%-nál következik be, míg az anaerob dextrán gyártásnál 8%-ig is el lehet menni.

A hőmérséklet és a pH is kontroll változói a fermentációknak. A bakteriális fermentációk esetében az optimális hőmérséklet legtöbbször 28-30 °C körül van, míg a gombáknál a poliszacharid szintézisének optimális hőmérséklete általában valamivel alacsonyabb, 25-28 °C körüli. A kiválasztott hőmérséklet gyakran kompromisszum a sejtnövekedés és a termékképzés optimuma között. Ha ez a két optimum jelentősen eltér, akkor célszerű a hőmérsékletet változtatni, kétszakaszos eljárást kidolgozni.

Az optimális pH-t is elsősorban a mikroorganizmus határozza meg. A baktériumok tipikusan a semleges közeget kedvelik, a 6-7 közötti pH tartományt. Ugyanakkor anyagcserejük során a cukrokból szerves savakat termelnek, ami csökkenti a pH-t, és lelassítja a folyamatokat. Emiatt a savakat közömbösíteni kell, pH méréssel és szabályozással az értéket az optimá-

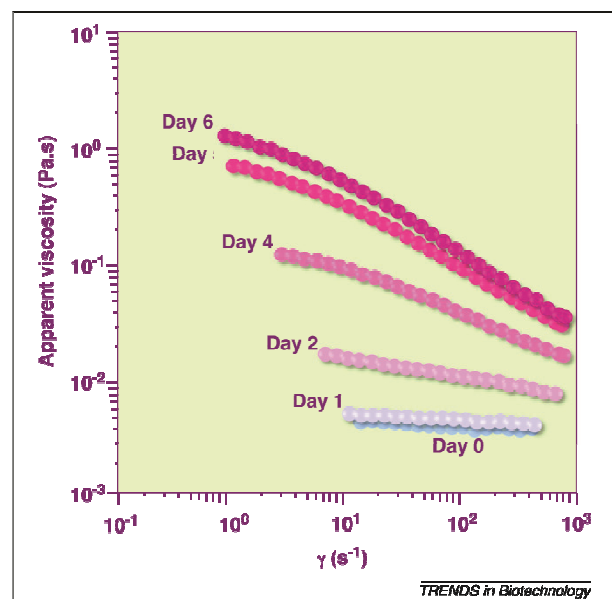
lis tartományban tarthatjuk. A poliszacharid termelő gombák lényegesen savasabb közegben működnek optimálisan. A szkleroglukánál a 3,5-4,5; a pullulánál 4,5-5,5 a legkedvezőbb pH tartomány.

A levegőztetés és keverés szintén fontos tényező a fermentációs poliszacharid előállításánál. Mivel a termelő mikroorganizmusok nagy része aerob, az oxigén szükséges a sejtnövekedéshez. Az intenzív levegőztetés a pullulán és a xantán esetében serkentő hatású a poliszacharid szintézisre. Más törzseknél viszont az alacsony oldott oxigén szint visszafogja ugyan a sejtek szaporodását, de fokozza a polimer szintézist. Ennek lehetséges magyarázata lehet az, hogy az oxigén hiány az egyik a szekunder metabolizmust kikényszerítő stresszelő körülmények közül.

Az oxigén bevitel és a keverés néha egymástól függetlenül hat. A gellán fermentáció esetében a magas oxigén szint, a nagy levegő bevitel (1 VVM felett) csökkenti a hozamot, ugyanakkor az intenzív keverés (pl. 500 rpm) alapvető fontosságú ennél a viszkózus fermentációnál. A növekvő viszkozitás a legtöbb mikrobiális poliszacharid termelésénél fellépő általános probléma. A kialakuló egyre nagyobb viszkozitás egyre jobban korlátozza a tápanyagok, ezek között az oxigén transzportját, különösen, ha a tenyészetben a sejtek nem egyesével, hanem csoportosan vannak jelen. Általánosan megfogalmazható, hogy nagy nyíróerejű keverés szükséges.

Más törzseknél viszont mikroaerofil (bakteriális alginát) vagy teljesen anaerob (dextrán *Leuconostoc mesenteroides*-sel) környezetet kell fenntartani.

A poliszacharidok gyártása során a fermentáció reológija drasztikusan változik. A lé kezdetben vízhez hasonló newtoni folyadék, ami fokozatosan egy nagyon viszkózus pszeudoplasztikus viselkedésű folyadékká válik. Ez a változás jól látható a 6. ábrán. Az indulásnál a viszkozitás közel állandó (newtoni), az idő előrehaladtával viszont nem csak növekszik, hanem egyre erőteljesebben függ a nyírósebességtől (pszeudoplasztikus). A viszkozitás ilyen mértékű növekedése megnehezíti az átkeverést, és reaktorban lévő lé már nem lesz homogén. Ez pedig már megnehezíti a levegőztetést, a beadagolt anyagok elkeveredését, és a méréseket is, mivel a benyúló szenzorok környezete nem reprezentálja a fermentáció egészét. A pszeudoplasztikus jellegből levezethető, hogy a keverő közelében, ahol nagy a nyíróhatás, kicsi lesz a viszkozitás, azaz gyorsabb az anyagátadás. Távolabb, ahol a keverő már nem tud elég turbulens áramlást létrehozni, nagyobb a viszkozitás és romlik az anyagátadás. A holt terek kialakulását úgy akadályozhatjuk, hogy növeljük a keverő átmérőjét és optimalizáljuk a lapátok kialakítását. Az átmérő növelésével viszont olyan mértékben nőne a teljesítményfelvétel (a méret ötödik hatványával), hogy a fordulatszámot le kell csökkenteni. Ennek megfelelően a fermentorok nem túl nagyok, az 50-200 m³ mérettartományba tartoznak.



6. ábra Poliszacharid fermentáció látszólagos viszkozitásának változása a fermentáció során, log-log ábrázolásban

1.1.4.1. *Kinyerés és tisztítás*

Az extracelluláris mikrobás poliszacharidok kinyerése a fermentléből általában három szakaszból áll: 1. a sejtek eltávolítása, centrifugálással vagy szűréssel; 2. a polimer kicsapása a sejtmentes léből vízzel elegyedő szerves oldószerral (pl. metanol, etanol, izopropanol vagy acetone); 3. a kicsapott polimer szárítása, fagyasztva szárítással (laboratóriumi méretben) vagy dobszárítóval (ipari méretekben).

Sok esetben a fermentlevet a vágás után, még a fermentorban, a sejtek elválasztása előtt pasztörözik (90-95 °C-on). A hőkezelés célja a baktériumsejtek elpusztítása és a terméket bontó enzimek inaktiválása. Emellett magasabb hőmérsékleten kisebb a lé viszkozitása, ami megkönnyíti a következő szűrést vagy a centrifugálást.

Ezután következhet a sejtek elválasztása szűréssel vagy centrifugálással, de nagy viszkozitás esetén a lé nem mindig szűrhető és centrifugálással sem ülepedhető. Ha a fermentlevet vízzel, híg sóoldattal vagy alkoholokkal hígítjuk, akkor le lehet csökkenteni a folyadék viszkozitását, és ez megkönnyíti a szűrést, a szennyeződések eltávolítását. Ez viszont hátrányt jelent a következő lépésnél, mert lényegesen nagyobb mennyiségű sejtmentes felülszó keletkezik, és ebből következően nagyobb mennyiségű kicsapó oldószer szükséges. A sejtek elválasztás helyett eliminálhatók, lizálhatók lúgos vagy enzimes kezeléssel is.

A meghatározó lépés a termék oldószeres kicsapása. Vízzel elegyedő szerves oldószereket (alkoholok, acetone) adnak a léhez egy-kétszeres mennyiségben. Élelmiszer minőségű xantán előállításához az FDA izopropanolos kicsapást ír elő. A csökkenő polaritás miatt a poláris molekulák, így a poliszacharidok oldhatósága romlik, egy határon kicsapódnak. A csapadék-képzést elő lehet segíteni többértékű fémionokkal is, amelyek keresztkötéseket hozhatnak létre a láncok között. Ezt a csapadékot már lehet szűrni.

A kapott szemcsés anyagot levegővel/inert gázzal/vákuumban szárítják. A végterméket a kívánt szemcsenagyságú porrá őrlik.

Az eljárás mellékterméke hatalmas mennyiségű vizes oldószer, a fermentlé térfogatának akár két-háromszorosa. Ennek regenerálásához desztilláló üzemet kell telepíteni a fermentációs üzem mellé, ami jelentősen növeli a költségeket.

A terméket sokféle, kis és nagy molekulásúlyú vegyület szennyezheti. Ezek részben a tápoldatból származnak, részben a sejtek anyagcseréjének termékei (pl. sejtörmelékek, sók és fehérjék). A további tisztításhoz már minden egyes biopolimerre megfelelő technikát kell kiválasztani és optimalizálni a termék molekula szerkezeti és fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a kívánt tisztaság és rendeltetészerű használat alapján. Tisztulást lehet elérni az átkristályosításhoz hasonlóan az anyag újraoldásával és ismételt kicsapásával. A fehérjéket el lehet távolítani szelektív kicsapással (pl. kisózással, triklór-ecetsavval) vagy enzimekkel (proteázokkal). Alkalmazható ezen kívül membránszűrés (pl. ultraszűrés) is. Ha a fehérjék eltávolítását olyan vegyszerek hozzáadásával hajtják végre, amelyek reakcióba léphetnek az EPS komponensekkel, akkor az negatív hatással lehet a polimer minőségére, vagy csökkenhet a termék kihozatala. Ezért meg kell találni a technológiai kompromisszumot a termék kihozatala, tisztasága és minősége között.

A legszigorúbb tisztasági követelmények, a gyógyszerkönyvi minősítés az orvosi felhasználású poliszacharidokra vonatkoznak. Az élelmiszer minőségű biopolimereknél enyhébbek az előírások, de ezek sem tartalmazhatnak pl. biomasszát (sejtörmeléket és más intracelluláris összetevőket) és a kinyeréshez használt segédanyagokat.

1.2. TERMÉKEK, TECHNOLÓGIÁK

1.2.1. XANTÁN

A xantán (angolul xanthan gum, azaz xantán gumi) egy tipikus bulk poliszacharid, amit viszkozitásnövelő és stabilizáló tulajdonságai miatt alkalmaznak. Ezt a *Xanthomonas campestris*, egy Gram-negatív növényi kórokozó termeli, amely a xantánnal, mint ragasztóval tapad a növények felületére. A törzs a keresztes virágúakra veszélyes, a káposztafélék nyálkás rothadását okozza (a nyálkaanyag maga a xantán).

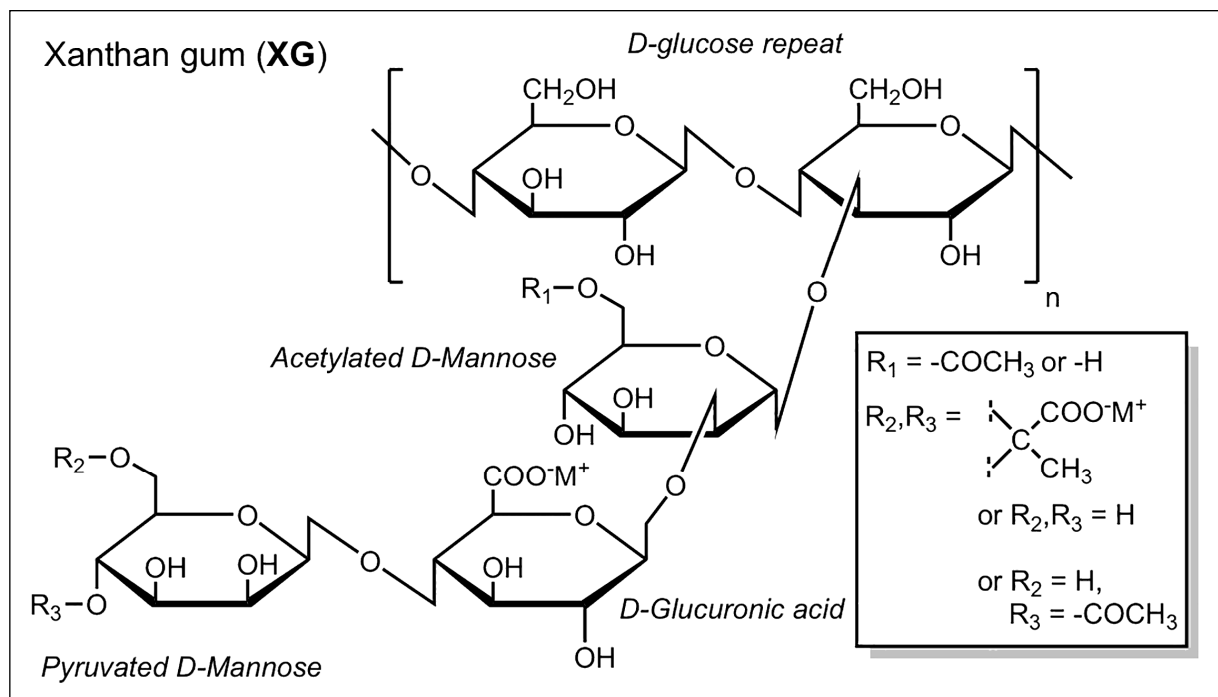
1963-ban fedezték fel, és hamarosan gyártani is kezdték az élelmiszeripar számára, adalék kódja E415. Alkalmazását élelmiszer-adalékként az FDA mennyiségi korlátozás nélkül hagyta jóvá, mivel teljesen ártalmatlan anyagnak bizonyult.

A legnagyobb mennyiségben termelt mikrobiális poliszacharid, a piaca körülbelül 100.000 tonna évente, az ára 1-4 USD/kg között ingadozik.

1.2.1.1. Szerkezete:

A xantán lineáris főlánc (1-4) kötésekkel összekapcsolt β -D-glükóz egységekből áll, amelyben minden második cukorhoz a C-3 pozícióban egy triszacharid oldallánc kapcsolódik. Ebben az első mannózhoz egy glükuronsav kapcsolódik (1-2), ehhez még egy mannóz (1-4) kötéssel. Kémiai szerkezete a 7. ábrán látható. Móltömege 2.000.000 és 20.000.000 Dalton között mozog, ez részben a fermentációs körülményektől, részben az egyes láncok aggregációjának mértékétől függ. A természetes xantánban a belső mannózhoz a C-6 pozícióban egy ecetsav kapcsolódik észter kötéssel, az oldalláncok végén lévő mannózhoz pedig egy piruvát ketál formában.

Xantán a piruvil- és acetil-csoportjai savas (pH 3) vagy lúgos (pH 9) közegben eltávolíthatók, de ez nem befolyásolja a reológiai tulajdonságokat.



7. ábra A xantán kémiai szerkezete

A xantán térbeli szerkezete függ a közeg ionerősségétől. Kis ionerősségnél az egyenes, cellulóz-szerű főlánc körül az oldalláncok kinyúlnak. Nagyobb sókoncentrációknál viszont visszahajlanak a molekula gerince felé, ami rendezettebb, tömörebb szerkezetet eredményez, és ez a magasabb tranzíciós hőmérsékletben is megmutatkozik.

A xantán oldatok viszkozitása igen nagy, a legnagyobb az iparilag is használt poliszacharidok között. A viszkozitás már kis koncentrációban is nagy, pl. 5 g/l-es oldatban szobahőmérsékleten 1000 cP (=1 Pa.sec). Ez jól kihasználható az élelmiszeriparban.

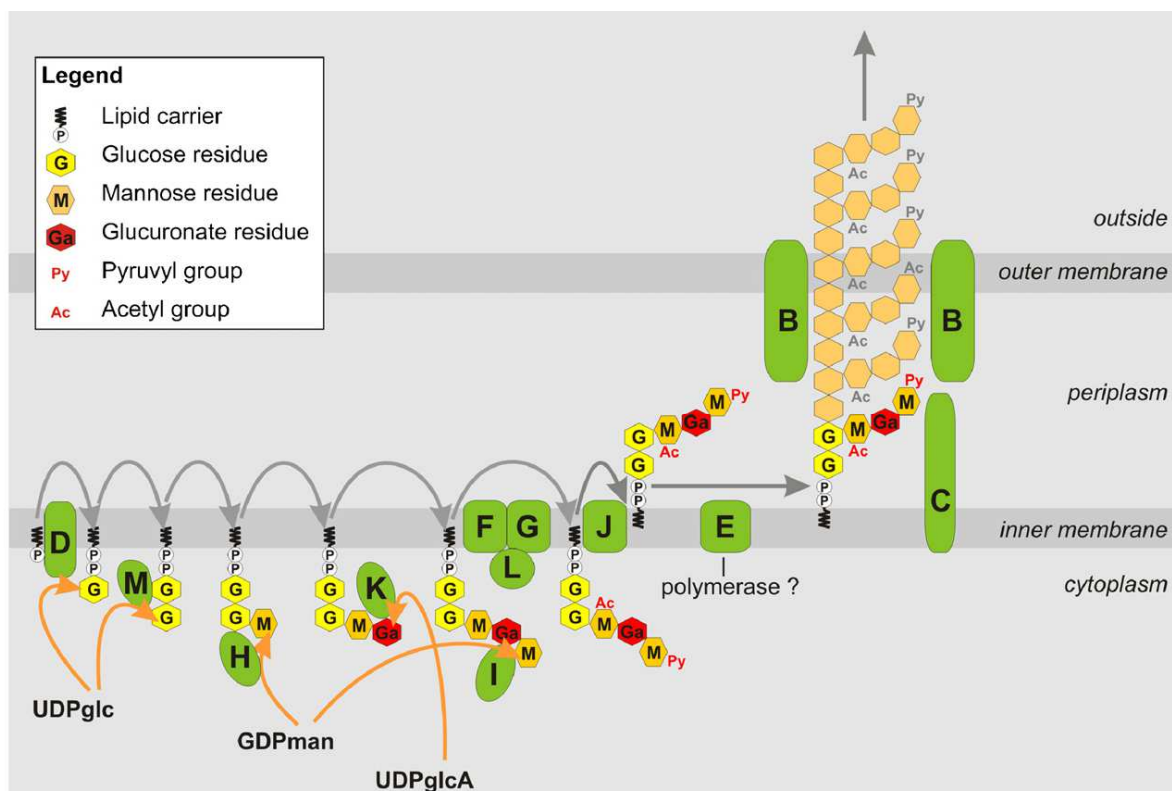
Ugyanakkor a xantán gélképző tulajdonsága gyenge. Ezt viszont jelentősen lehet javítani más ionos poliszacharidokkal kombinálva. Például a szentjánoskenyérmag-gumi (locust bean gum), a karragén vagy az agaróz hozzákeverése 50:50 tömegszázalékban kiváló szinergikus kölcsönhatást hoz létre.

Szerkezeti módosítások

A lehetséges szerkezeti módosítások legfontosabb célpontjai a triszacharid oldalláncon lévő savak. Az acil és piruvát származékok száma a xantánon befolyásolja tulajdonságokat. Ezt az arányt kétféleképpen is befolyásolhatjuk. Átállíthatjuk a fermentációs körülményeket, illetve kereshetünk hiányos anyagcseréjű (természetes hiánymutánsok) altörzseket. Például az *X. campestris* var. *phaseoli* acetilmentes, illetve a var. *oryzae* piruvátmentes xantánt termelnek. A vad típusú altörzsek keresése mellett indukált mutációval is próbálkoztak. A megfelelő enzimek kiiktatásával politetramer illetve politrimer xantán formát próbáltak előállítani. A politetramert sikerült előállítani gyengébb (50%-os) kihozattal, de a trimert nem.

1.2.1.2. *A xantán bioszintézise*

A xantán képződésének alapsémája a következő: (1) a szubsztrát felvétele; (2) szubsztrátok metabolizmusa; (3) alapegységek létrehozása nukleotidokhoz kötött cukrokból lipid hordo-



8. ábra A xantán bioszintézise

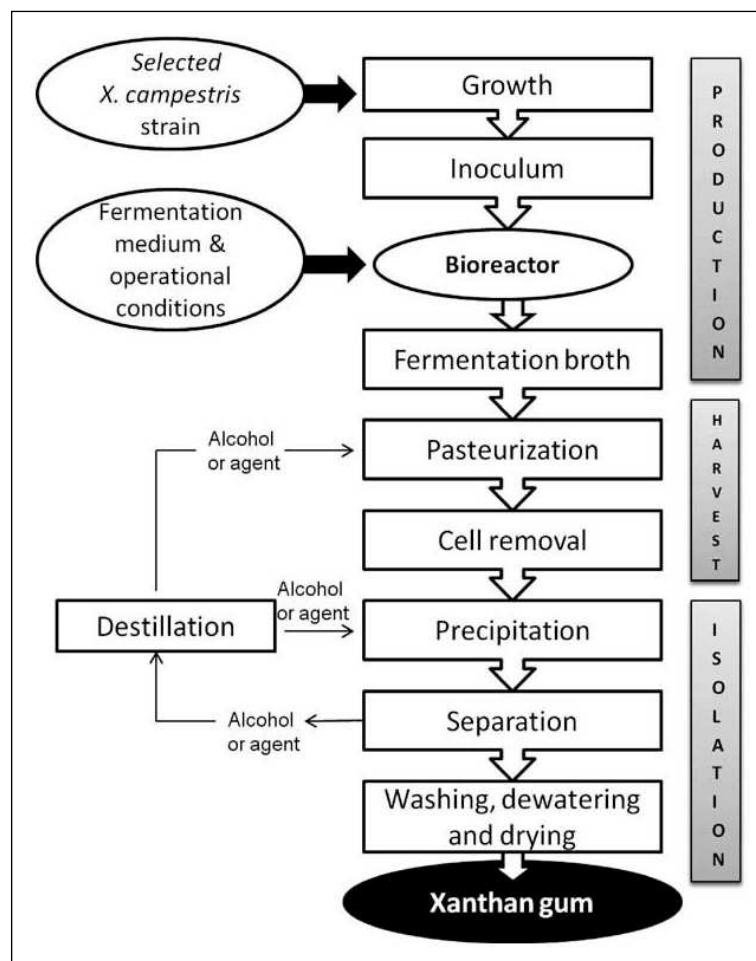
zón; (4) dekorálás szerves savakkal (5) kiléptetés a sejtől (6) polimerizáció a periplazma térben (7) kiléptetés külső térbe.

A xantán alapegysége a citoplazmában kialakuló cukor-nukleotidokból épül fel egy poliizoprenol-foszfát templáton, ami a sejt belső membránjába horgonyozódik. A savcsoportok acetyl-CoA és foszfoenol-piruvát kapcsolódásával jönnek létre. Az ismétlődő egység szintézise két UDP-glükóz, két GDP-mannóz és egy UDP-glükuronsav molekula felhasználásával jön létre. A kész pentaszacharid egységet egy enzim a lipid hordozó átfordításával (flip) átviszi a membrán külső felületére, a periplazmás térbe. Itt megy végbe a polimerizáció és a kész lánc a külső membránon keresztül tolódik ki a sejten kívülre. A folyamathoz tízenkét, nagyrészt membránkötött enzimre van szükség. Ezek génjei egy operonban (xanthan cluster) helyezkednek el (*gumB-M* gének, 16 Kb).

1.2.1.3. *Xantán gyártása*

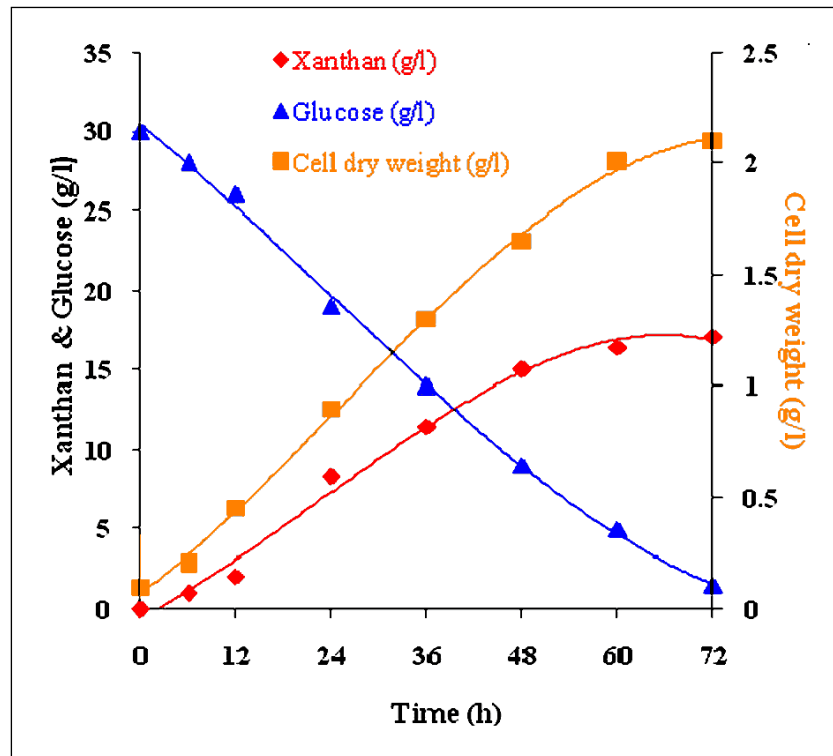
A teljes technológiai folyamatot mutatja be a 9. ábra.

A xantánt termelő *X. campestris* törzseket liofilizálva vagy mélyhűtve (-180 °C-on) tárolják. Több szaporítási lépés után indítják a termelő fermentációt. A táptalaj optimalizált összetétele, az alkalmazott bioreaktor típusa, és működtetése, valamint a tenyésztési körülmények (hőmérséklet, pH, oldott oxigén koncentráció) határozzák meg a mikroba szaporodását és a xantán termelést.



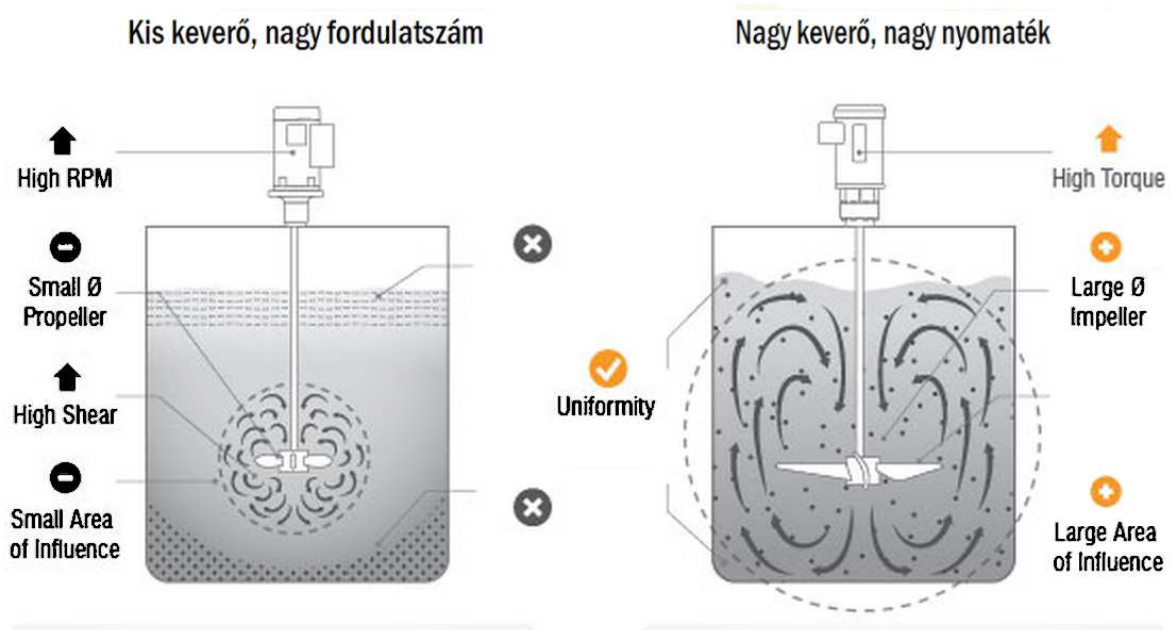
9. ábra A xantán gyártás folyamatábrája

A táptalajban szénforrásként 4-5 % glükózt adagolnak, ebből 25-30 g/l xantán képződik, optimális esetben a konverzió eléri a 70 % -ot. A xantánt többféle szénforráson is elő le-

10. ábra Xantán batch fermentációja *X. campestris*-szel

het állítani, de a kihozatal változó. A glükózon, szacharózon, maltózon és oldható keményítőn kapott hozamok ebben a sorrendben csökkennek.

Nitrogén forrásként a törzs szerves vegyületeket, azaz fehérje hidrolizátumot igényel. Különösen jól hasznosítja a glutaminsavat, de ez ipari méretben túlságosan költséges lenne. Ennél a gyártásnál is ügyelni kell a magas C/N arányra. Akkor termelődik sok xantán, ha a N-forrás annyira elfogy, hogy koncentrációja limitálóvá válik. Ezzel együtt a xantán elsődleges anyagcsereterméknek tekinthető, termelés kinetikája I. típusú, a sejtszaporodással együtt változik a termékképzés. 10. ábra.

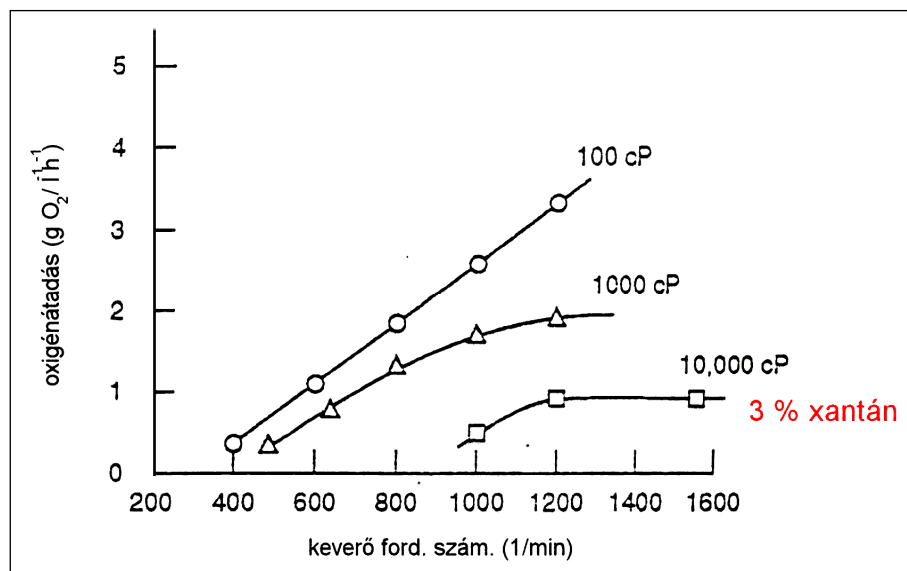


11. ábra Keverők hatásának összehasonlítása

Baktérium törzset használunk, azaz az optimális pH $7\pm 0,3$. a cukor hasznosítása során azonban a tenyészet savakat termel, ami leviszi a pH-t. Ezt közömbösíteni kell, a pH-t legfeljebb hatig engedjük le, pH=5 alatt a termékképzés lelassul, sőt leáll.

Különösen nagy problémát jelent a speciális reológiájú fermentlé a levegőztetés szempontjából. A keverő közelében, ahol nagy a nyíróhatás, kicsi lesz a viszkozitás, azaz gyorsabb az anyagátadás. Távolabb, ahol a keverő már nem tud elég turbulens áramlást létrehozni, nagyobb a viszkozitás és romlik az anyagátadás. Emiatt nagy átmérőjű, és kisebb fordulatszámú keverőket kell alkalmazni (11. ábra). Gondot okoz a buborékok optimális mérete is. Ha kicsik, akkor a viszkozus lében nem tudnak felszállni, növelik a holdup-ot, és fokozatosan elfogy belőlük az oxigén. Ha nagyok, akkor felszállnak, de kicsi a fajlagos felület, és ettől romlik az OTR.

A nagy viszkozitás az oka, hogy a tenyészet végül önmagát fojtja meg. A sűrű lében megszűnik a konvektív anyagszállítás, és a diffúzió nem elegendő a sejtek ellátásához. Az anyagátadás annyira lelassul, hogy a sejtek anyagcseréje leáll. Ez a xantán esetében kb. 3%-os koncentrációnál következik be. A 12. ábrán látható, hogy ennél a koncentrációnál már hiába növeljük a keverő fordulatszámát, a bekevert teljesítményt, az oxigén bevitel egy minimális értéken állandósul.



12. ábra Az oxigénátadás változása xantán fermentlében

A xantán fermentációnál különösen kell ügyelni a sterilitásra. A xantán burok miatt lassan növekvő sejtek versenyhátrányban vannak az esetleg bekerülő idegen mikrobákkal szemben. A semleges közeg, a glükóz+szerves nitrogén tartalmú tápoldat mind kiváló életteret biztosít a fertőzéseknek. Az aseptikus zárással nem csak a mikrobák bejutását kell megakadályozni, hanem a növénypatogén törzs kijutását is a környezetbe. Az elmenő levegőt a szokásosnál hatékonyabban kell megszűrni, és a fermentlevet lefejtés előtt pasztörizálják.

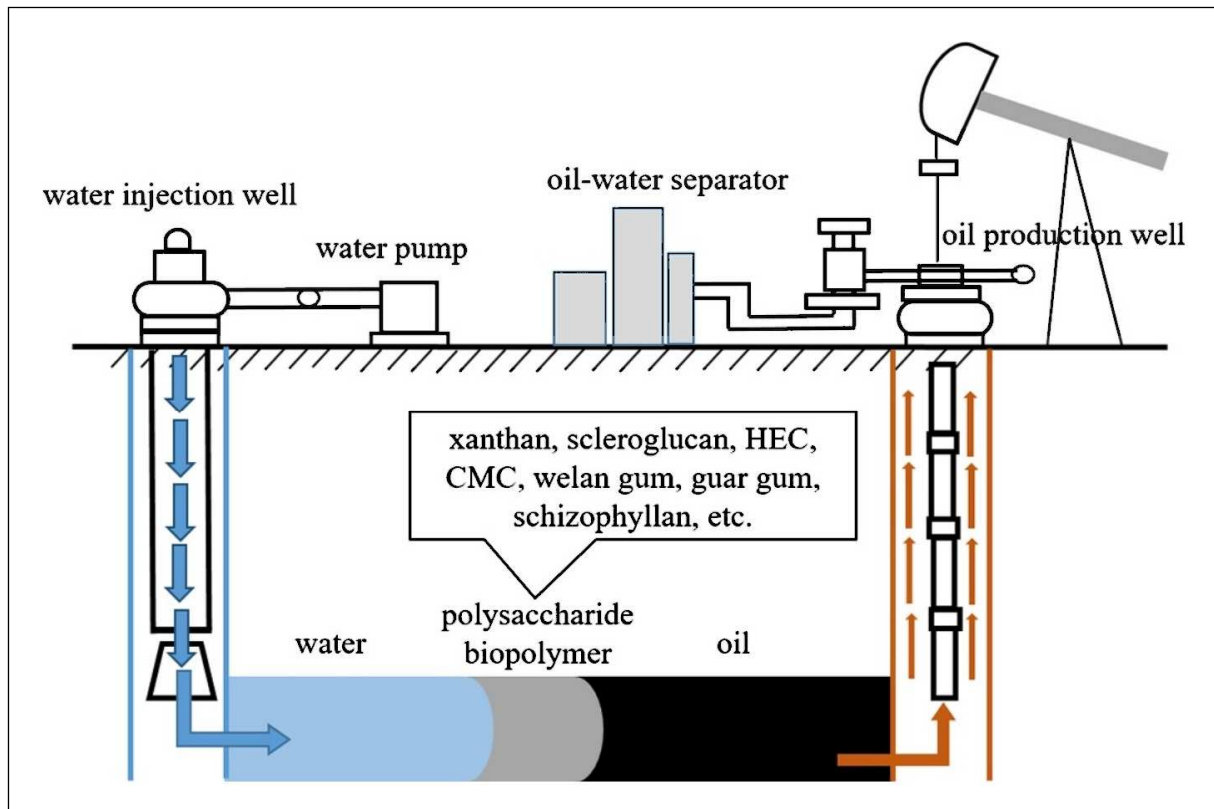
A feldolgozás kulcs lépése ez esetben is az oldószeres kicsapás. Nagy mennyiségű, 1-1,5-szeres térfogatú, vízzel elegyedő szerves oldószerrel (izopropanol, etanol, acetone) kicsapva a termék kiszűrhető. A szükséges oldószer mennyisége Ca, vagy K-sók adagolásával csökkenthető. A keletkező nagy mennyiségű vizes oldószer célszerű az üzemben belül regenerálni. Az oldószeres termék szárításánál a távozó oldószer gőzök tűz- és robbanásveszélyt jelenthetnek.

A xantánt por formában, vagy 8%-os oldatként hozzák forgalomba. Élelmiszer célra szánt poroknál az FDA előírás maximum 10 000 sejt/g-ot enged meg. Ha ennél nagyobb a fertőzőtség, akkor az propilén-oxid gázos dezinficiálással csökkenthető. Az oldatoknál még nagyobb probléma a sterilitás fenntartása.

1.2.1.4. *A xantán felhasználása*

Több mint 30 éve, hogy az USA FDA emberi fogyasztásra jóváhagyta a xantán használatát. Ez nem csak az élelmiszeriparra korlátozódik, hanem a szájon át adott gyógyszerészeti és orvosi készítményekre is. Az élelmiszeriparban xantánt sűrítő, stabilizáló és emulgeáló komponensként használják. Előnyös, hogy oldatának kis koncentrációban is nagy a viszkozitása. Hideg és meleg vízben egyaránt jól oldódik, jól tűri fagyasztást és a felolvasztást. Erősen savas oldatban is stabil, sőt viszkozitása még növekszik is. Annak ellenére, hogy nagy a viszkozitása, ez nyírás hatására lecsökken, így könnyen keverhető, önthető és áramoltatható. A megtermelt xantán kb 60 %-át veszi fel az élelmiszeripar, 15%-ot használnak fogpaszták, emulziós festékek (cseppenésmentes festék) készítésére és további 15% kerül az olajkitermelésbe.

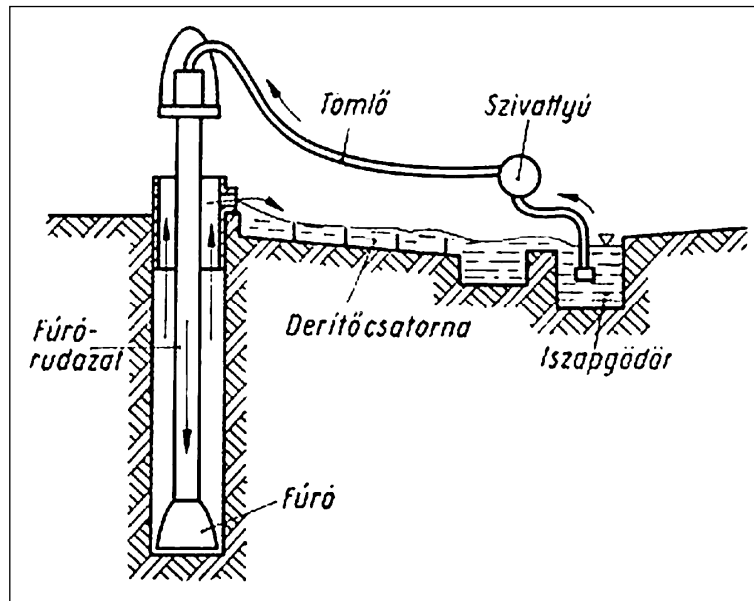
A sütőiparban a javítja a termékek térfogatát és a textúráját (különösen a gluténmentes pékáruknál). A sütés során visszatartja a vizet, növeli az eltarthatóságot, a hűtve tárolt tészták jobban bírják a fagyasztást-felolvasztást. Diétás süteményekben ragasztóként helyettesíti a tojásfehérjét, krémekben és gyümölcstermékekben csökkenti a szinerézist. Dressingeken, mártásokban és szirupokban javítja az emulziók stabilitását savak és sók jelenlétében is. Széles



13. ábra Poliszacharid oldatok alkalmazása a másodlagos olajkinyerésben

hőmérséklet-tartományban megtartja a viszkozitását. Javítja a termékek testességét, konzisztenciáját. Vajas és csokoládés öntetekben növeli a sűrűséget és a viszkozitást. Hatékony stabilizátor és sűrítő adalék krémsajtokban és rostos italokban is.

Nagy mennyiségben használják az olajkitermelésben is.



14. ábra A fűrőöblítő folyadék áramlása

A kimerülőfélben lévő olajmezőknél a másodlagos olajkitermelést úgy oldják meg, hogy az olajtartalmú kőzet alá egy másik furaton keresztül vizet, pontosabban poliszacharid oldatot szivattyúznak. A viszkózus oldat kiszorítja a kapillárisokból a szintén viszkózus kőolajat és az víz-olaj emulzió formájában felhozható az eredeti olajkúton át.

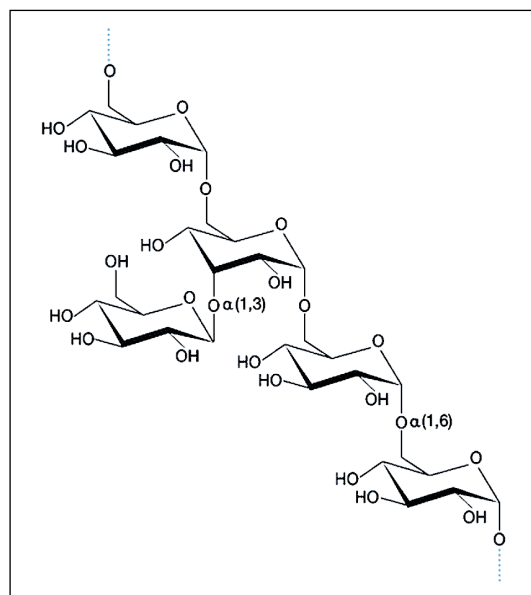
Hasonló ipari alkalmazás a fűrő öblítő folyadékok adalékolása. A folyadék szerepe kettős, és éppen ezért jól kihasználható a pszeudoplasztikus oldat kettős természete. Az öblítő folyadék egyik szerepe a fűrőfej hűtése. A kőzeteket aprító fogazott fejek nagy mértékben felmelegednek, hűtést igényelnek. Gyors forgásuk ugyanakkor erős nyírást hoz létre a fej körül a folyadékban, az oldat viszkozitása kicsi lesz, így hatékony a hőátadás, a hűtés. A másik funkció a kőzettörmelék elszállítása. A függőlegesen felfelé áramló folyadék viszi magával a kődarabokat, de azok a sűrűségkülönbségnek megfelelően ülepednek, lefelé mozognak. Ezt az ülepedést akadályozza az, hogy ebben a szakaszban a folyadék laminárisan, kis nyírás mellett áramlik, így a viszkozitása nagy lesz. A felszínen a zagyból kiülepítik a kőzetszilánkokat, és a folyadékot visszacirkuláltatják.



15. ábra Fűrőberendezés és öblítőfolyadék (ferde fűrás a Karinty Frigyes út alatt, saját felvétel)

1.2.2. DEXTRÁN

Egy másik korán felfedezett és gyakran alkalmazott bakteriális poliszacharid a dextrán. A dextránt eredetileg a cukorlevek és borok nyálkásodásának vizsgálata során azonosították és jellemezték. Kedvező tulajdonságai miatt hamarosan használni kezdték az élelmiszerek sűrítésére és állagjavításra. Később ezen kívül gyógyszerként és inert mátrixként is alkalmazták. Bár sok baktérium törzs termeli (*Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Acetobacter*, és *Gluconobacter* fajok), iparilag a *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512 tejsavbaktérium törzssel termelik, szacharóz szubsztráton. A molekula mintegy 95%-ban lineáris α -(1,6) kötésű glükózból és kb. 5%-nyi α -(1,3) kötésű elágazásból áll. A természetes dextrán molekula tömege viszonylag magas, egy millió Da körüli, de sokkal nagyobb értékeket is mértek, mivel a molekulák hajlamosak az aggregálódásra. Az ipari célokra forgalomba hozott dextránt kisebb molekulákra tördelik (savas vagy enzimés hidrolízissel) és elválasztják a különböző méretű frakciókat.



16. ábra A dextrán szerkezete

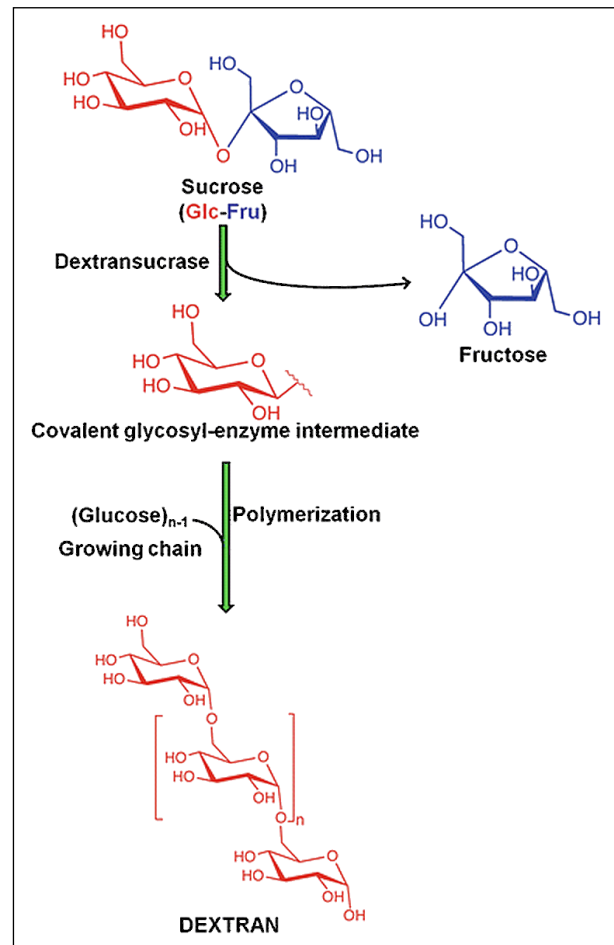
1.2.2.1. Tulajdonságok

A dextrán fizikai-kémiai tulajdonságai a gyártáshoz használt mikroba törzstől függően változatosak, de még az egyetlen törzs által termelt anyag is heterogén, a molekulatömeg és az (1,6) kötések aránya jelentős eltéréseket mutathat. Emiatt a megtermelt dextránt forgalomba hozás előtt a kívánt molekulatömeg és a felhasználási cél szerint frakcionálják. A kereskedelmi dextrán könnyen oldódik meleg vagy hideg vízben is, oldata mérsékelten viszkózus, és még nagy koncentrációban (50%) sem gélesedik. A nagy molekulatömegű dextránokban általában több az elágazás, ami csökkenti a vízdoldhatóságot. Azok a dextránok, amelyekben az α -(1,3) kötésű elágazások aránya meghaladja a 43%-ot, vízben már gyakorlatilag oldhatatlanok. A közepes és kis molekulájú dextránok (500 kDa alatt) vizes oldatban newtoni viselkedést mutatnak egészen 30%-os koncentrációig. A tisztítatlan, nagyobb molekulákat is tartalmazó "natív" dextrán viszont már 1,5%-os oldatban is pszeudoplasztikus viselkedésű.

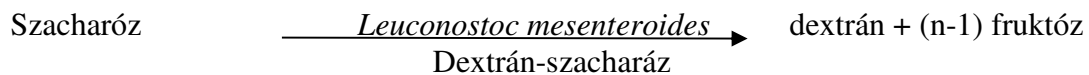
Az α -(1,6) kötések az emésztő enzimek csak nagyon lassan tudják hidrolizálni, a dextrán az oldható, de nem bontható élelmi rost frakcióba tartozik.

1.2.2.2. Bioszintézis

A bioszintézis kulcslépése a dextranszacharáz (dextrán-szukuráz, α -glükoziltranszferáz) enzim által katalizált transzglükozilációs reakció, amelyben a szacharózból a glükóz átkerül valamilyen akceptor molekulában lévő láncvégi glükózra, így hosszabbodik a poliszacharid lánc. A folyamat indításánál dextrán még nincs jelen, az első reakciónál szacharózra kerül a glükóz. Emiatt a dextrán molekulák legelső eleme egyetlen fruktóz, ehhez kapcsolódik a több ezer glükóz. A reakció gyakorlatilag irreverzibilis, a polimert még éheztetés esetén sem bontják vissza a sejtek. A konverzió közel 100%-os.



17. ábra A dextrán képződése



*Adalék: A spontán dextrán képződés komoly problémát okozhat a cukorgyárakban. Ha egy elzárt csővezetékben hosszabb ideig áll a tömény cukoroldat (anaerob körülmények között), akkor ez lehetővé teszi a *L. mesenteroides* elszaporodását és a dextrán képződést. A viszkozus oldat olyan dugót képezhet, amit a normál szivattyúzással nem lehet megmozdítani, és ezzel üzemzavart okozhat.*

1.2.2.3. Fermentáció:

A *L. mesenteroides* tejsavbaktérium, ez sok mindent meghatároz a fermentációs technológiában. A törzs anaerob, nincs szükség levegőztetésre, csak minimális keverésre. A szubsztrátként beadott szacharóz az egyetlen szénforrás. A sejtek növekedésük során tejsavat termelnek, a pH csökken, ez viszont káros a folyamatra. Emiatt a keletkező savat közömbösíteni kell, a pH-t nem szabad 5 alá engedni. Szintén a tejsavbaktériumokra jellemző, hogy hiányos anyagcseréjük miatt komplex, szerves nitrogén forrást igényelnek (pl. 1-2% kukoricalekvárt).

A folyamat kétszakaszos, előbb a sejtszaporítási fázis, majd az enzimes reakció, a termékézés következik. A képződő sejtömeg minimális a poliszacharidhoz képest. A baktériumsejtek nagyon kicsik, még nagy sejtszám mellett is alacsony a szárazanyag tartalom. 0,5 g/l-nyi baktériumsejt termel a folyamatban kb. 80 g/l dextránt (160-szoros mennyiség). Ennyi termékhez kétszeres mennyiségű (16%) szacharóz kell, hiszen csak a glükózból lesz termék, a fruktózból nem. Ennyi cukrot nem érdemes egyszerre bevinni a rendszerbe, mert a nagy ozmózisnyomás megállítja a folyamatot, emiatt több részletben visszük be a szubsztrátot.

Ez egy nyugvósejtes technológiára emlékeztet, bár az enzimek itt nem a sejteken belül vannak. Elvileg lehetne az enzimet izolálni, tisztítani, és azzal gyártani a dextránt, de ez az út költségesebb.

1.2.2.4. Feldolgozás

A kinyerés menete analóg a többi poliszacharidéval. A kulcslépés a metil-alkoholos kicsapás majd szűrés. A kapott termék móltömege a legtöbb célra túl nagy, rövidebb láncokká kell tördelni. A részleges hidrolízist meg lehet oldani sósavas főzéssel 100 °C-on vagy enzim-kezeléssel. A *P. funiculosum* termel erre a célra megfelelő endohidrolázt. A hidrolízis után metanolos frakcionált kicsapással választhatók el a különböző méretű molekulák. Az élelmiszerekben a 15-90 kDa-os tartományt használják. Életmentő lehet a dextrán alkalmazása vérplazma pótlására. Vérvesztés esetén a volumen pótlására nem mindig áll rendelkezésre elegendő plazma vagy humán szérum albumin. Ilyenkor átmenetileg más, hasonló tulajdonságú hidrophil polimerekkel helyettesíthetjük az albumint (zselatin, dextrán, hidroxipropil-keményítő). A dextránból kétféle oldatot forgalmaznak erre a célra, az egyik a 40 kDa-os frakció 10%-os oldata, a másik 60-70 kDa-os és 6%-os töménységű. Az előbbinek erősebb a volumen növelő hatása és a vesén keresztül viszonylag gyorsan kiürül. Mivel ezek a készítmények egyenesen az emberi véráramba kerülnek, a gyógyszergyártás rendkívül szigorú tisztasági és biztonsági követelményeinek megfelelően készülnek.

Adalék: A laboratóriumi gyakorlatban is találkozhatunk a dextránnal, mint oszloptöltettel (Sephadex). A láncokat keresztkötésekkel térhálósítva vízben oldhatatlan, erősen hidrophil, neutrális és biológiailag nem bontható univerzális mátrixot kapunk. Ez a térhálósítás mértékének beállításával méret szerinti elválasztásra (kizárásos kromatográfia) alkalmas, illetve különböző kötőcsoportok rávitelével más kromatográfias és adszorpciós műveletek végrehajtása is megoldható.

Az elválasztási műveletek között még egy ponton találkozhatunk a dextránnal. A vizes kétfázisú extrakciónál a polárisabb fázis általában tömény (10-20%-os) dextrán oldat (PEG-dextrán rendszerek).

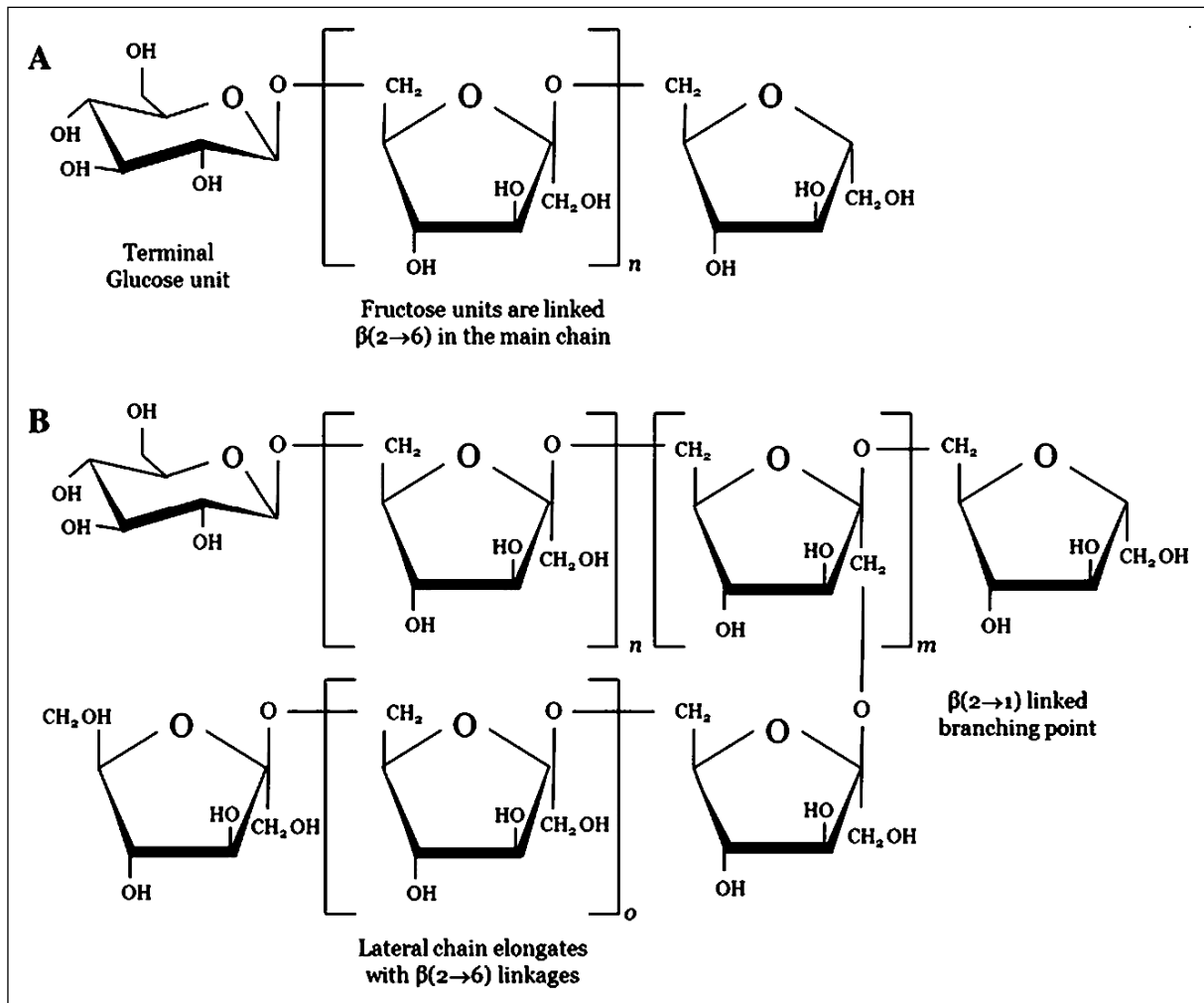
1.2.3. Leván:

A leván biokémiai értelemben, szerkezetében és képződésében a dextrán tükörképe. (A szacharóz glükózából dextrán, a fruktózából leván képződik). A leván D-fruktózokból álló homopoliszacharid (fruktán). A főláncot β -(2,6) kötések alkotják, az elágazások β -(2, 1) kötéssel kapcsolódnak (18. ábra).

A bakteriális levánok vízdoldhatósága nagy molekulatömegük (10^6 – 10^7 Dalton) ellenére jó. Ez sok elágazást tartalmazó szerkezetükkel magyarázható. A leván belső viszkozitása jóval kisebb, mint más hasonló molekulatömegű poliszacharidoké, mivel a szerkezete nem lineáris, rúd alakú, hanem a sugárirányban kiterjedő elágazások miatt inkább kompakt gömb- vagy ellipszoid formájú.

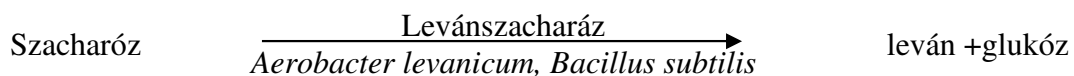
A *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* által termelt leván oldata még 20%-os koncentrációban is newtoni viselkedésű marad. *B. subtilis* levánját egy kis molekulású és kisebb viszkozitású, és nagy molekulatömegű, viszkózusabb frakcióra lehet szétválasztani. A leván nem gélesedik és nem duzzad a vízben. A bakteriális levánok érzékenyek az enzim- vagy savas hidrolízisre, azaz emészthetők, ellentétben a növényi eredetű levánokkal, amelyek nem bonthatók.

Sok baktérium termel levánt, például a *Streptococcus salivarius*, a *Lactobacillus sanfranciscensis*, a *Bacillus subtilis* és a *Bacillus polymyxa*, az *Acetobacter xylinum*, a *Gluconacetobacter xylinus*, a *Microbacterium levaniformans*, a *Zymomonas mobilis* és még néhány mikroorganizmus.



18. ábra A leván szerkezete

A leván bioszintézist a levánszacharáz (levánszukuráz) enzim katalizálja, ami a szacharóz molekuláról levett fruktózt áthelyezi, transzferálja valamilyen fruktózt tartalmazó akceptor molekulára, adott esetben az épülő lánc végére.

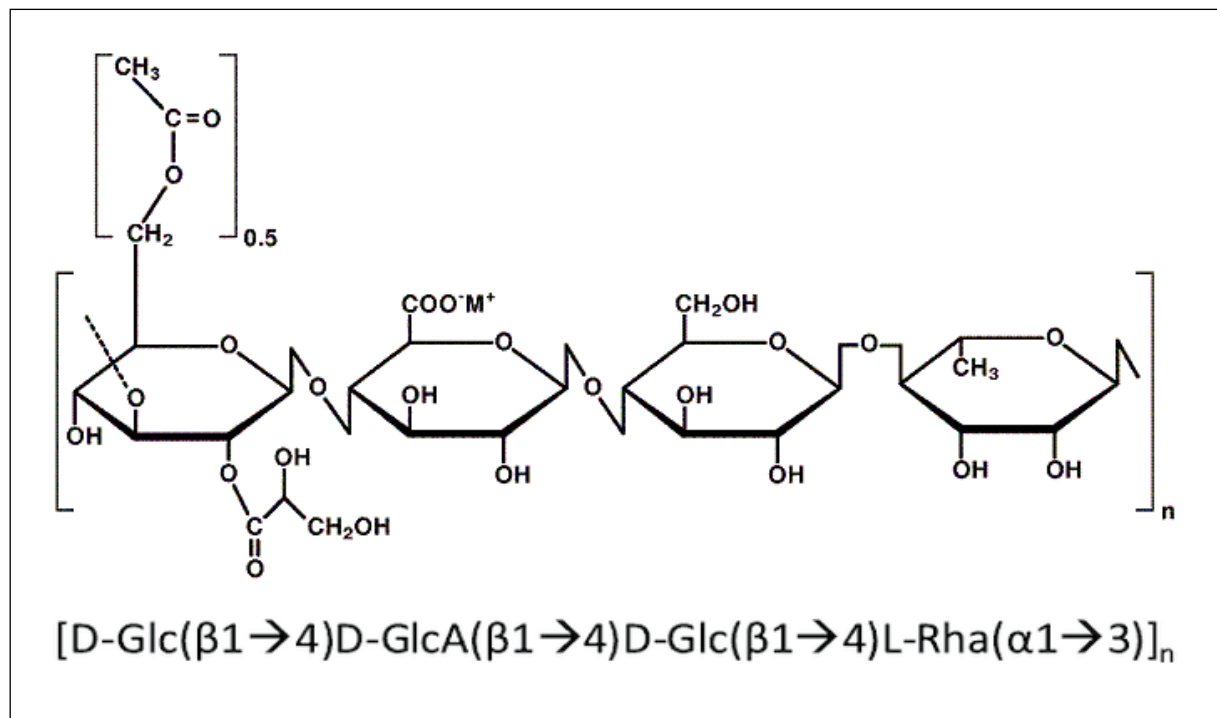


A technológia is analóg a dextránnal, annyi különbséggel, hogy a termelő törzsek aerobok, tehát szükséges a levegőztetés. A gyártást meg lehet oldani fermentációsán (sejtszaporítás + biokonverzió), vagy izolált és tisztított levánszacharáz enzimmal. A termelt leván móltömege változó (10^6 – 10^7 Da), ez a használt mikroorganizmustól és a technológiai feltételektől függ. Tulajdonságai és élelmiszeripari alkalmazásai hasonlítanak a dextránra, de a levánnak több kedvező egészségügyi/gyógyászati hatása is van.

A *B. subtilis* és a *Z. mobilis* törzsekkel 40-50 g/l termékkoncentráció érhető el, 62 %-os konverzió mellett.

1.2.4. Gellán

A legelső xantán mintájára más hasznos bakteriális poliszacharidokat is kerestek. Ennek során azonosították a gellánt. Egy növényi kórokozó, a *Sphingomonas paucimobilis* (korábban *Pseudomonas elodea*) termeli. Eredeti, természetes funkciója, hogy a patogén sejteket a megtámadott vízi növények felületére ragasztja. Neve is innen ered (elodea = hínár). A natív gellán ismétlődő lineáris tetraszacharidokból álló anionos heteropolimer, átlagos móltömege 500.000 Dalton. Az alkotó molekulák sorrendje: glükóz-glükuronsav-glükóz-ramnóz. A glükózhoz karbonsavak kapcsolódhatnak észterkötéssel. Minden tetraszacharidon van egy ecetsav, és átlagosan minden másodikhoz egy glicerinsav is kapcsolódik. Szerkezetét a 19. ábra mutatja be.



19. ábra A gellán szerkezete

A glükuronsav miatt anionos jellegű poliszacharid, a kétértékű fémionok (pl.: Ca²⁺) a láncok között keresztköteket hozhatnak létre.

Ha a gellán fermentációhoz laktózt adtak az általánosan használt glükóz helyett, akkor a polimer acilezettsége csökkent, és ettől a termék reológiai tulajdonságai rosszabbak lettek.

A feldolgozás során alkoholos kicsapással nyerik ki, majd igény szerint lúgos kezeléssel leválasztják az észterező savakat.

Felhasználás

A gellán termék és technológia kifejlesztésének az volt a célja, hogy a xantánt egyszerűbben előállítható és olcsóbb anyaggal lehessen helyettesíteni. De még mielőtt megkapta volna az élelmiszerengedélyt, már agar-helyettesítőként forgalmazták, elsősorban mikrobiológiai táptalajokban. Az eredeti gellán géljei túl gyengék és gumyszerűek, de ha eltávolítják az észterező savakat, akkor keményebb, törékeny gélek hozhatók létre.

Az ipari célra gyártott gellánt általában lúgos főzéssel dezacetilezik, amely az eredetileg lágy, elasztikus géleket képző polimert átalakítja. Ennek hatására a poliszacharidból kemény,

törékeny, termoreverzibilis, savtűrő, átlátszó gélek jönnek létre. A kereskedelemben háromféle aciláltságú (magas, alacsony és savmentes) gellán kapaó.

A gélek akkor átlátszóak, ha az ionrősség és a polimer koncentrációja kicsi. Az ionerősség növelése zavarossá teszi a kuaakuló gélt, viszont szacharóz hozzáadásával meg lehet tartani az átlátszóságot.

Olyan tartós filmet is lehet belőle képezni, hogy kísérleteznek inzulin gellános bezárásával is, amivel lassan felszívódó, retard hatású inzulin készítményt lehetne előállítani.

A gellánt az élelmiszeripar sokféle területen használja: viszkozitásnövelő, stabilizátor, gélesítő adalék a desszertek, zselék, bevonatok, mártások, pudingok, italok gyártásánál, vagy más poliszacharidokkal együtt ehető filmek és bevonatok készítésénél.

Ha a dezacetilezett gellánról lemoszák az összes többértékű kationt, akkor a hozzáadott kalcium ionokkal ugyanolyan gélt képez, mint az alginátok.

1.2.5. „Helyettesítő” poliszacharidok

A természetes forrásokból kinyert poliszacharidok egy részénél is felmerült az igény, hogy alternatív módon, fermentációval, nagy mennyiségben, állandó minőségben állítsák elő ezeket.

Így az alginátot, amit eredetileg barnamoszatokból, pl. *Macrocystis pirifera*-ból vontak ki lúgos kezeléssel, párhuzamosan fermentációs úton is gyártják. Több mikroorganizmus is képes alginátot szintetizálni. Ezek közül az *Azotobacter vinelandii* termel az alga-algináthoz leginkább hasonló poliszacharidot. Az alginátot az élelmiszerekben, a textiliparban, papírkészítményekben és a gyógyszeriparban is használják sűrítőként, stabilizátorként, zselésítő és emulgeáló szerként. Toxicitása alacsony, kalcium ionokkal jól gélesíthető és viszonylag olcsó. (Az alginátról részletesebben ld. a BIM jegyzetben.)

Mikrobiális cellulóz

A mikrobiális cellulózt többek között az *A. xylinum* törzsszel termelik. Ez szerkezetileg azonos a növényi cellulózzal, β -(1,4)-kötésekkel összekapcsolt glükopiranoz láncok alkotják, ugyanakkor nem kapcsolódik hozzá hemicellulóz, pektin és lignin, ami a növényi eredetű cellulózokat mindig szennyezi. Az FDA ennek az anyagnak is megadta a "GRAS" (generally recognised as safe = általánosan biztonságosnak elismert) státuszt élelmiszer adalékként. Ez a cellulóz nagy tisztasága és kristályos szerkezete mellett abban is különbözik a növényi eredetű terméktől, hogy erősebb gélt képez, jobb a formázhatósága és nagyobb a vízkötő kapacitása. Élelmiszeripari és orvosi alkalmazása igen széleskörű.

Heparin

A heparin egy lineáris és sok szulfátcsoportot tartalmazó glükóz-aminoglikán, melynek antikoaguláns tulajdonságai vannak. D-glükózamin és D-glükuronsav kapcsolódik benne egymáshoz 1-4 glikozidos kötésekkel. Számos hidroxil és amino csoportja kénsavval észterezett, erősen anionos tulajdonságú. Az állati és az emberi szervezet számos szövete termel heparint, klasszikus gyártása vágóhídi melléktermékekből való kivonáson alapul. Biotechnológiai gyártása során az első lépésben *E. coli*-val termelnek kondroitin szulfátot, majd ebből emlős sejtekkel hozzák létre a heparint.

1.3. Ciklodextrinek (CD, Schardinger dextrinek)

Elsőként Villiers észlelte 1891-ben, miközben keményítőt emésztett *Bacillus amylobacter*-rel. Ez a kultúra feltehetőleg nem volt tiszta tenyészet, valószínűleg hőstabil *B. macerans* spórákat is tartalmazott. Villiers 1000 g keményítőből 3 g kristályos terméket izolált, amit „cellulozin”-nak nevezett el, ami valószínűleg α - és β -CD-t tartalmazott.

1904-ban Schardinger izolált egy törzset, amely 25%-ban termelt kristályos dextrineket keményítőből. A törzset később *B. macerans*-nak nevezték el. A molekulák szerkezetét 1942-ben sikerült meghatározni röntgenkristallográfiával.

1.3.1.1. Szerkezet és tulajdonságok

A ciklodextrinek (CD) a ciklikus oligoszacharidok családjába tartoznak, amelyek α -(1,4) kötésű glükopiranoz alegységekből állnak. A különbség közöttük a felépítő glükopiranoz egységek számában van, az α -CD 6, a β -CD 7, a γ -CD pedig 8 glükóz egységből épül fel. A szakirodalomban cikloamilóz, ciklomaltóz és Schardinger dextrin néven is említik. 1961-ben igazolták a δ -, ζ -, ξ -, η -CD természetes képződését is.

A ciklodextrin molekulákban az összes glükopiranoz egységükben 4C_1 szék konformációban van (mint az egyéb dextrineknél és a keményítőnél). A kötésszögek miatt a gyűrű nem zárulna tökéletesen, a záródásnál a kötések kissé deformálódnak. Ez a deformáció (és vele a feszültség) az α -CD-ben a legkisebb, míg a γ -CD-ben a legnagyobb.

Az egyik glükopiranoz egység C-2-OH csoportja hidrogénkötést képezhet a szomszédos glükopiranoz egység C-3-OH csoportjával. A β -CD molekulában ezek a H-kötések egy teljes másodlagos övet alkotnak, ezért a β -CD egy meglehetősen merev szerkezet (20. ábra). Valószínűleg ez a magyarázata, hogy a β -CD-nek a legkisebb az oldhatósága az összes CD közül.

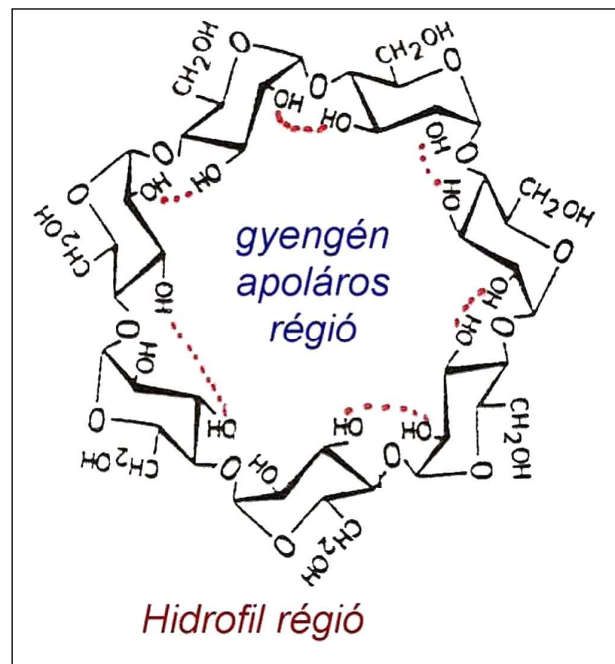
A ciklodextrinek az apoláris szerves oldószerekben oldhatatlanok.

A ciklodextrinek királis nem-redukáló oligoszacharidok. Savas körülmények között a ciklodextrinek lassabban hidrolizálódnak, mint a maltooligoszacharidok. A ciklodextrinek levő glikozidos kötések α -amilázzal lehet elhidrolizálni, viszont az exo-amilázok nem hatnak rájuk. Az enzim hidrolízis sebessége a γ -CD esetén a leggyorsabb, ezt követi sorrendben a β -, és α -CD. Az összes CD nagyon stabil és jól oldható lúgos oldatokban, magas pH-n. A ciklodextrinek a keményítőnél jobban ellenállnak a savas vagy lúgos kezelésnek, pH 2 és 12 között nem bomlanak.

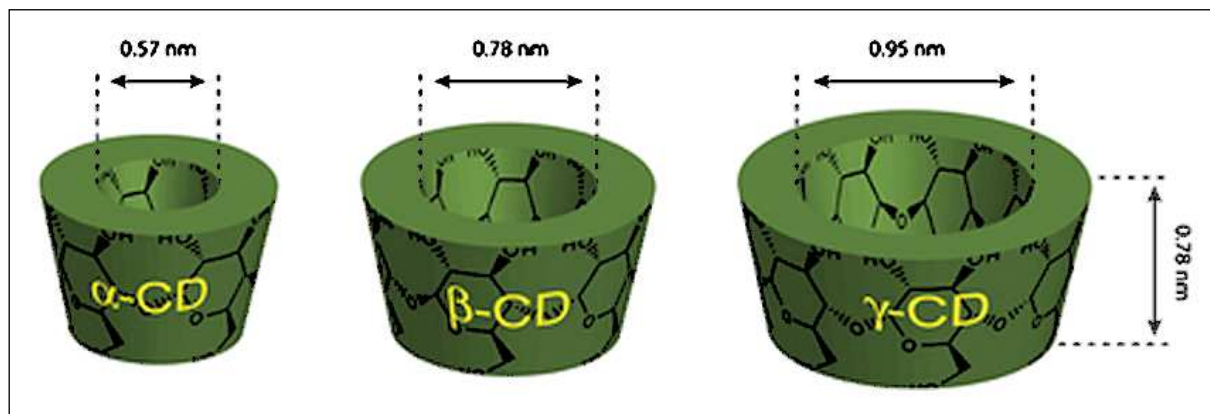
A CD-gyűrű valójában csonka kúp alakú, amit szoktak fánk vagy koszorú alaknak is nevezni, de legtalálhatóbb a „virágcserep alak” hasonlat.

A háromféle alapvegyület méreteit pontosan ismerjük (21. ábra és 3. táblázat).

E sajátos elrendeződés miatt a szabad hidroxil csoportok a molekula külső felületén találhatóak, míg a belső részben a hidrogén hidak és nem-polarizált C-H csoportok miatt gyengén apoláris felület alakul ki.



20. ábra A ciklodextrinek szerkezete



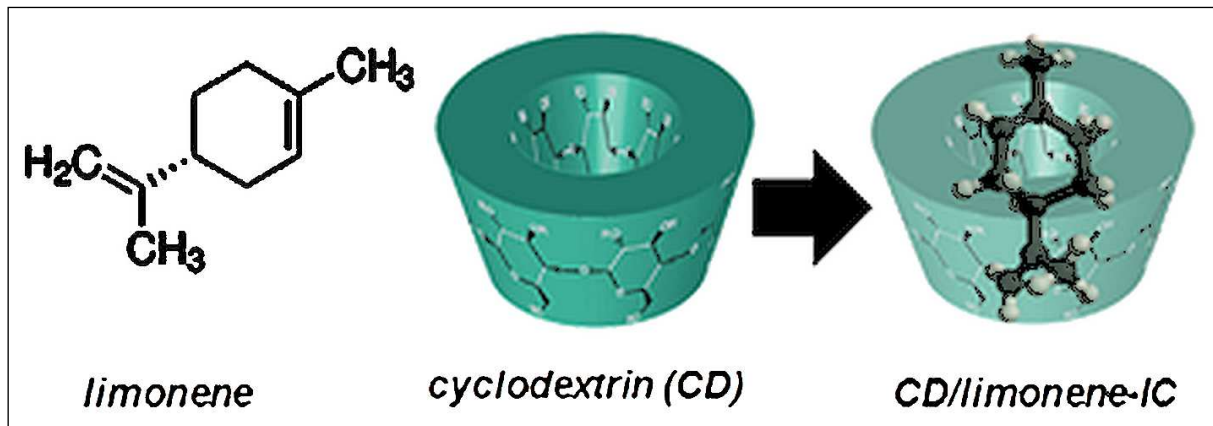
21. ábra A ciklodextrinek mérete

Tulajdonság	α -CD	β -CD	γ -CD
Glükópiranóz egységek száma	6	7	8
Molekuláris tömeg (g/mol)	972	1135	1297
Vízoldhatóság 25°C-on (% w/v)	14,5	1,85	23,2
Külső átmérő (nm)	1,46	2,54	1,75
Belső üreg átmérő (nm)	0,47 – 0,53	0,60 – 0,65	0,75 – 0,83
Tórusz magassága (nm)	0,79	0,79	0,79
Belső üreg térfogata (nm ³)	0,174	0,262	0,427
Belső üreg térfogata (ml/mól)	104	157	256
Belső üreg térfogata (ml/g)	0,10	0,14	0,20

3. táblázat A ciklodextrinek méretei

Zárvány molekula képződése

Az apoláris belső felület teszi lehetővé a ciklodextrinek különleges kölcsönhatását, azt, hogy képesek a molekula üregében hidrofób molekulákat befogni, zárványvegyületeket képezni. A gazdamolekulák változatossága (α -, β -, γ -CD) sokféle, részben vagy egészében apoláris vendégmolekula „molekuláris csomagolását” teszi lehetővé (22. ábra).



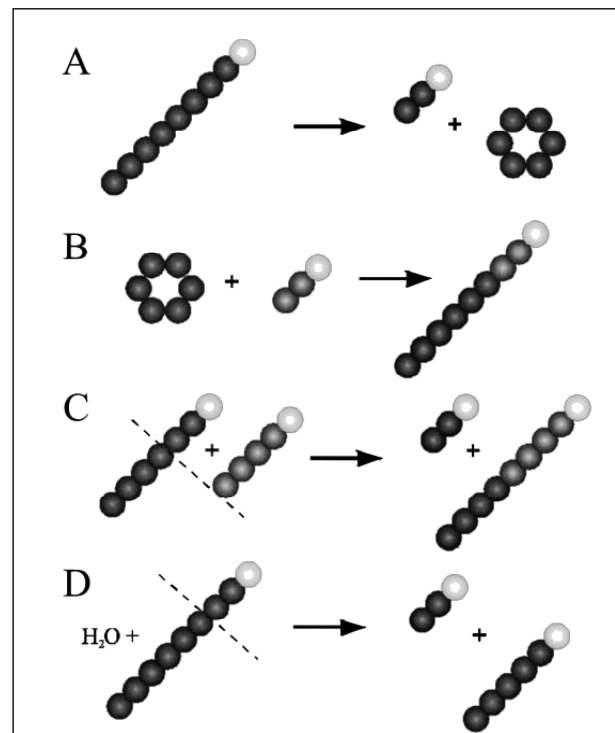
22. ábra Apoláris vendégmolekula befogása

1.3.1.2. Bioszintézis

A ciklodextrineket egy lépésben, intramolekuláris transzglykozilezési reakción keresztül lehet előállítani lineáris dextrinekből a CGTáz enzimmal.

Az enzim formális neve ciklodextrin-glikoziltranszferáz [1,4- α -D glükán 4- α -D-(1,4- α -glükano)-transzferáz; EC.2.4.1.19], amely a különböző nyitott láncú oligoszacharidok ciklizációs reakcióját katalizálja.

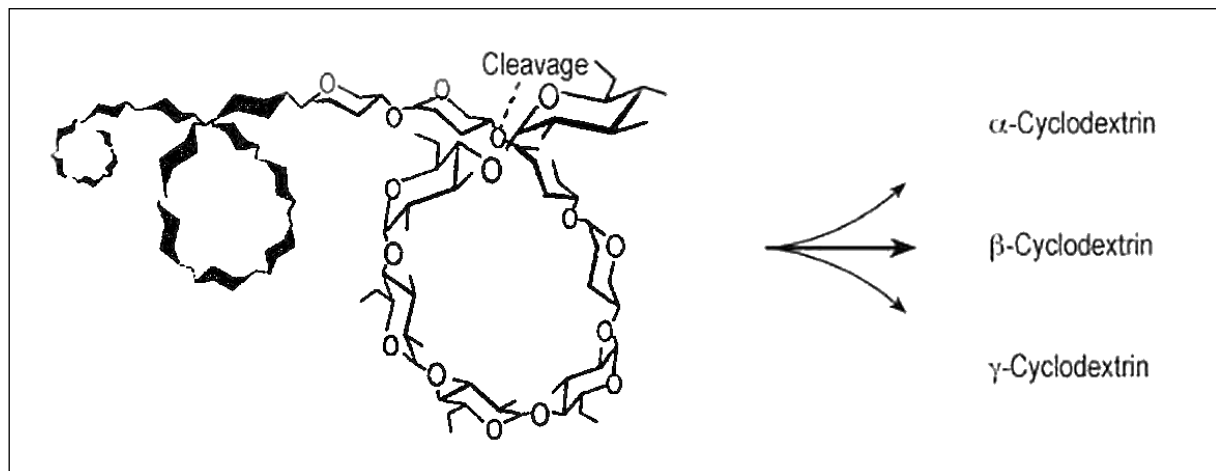
A CGTáz enzim az α -amiláz enzimes család tagja. A CGTáz egy multifunkciós enzim, amely a ciklizációs reakció mellett összekapcsolási reakciót is katalizál (felnyitja a ciklodextrin gyűrűt és az így kapott lineáris maltooligoszacharidokat akceptorokhoz transzferálja). Ezen kívül gyenge hidroláz aktivitással is rendelkezik és diszproporcionálási reakciót is katalizál intermolekuláris transzglykozilezési reakciók révén. A CGTáz enzim által katalizált reakciók a 23. ábrán láthatók.



23. ábra A CGT-áz enzim által katalizált reakciók

Az enzim tehát nem egyszerűen a cukorlánc két végét kapcsolja össze, hanem gyűrűt képez és a kimaradó oligoszacharidokat levágja. A gyűrű méretét a keményítő lánc alakja határozza meg. A növények által termelt poliszacharid spirális szerkezetű és ezt a formát az elcsirizetés után is megtartja. Az enzim a spirál egy fordulatának megfelelő hosszúságú szakaszból képez gyűrűt, így kerülnek legnagyobb valószínűséggel egymás közelébe az összekapcsolandó cukoregységek (24. ábra). A gyűrűképzés nem pontos, a különböző tagszámú ciklodextrinek párhuzamosan képződnek. A reakció végére spontán módon egy egyensúlyi összetételű elegy jön létre. Mivel a reakciók megfordíthatók, az egyes ciklodextrinek egymásba átalakíthatók. A termékek aránya a termelő enzimtől és a körülményektől függ. A keletke-

zó ciklodextrin gátolja az enzimet, emiatt a konverziós értékek kicsik (például pH=6, T= 55 °C mellett 23% α -CD és 11% β -CD keletkezik).



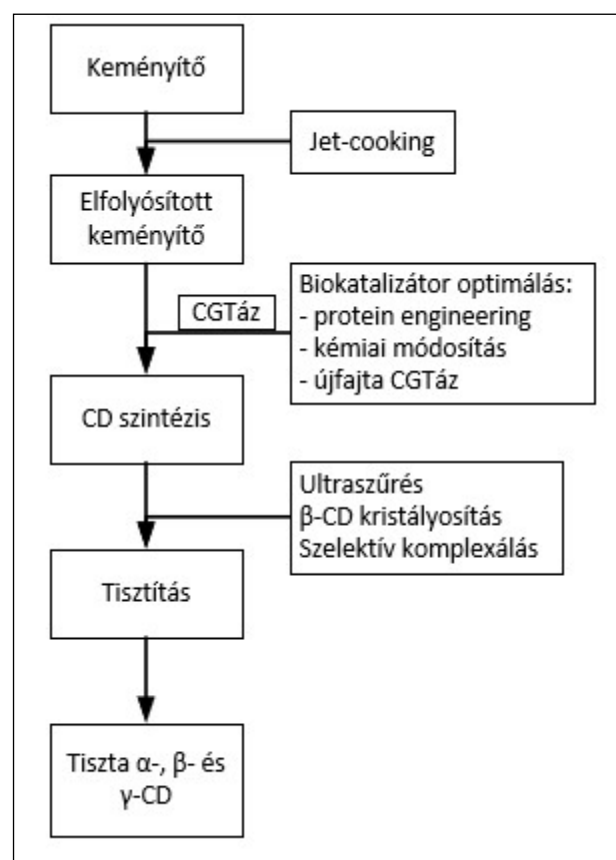
24. ábra A ciklodextrinek képződése

1.3.1.3. Törzsek

Számos mikroorganizmus képes a CGTáz enzim termelésére. Ilyen törzsek például a *Bacillus macerans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clarkii*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. firmus*, *B. circulans*, *B. ohbensis*, *Thermoanaerobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae* és a *K. oxytoca*. Mivel a *Klebsiella pneumoniae* veszélyes patogén, az enzimet klónozták a jól kezelhető *B. subtilis*-be. A gyártók nagy többsége saját fejlesztésű törzssel maga termeli az enzimet, nem a világpiacról szerzi be. A technológiában tehát első lépés az enzim fermentáció, az enzim kinyerése, tisztítása, esetleg rögzítése. A konverzió csak ezután következik.

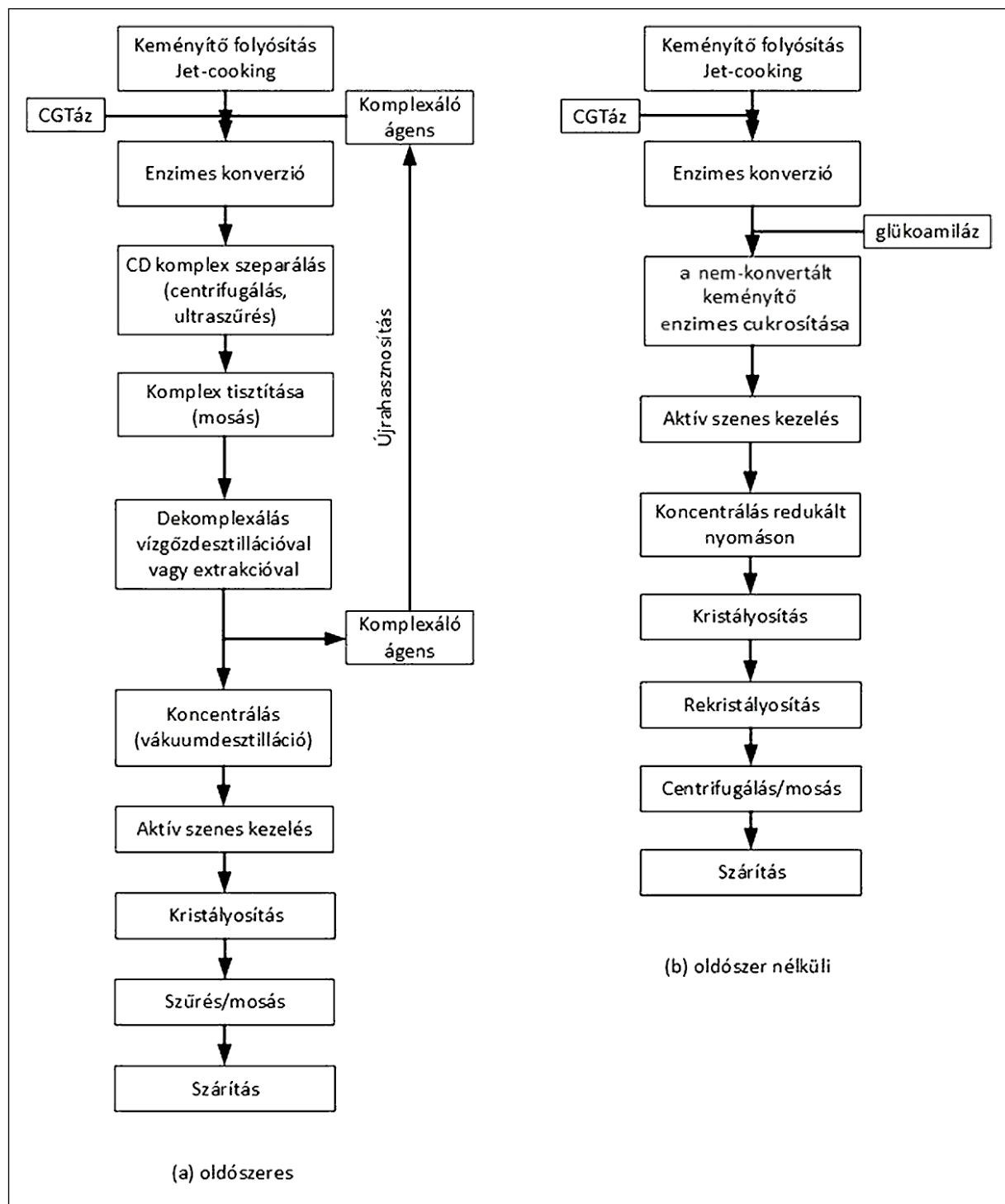
1.3.1.4. Gyártási technológiák

A gyártás kiindulási anyaga minden esetben a keményítő (főleg kukorica- vagy burgonyakeményítő), amelyet elfolyósítanak. A keményítő folyósítása 3-8 dextróz ekvivalensig (DE) történik. Ha a keményítő elfolyósítása nem megfelelő, akkor megindul a retrogradáció. Ha a keményítőt túlhidrolizáljuk, akkor a diszproporcionálási reakció fog dominálni, ez pedig szintén alacsony CD hozamot eredményez. Ha a keményítő hidrolízisére α -amilázt alkalmaznak, akkor azt a CGT-áz hozzáadása előtt inaktiválni kell, különben a hozam nagymértékben csökken.



25. ábra A ciklodextrin gyártás általános sémája

Az elfolyósítási lépést követően válik szét a folyamat oldószeres és oldószermentes eljárásokra (26. ábra).



26. ábra A ciklodextrin gyártás két változata

1.3.1.5. Oldószeres eljárások

Ipari léptékben a legtöbb ciklodextrint oldószeres eljárásban állítják elő, ahol a szerves oldószer – főként toluol, dekanol – komplexképző szerként működik. Az eljárás a keményítő elfolyósításával kezdődik (tipikus keményítő koncentráció 20-30%). Az elfolyósítást hőstabil

α -amilázzal végzik, az glükózyártásnál tárgyalt módon. A magas hőfok elérésére itt is *jet-cooker*-t használnak, de a folyósítást nem követi a cukrosítás. Ezután a kapott dextrin oldatot le kell hűteni az enzim optimális hőmérsékletére, hozzá kell adni a CGTáz-t és a szerves komplexképző szert. A gyártást úgy lehet valamelyik CD termék irányába eltolni, hogy a kívánt termékből még a reakcióelegyben zárványvegyületet képzünk. Ehhez gondosan kiválasztott, méretben pont illeszkedő szerves vegyületekre van szükség (4. táblázat). A létrehozott addukt vegyület az egyensúly szempontjából „eltűnik” a rendszerből, legtöbbször ki is csapódik, így az enzim az egyensúly helyreállítása érdekében folyamatosan utánpótolja.

Néhány kicsapószer, például a ciklohexán, az α -, és β -CD-ek keverékét eredményezi, de a hőmérséklet szabályozásával ezek relatív aránya szabályozható. Ahogy a hőmérséklet emelkedik, úgy a β -CD relatív mennyisége nő.

α -CD	1-dekanol	ciklohexán	etanol
β -CD	triklór-etilén	toluol	
γ -CD	brómbenzol	α -naftol	ciklohexadekán-8-alkén-1-on

4. táblázat Specifikus komplexáló ágensek a ciklodextrinek gyártásánál

A konverzió leállítását után a CD-oldószer komplexet centrifugálással vagy szűréssel lehet elválasztani a reakcióelegytől. A visszamaradó oldat fel nem használt keményítőt, lineáris dextrineket, glükózt, maltózt, CGTáz-t, maradék szerves komplexképző szert, melléktermékeket és vizet tartalmazhat. Az elválasztott adduktot mossuk, a szűrletet desztilláljuk, hogy a felesleges komplexképző anyagot visszanyerjük. A következő lépésben a CD-komplexet vízben szuszpendáljuk és a komplexképző szert vákuum/vízgőzdesztillációval elválasztjuk.

A termék oldatot vákuum-desztillációval lehet koncentrálni, néha szükséges aktív szénrel is tisztítani. A ciklodextrint hűtéssel kikristályosítjuk, majd leszűrjük, mossuk és szárítjuk. Ezek a feldolgozási lépések nem alkalmasak a különböző tagszámú frakciók elválasztására, ezek együtt jelennek meg a termékben. A termék tisztaságát az előző lépések, a megfelelő enzim és a komplexképző szer határozza meg.

β -CD előállítás

A gyártás 33 %-os keményítő szuszpenzió elfolyósításával kezdődik. A pH-t $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hozzáadásával emelik 7,2-re, ezzel a *B. subtilis* α -amiláz Ca-ion igényét is biztosítják. A hidrolízist 80 °C-on egy órán keresztül vezetik, majd az amilázt egy órás 120 °C-os hőkezeléssel inaktíválják. Az elegyet lehűtik 50 °C-ra, hozzáadnak 5% toluolt, és a CGTáz enzimet. A konverziót 100 órán keresztül vezetik.

Ahogy a reakció halad előre, a β -CD-toluol addukt oldhatatlan formában kicsapódik. A keményítő egységnyi tömegére vonatkoztatott hozam jellemzően 35-40%, sokkal nagyobb, mint az oldószer nélküli eljárással kapott hozam. A reakció befejezése után a komplexet szűréssel vagy centrifugálással lehet elválasztani. A csapadékot vízben szuszpendálják, a keveréket felmelegítik és a kicsapószer desztillálással eltávolítják, egyúttal a CD oldatot betöményítik. A desztilláció végén a CD marad vizes fázisban és az oldószer 1 ppm alatti koncentrációban marad jelen. A β -CD oldatot aktív szénrel kezelik, majd a kristályosítás céljából lehűtik. A kivált β -CD kristályait szűréssel vagy centrifugálással összegyűjtik, majd szárítják. A termék tisztasága 98%, az α -, és γ -CD-ek jelenléte elenyésző.

α -CD gyártás

Előállítását nehezíti, hogy sokkal jobban oldódik vízben, mint a β -CD (140 g/l), nehezebb kikristályosítani. A reakcióelegyből n-dekanolos komplexképzéssel vonható el.

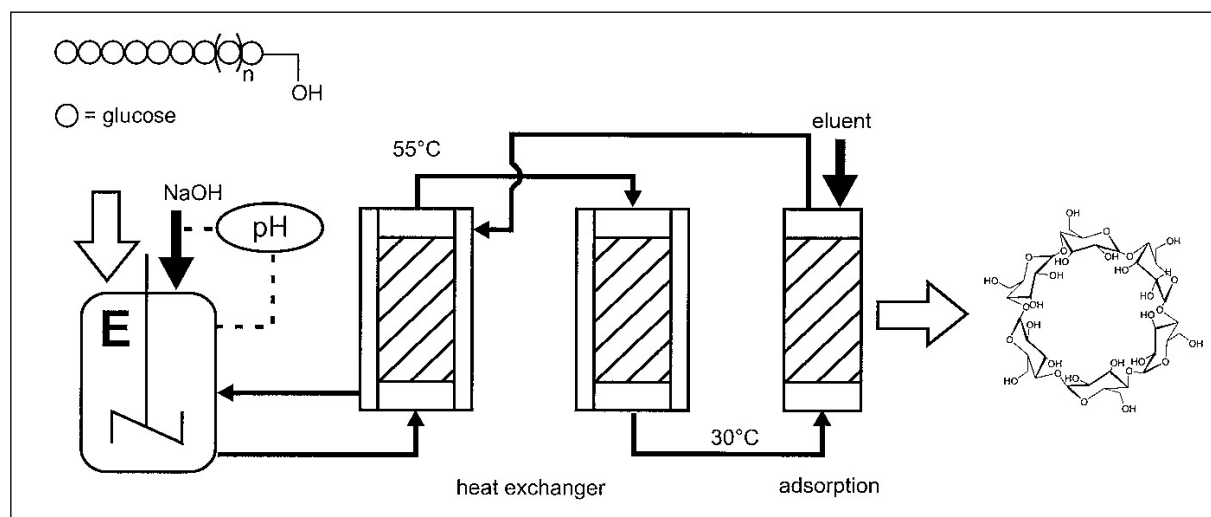
A *B. macerans* által termelt enzim a folyamat kezdeti szakaszában α - és β -CD-ek keverékét termeli, a reakciót elég hosszú ideig kell folytatni ahhoz, hogy a β -CD eltűnjön. A keményítőre számított kitermelés elérheti az 50 %-ot, ennek kb. 90%-a α -CD. A dekanol víz-gőz-desztillációval távolítható el.

γ -CD termelés

A β -CD gyártás melléktermékeként preparálható. A rosszul oldódó β -termék addukt kiválása után kis koncentrációban az anyalúgban marad a γ -CD, a keményítőre vonatkoztatott hozama csak 2%. Innen komplexképzéssel választható ki γ -termék, például metil-etilketon és α -naftol keverékével. Ez a komplex vízben oldhatatlan, metanolban viszont jól oldódik. A komplex megbontása után vízben oldják, ioncserélő oszlopon és/vagy aktív szénnel tisztítják. Betöményítés után kristályosítják.

1.3.1.6. MERCIAN eljárás

A Mercian Co. egy japán cég, amely oldószeres addukt képzése nélkül oldotta meg az egyes ciklodextrin frakciók termelését. Az enzim reakció a hidrolizált keményítőn az előzőekhez hasonlóan megy végbe, oldott enzimmal, 55 °C hőmérsékleten. Az elválasztás a szelektív adszorpción alapul. A reakcióelegyet adszorpciós oszlopokon áramoltatják keresztül majd visszavezetik a reaktorba. A megkötés nagyon szelektív, majdnem eléri az affinkromatográfia specifitását. A hordozó kitozán, egy inert, hidrofil polimer. Az enzim adszorpcióját a tölteten 3% NaCl beoldásával akadályozzák meg. Az α -CD megkötéséhez ligandként sztearinsavat használnak. Szelektivitása igen jó, a kötött frakció tisztasága 95%. A β -CD megkötéséhez egy speciális szerves molekulát találtak, a ciklohexán-propánamid-n-kapronsavat. A technológiai nehézséget az okozza, hogy a két folyamat hőfokoptimuma jelentősen eltér. Az enzim reakció 55 °C-on működik ideálisan, de ez nem kedvez az adszorpciónak. A kolonnákban 30 °C a megfelelő hőfok, de ezen az enzim aktivitása minimális. Emiatt a hőmérséklet változtatására hőcserélőket használnak. A kivett levet lehűtik, majd az oszlopok után visszamelegítik. A jobb hőhasznosítás érdekében a reaktorból jövő oldattal melegítik elő a recirkulált folyadékot (27. ábra).



27. ábra A Mercian eljárás folyamatábrája

A folyamat anyagmérlege: egységnyi dextrinből 22,3% α -CD, 10,8% β -CD és 5,1% γ -CD nyerhető.

1.3.1.7. A ciklodextrinek alkalmazása

A ciklodextrinek zárványvegyületei kiválóan alkalmasak molekuláris csomagolásra, a bezárt anyagok molekuláit egyenként burkolja be a cukorgyűrű. Ezek a vendégmolekulák egyrészt eltűnnek a folyadékból, pontosabban a bezárt és az oldott koncentráció egyensúlyban van. Ugyanakkor a bezárt molekulák könnyen mobilizálhatók, ha az oldatból fogy az anyag, akkor az egyensúly újra beáll, a komplex formából gyorsan felszabadul a kellő mennyiségű molekula.

A molekuláris csomagolás hatásai:

- Növeli az apoláris molekulák vízoldhatóságát. A cukorrészek révén a molekula-komplex polaritása sokkal nagyobb, mint a vendégmolekuláé egyedül.
- Csökken a bezárt anyag illékonysága. A gőznyomás kialakítása szempontjából csak a szabad molekulák koncentrációja számít, a bezártaké nem.
- Javul a bezárt molekula stabilitása. A komplexben kevésbé hozzáférhető a kémiai reakciópartnerek, például az oxidáló ágensek számára.
- Gyógyszerhatóanyagoknál a tároló kapacitás depoképzést tesz lehetővé. A komplexben bevitt gyógyszer mennyiség hosszabban marad a keringésben, elnyújtottabb hatást biztosít.
- Injekció formában bevitt gyógyszereknél előfordul, hogy a hatóanyag a beadás helyén irritálja a szöveteket. Zárványként bevitt molekulák esetében ez a hatás nem lép fel, a ciklodextrinek elszigetelik a hatóanyagot a sejtektől.

A ciklodextrinek felhasználási területe igen széles és egyre bővül. Az éves termelési volumen néhány 100 tonnára becsülhető.

Alkalmazások élelmiszerekben, kozmetikumokban

A fűszerek és más aromás anyagok illóolajait ciklodextrinekbe lehet csomagolni. Így az aromák stabilizálódnak, kevésbé illannak el, és védve vannak az oxidációval szemben is. A hagyma és a fokhagyma olaját bezárva a kellemetlen szag nélkül vihetjük be ezeket a hasznos anyagokat. Olvadt vajból a CD kivonja a koleszterin 90%-át. Kozmetikumokban a bezárással az illatanyagok lassabban illannak el, a termékek hosszabban tárolhatók. Szobahőmérsékleten az illékonyság, azaz az illatintenzitás kicsi, de a bőrre kerülve a magasabb testhőmérséklet hatására felerősödik.

Alkalmazások a biotechnológiában

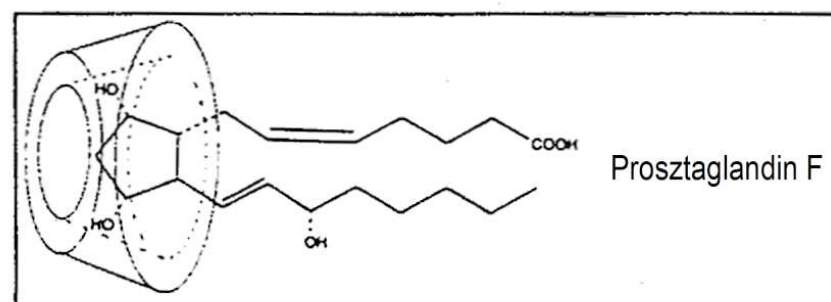
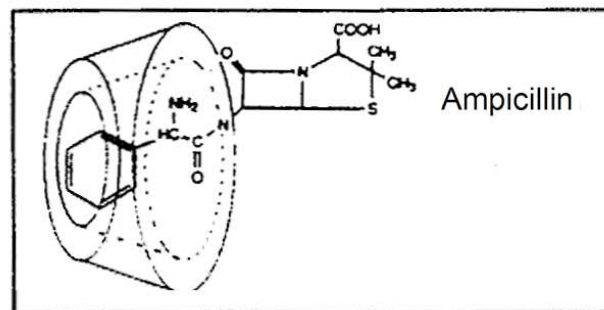
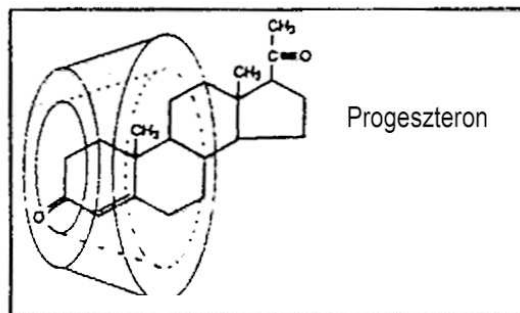
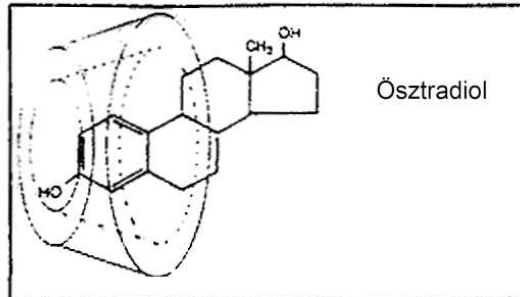
A fermentációs folyamatok során gyakran okoz problémát valamely apoláros komponens rossz vízoldhatósága. Zárványvegyületben alkalmazva ezeket az anyagokat a kellő mennyiségben vihetjük be a rendszerbe.

A *Bordetella pertussis* tenyésztésénél a szabad zsírsavak gátolják a tenyészet növekedését. β -CD hozzáadásával a zsírsavak komplexbe kerülnek, így megindulhat a szaporodás.

A *Mycobacterium leprae* esete éppen fordított. A szaporodást éppen az gátolta, hogy a számára esszenciális palmitin- és sztearinsavat nem tudta a vizes fázisból felvenni. Ha ezeket dimetil- β -CD komplex formában adagolták, a növekedés megindult.

A szteroid konverzióknál általános gond az, hogy mind a szubsztrát, mind a termék rosszul oldódik vizes közegben (a fermentáléban), így „kristályfermentációt” kell végezni, a szteroidok kristályos formában végig jelen vannak a fermentáléban. A szubsztrát hozzáférhetőségének javítására az egyik módszer a ciklodextrin zárványkomplex alkalmazása. Bár nagyon költséges, de ipari méretekben is alkalmazzák a β -CD-t a hidrokortizon \rightarrow prednizolon átalakításnál. A konverzió igen jó, megközelíti a 100%-ot.

Szintén szteránvázis vegyület a növényi eredetű szívgyógyszer, a digoxin. A hatásos főkomponens mellett a növényi sejtek inaktív melléktermékként Lanatozid-C-t is termelnek, ami enzimikus konverzióval digoxinná alakítható. A dimetil- β -CD alkalmazásával az oldhatóság javítása révén az enzimikus folyamat hozama 20%-ról 50-60%-ra növekedett.



28. ábra Ciklodextrin-hatóanyag komplexek

Alkalmazások a gyógyszerekben

Az emberi szervezetbe bevitt gyógyszerek formulálásában is szerepe van a ciklodextrineknek. A felsorolt előnyök közül itt kerül előtérbe az oldhatóság javítás, a depoképzés, az irritáció csökkentése. Néhány példa az alkalmazásra (28. ábra):

Indometacin (gyulladásgátló, de irritatív)

Prostaglandin E₂ + β-CD: szublingualis készítmény, szülés indítására

Prostaglandin E₁ + α-CD: injekciós készítmény, érszűkület kezelésére

Benexate + β-CD: gyomorfekély kezelésére