

Ionos folyadékokban lejátszódó enzimatis észterezési reakciók vizsgálata integrált rendszerben

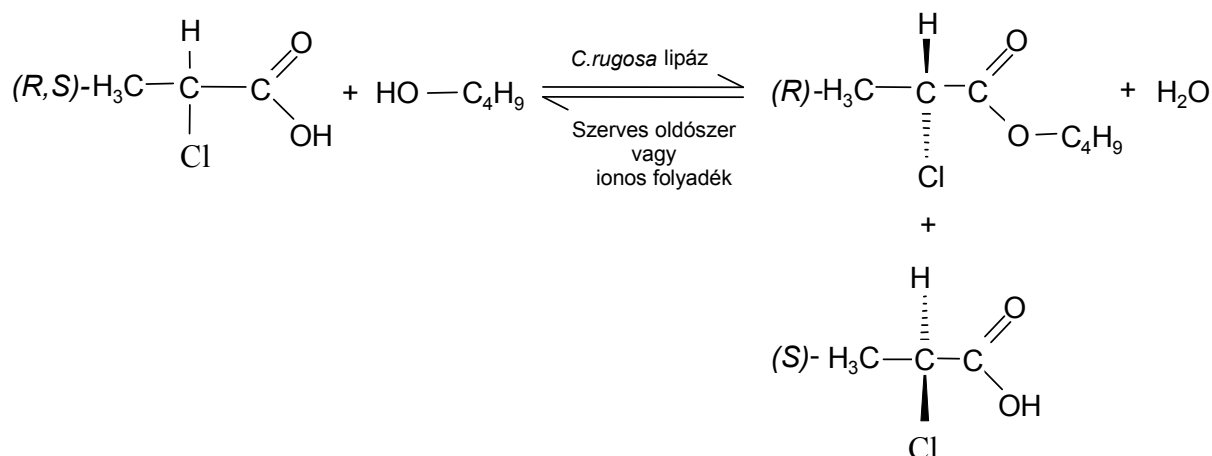
ZÁRÓJELENTÉS

Az ionos folyadékok tulajdonságai

Az ionos folyadékok olyan szerves sók, amelyek szobahőmérsékleten folyékony halmazállapotúak. A hagyományos oldószerektől eltérően, amelyek molekuláris folyadékként jellemezhetők, az ionos folyadékok ionokból állnak. Jóllehet számos ionos folyadék már évtizedek óta ismert, csak az elmúlt néhány évben kerültek a figyelem középpontjába mint jövőben alkalmazandó korszerű, környezetbarát reakcióközegek. Ennek a legfőbb oka igen alacsony gőznyomásuk, hőmérsékleti stabilitásuk, valamint az, hogy a kation és az anion megfelelő módosításával széles körben variálhatók bizonyos tulajdonságaik, mint a polaritás, hidrofób jelleg valamint más oldószerekkel való elegyedés. Ezen utóbbi tulajdonságuk alapján az ionos folyadékok „tervezhető oldószerek”, amelyek a jövőben várhatóan sok helyen kiszorítják a „hagyományos” szerves oldószereket. Ilyen területek a szerves szintézis, katalízis, elektrokémiai és szeparációs alkalmazások. A különböző típusú enzimek széles skálája mutat katalitikus aktivitást ionos folyadékokban, illetve víz-ionos folyadék kétfázisú rendszerben. Különösen a lipázok tartják meg aktivitásukat vízmentes ionos folyadék közegben, (enantio)szelektivitásuk, és stabilitásuk számos esetben nagyobb, mint hagyományos közegekben. Az ionos folyadékok nem-konvencionális oldószer jellegű tulajdonságai kihasználhatók a biokatalizátor visszaforgatása és a termék visszanyerése esetében, ami hagyományos oldószerek esetén nem megvalósítható. Az ionos folyadékokban lejátszódó enzimkatalitikus reakciókról 2000 őszén jelent meg az első közlemény, az ezzel kapcsolatos irodalmi összefoglaló megtalálható a pályázati témához kapcsolódó disszertációkban.

Enantioszelektív észterezés ionos folyadékokban

Munkánkban két tesztreakció példáján vizsgáltuk az ionos folyadékok alkalmazhatóságát. Az egyik tesztreakcióul a racém 2-klór-propionsav enantioszelektív észterezését választottuk, ami *Candida rugosa* (Sigma-Aldrich) lipáz enzim jelenlétében játszódik le. A reakciót korábban már vizsgáltuk szerves oldószerekben, így számos összehasonlítási lehetőségre nyílt módunk. A reakció elvi sémája az 1. ábrán látható.



1. ábra: A vizsgált tesztreakció elvi sémája

A reakciót szerves oldószerben végrehajtva a minták közvetlenül elemezhetők gáz-kromatográffal 25-m FS-LIPODEX E királis oszlopot alkalmazva (Macherey-Nagel, Aachen, Németország). Az oszlop kiváló elválasztást ad az (R)- és az (S)-észterekre. Az ionos folyadék oldószeresek ugyanakkor nem kerülhetnek a GC oszlopra, ezért a reakcióelegyből a komponenseket extrakcióval kellett eltávolítani. Megállapításaink szerint a legkisebb munka- és anyagráfördítással hexánnal végezhető el az extrakció a kellő pontosság mellett.

Kísérleteink során ionos folyadékokban ([bmim]PF₆, (1-butil-3-metil-imidazolium-hexafluoró-foszfát), [onim]PF₆, (1-metil-3-nonil-imidazolium-hexafluoró-foszfát) [bmim]BF₄) (1-butil-3-metil-imidazolium-tetrafluoró-borát) és összehasonlításul szerves oldószeresekben (n-hexán, toluol, tetrahidrofurán) vizsgáltuk a reakciót. Célunk ezeknek a szerves oldószereseknek a kiválasztásával az volt, hogy átfogjuk azt a log P tartományt, amelyben eddigi ismereteink szerint a lipáz enzimek alkalmazhatók voltak. Azt tapasztaltuk, hogy a tetrafluoro-borát aniont tartalmazó, vízzel elegyedő ionos folyadékban csak igen kis sebességgel játszódott le a reakció. Itt is érvényesülni látszott az a tendencia, hogy összefüggés van az enzim aktivitás és az oldószer log P értéke között. Mivel mindössze egyetlen ionos folyadékra találtunk log P értéket a szakirodalomban, ezért az irodalomból ismert módszerrel meghatároztuk azokat. Amint az 1. táblázat adataiból látható, az ionos folyadékok log P értéke lényegesen kisebb, mint a szerves oldószereseké. Az ionos folyadékok közül a legmagasabb észter hozamot a hidrofób, vízzel nem elegyedő [bmim]PF₆-ban kaptuk. Megállapítható az is, hogy ionos folyadékoknál olyan log P értékek mellett is lejátszódik a reakció, amelyeknél szerves oldószeres esetében egyáltalán nem megy végbe, tehát az eddig ismert log P – enzim aktivitás összefüggés ionos folyadékok esetében nem alkalmazható.

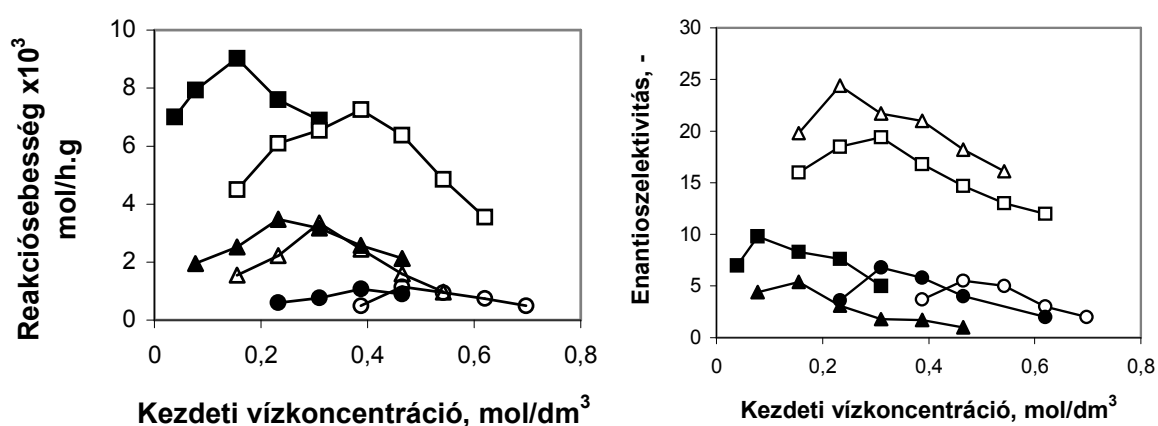
1. táblázat: A log P értékek hatása az észter hozamra (reakcióidő: 2 óra)

Oldószer	Log P,-	Hozam, %
[bmim]BF ₄	-2.44 ± 0.23	4.6
[bmim]PF ₆	-2.38 ± 0.25	29.0
[onim]PF ₆	-2.19 ± 0.24	13.4
Tetrahidrofurán	0.5*	4.3
Toluol	2.5*	13.9
n-Hexán	3.5*	36.1

* irodalmi adatok

Az észterezési reakció során keletkező víz szerves oldószerek alkalmazásakor erősen befolyásolja a lipáz enzim enantioszelektivitását. Első kísérleteinkben ezért a reakciót csak maximum 10 % konverzióig vizsgáltuk. Számításaink szerint ugyanis az eddig képződő víz nem befolyásolja számottevően sem a rendszer víztartalmát, sem pedig vízaktivitását.

Amint az a 2. ábrán látható, a kezdeti víztartalom függvényében mind a reakciósebesség, mind pedig az enantioszelektivitás optimum görbe szerint változott. Az egyes oldószerekhez tartozó optimális értékek eltérőek, és különbözik egy adott oldószer optimuma a reakciósebesség illetve az enantioszelektivitás tekintetében (2. és 3. táblázat). Ez azt jelenti, hogy a legkedvezőbb paraméterek meghatározásánál el kell döntenünk, hogy az aktivitást vagy az enantioszelektivitást szeretnénk optimalni.



2. ábra: A vízkoncentráció hatása a reakciósebességre és az enantioszelektivitásra. (10 % konverzió, 30 °C)

▲ -toluol, ■ -n-hexán, ● -tetrahidro-furán, □ -[bmim]PF₆, △ -[onim]PF₆, ○ -[bmim]BF₄

2. táblázat: A hozam szempontjából optimális vízkoncentráció (c_w (hozam)) a 2-klór-propionsav észterezése során, (2 h, 30 °C)

Oldószer	Log P,-	c_w (hozam), mol/dm ³	Hozam, %	E,-
[bmim]BF ₄	-2.44 ± 0.23*	0.54	4.6	5
[bmim]PF ₆	-2.38 ± 0.25*	0.38	29.0	17
[onim]PF ₆	-2.19 ± 0.24*	0.31	13.4	22
Tetrahidro-furán	0.5**	0.38	4.3	4
Toluol	2.5**	0.23	13.9	3
1-Hexán	3.5**	0.15	36.1	8

* A „rázatott lombikos” módszerrel, általunk meghatározott értékek

** Irodalmi adatok

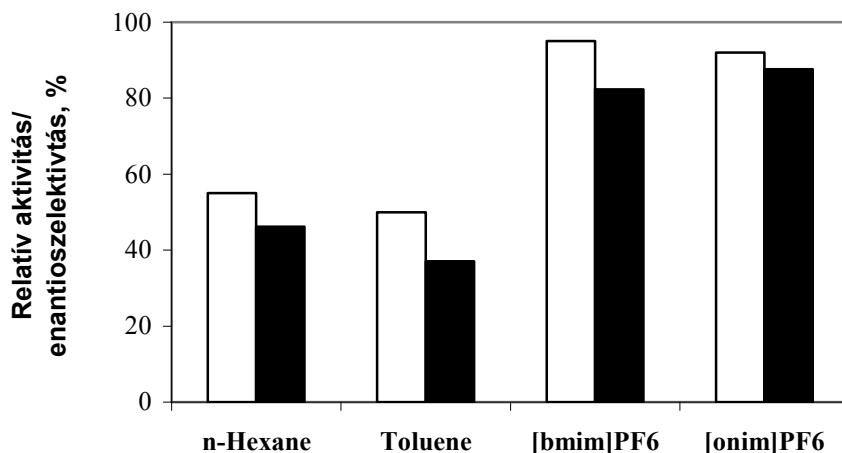
3. táblázat: Az enantioszelektivitás szempontjából optimális vízkoncentráció ($c_w(E)$) a 2-klór-propionsav észterezése során (2 h, 30 °C)

Oldószer	Log P,-	$c_w(E)$, mol/dm ³	Hozam, %	E,-
[bmim]BF ₄	-2.44 ± 0.23*	0.46	4.0	6
[bmim]PF ₆	-2.38 ± 0.25*	0.31	26.2	19
[onim]PF ₆	-2.19 ± 0.24*	0.23	8.9	24
Tetrahydro-furán	0.5**	0.31	3.2	5
Toluol	2.5**	0.15	10.1	5
1-Hexán	3.5**	0.08	31.7	10

* A „rázatott lombikos” módszerrel, általunk meghatározott értékek

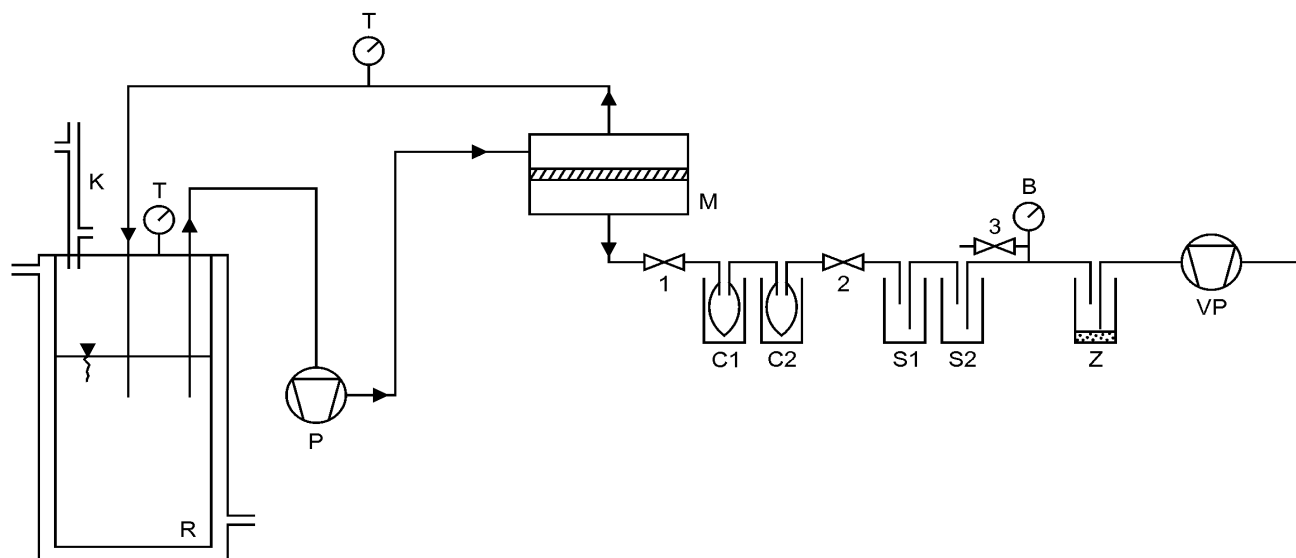
** Irodalmi adatok

Vizsgáltuk a *Candida rugosa* lipáz aktivitásának és enantioszelektivitásának változását 5 reakció ciklusban. Azt tapasztaltuk, hogy az ionos folyadékokban mindkét paraméter magasabb volt, mint a hagyományos szerves oldószerekben (3. ábra).



3. ábra: A *Candida rugosa* lipáz enzim aktivitása különböző oldószerekben az 5. felhasználást követően. (t = 5 h, T = 30 °C, aktivitás az első reakcióban = 100%), □-relatív aktivitás, ■-relatív enantioszelektívás.

Miután szakaszos rendszerben meghatároztuk a reakció optimális paramétereit, az enzim működésére leginkább hatással levő paraméter részletes vizsgálatára tértünk át. Az állandó víztartalmat a reakció során a víz folyamatos, pervaporációval történő eltávolításával kívántuk biztosítani. A 4. ábrán bemutatott berendezésben a korábban ismertetett ionos folyadék - víz elegyekkel modellkísérleteket végeztünk és meghatároztuk azokat a paramétereiket (hőmérséklet, cirkulálási sebesség, vákuum), amely mellett éppen a reakcióban keletkező mennyiségű víz távolítható el. A vizsgált membrántípusok (CMC-CE-02, CMC-CF-23, CMC-VP-43, PERVAP 2201, PERVAP 2202 és PERVAP 1005) közül a CMC-VP-43 és a PERVAP 1005 bizonyult mind anyagátadási, mind szelektívási, mind pedig a vegyszerekkel szembeni stabilitás szempontjából alkalmasnak. A 156.8 cm² felületű membránon keresztül az alkalmazott vákuum értékének változtatásával tudtuk szabályozni a vízelvételt és tudtuk elérni, hogy a reakció az optimális víztartalom mellett játszódjon le.



4. ábra: Az integrált rendszerű érzékelés megvalósítására szolgáló berendezés vázlatja.
 R – reaktor, T – hőmérő, K – kondenzátor, P – szivattyú, M – membrán modul, C1, C2 –
 szárazjeges csapdák, S1, S2 – szilikonolajos csapda, Z – zeolit, VP – vákuumszivattyú, 1, 2, 3
 – szelepek, B – nyomásszabályozó szelep

Kis szénatomszámú savak és alkoholok érzékelése

Korábbi munkáinkban már tanulmányoztuk a természetes aroma észterek (kis szénatomszámú savak és alkoholok észterei) előállítását szerves oldószerekben, oldószermentes rendszerben. Az ionos folyadékokban végzett vizsgálatok eredményeképpen összehasonlítást tudunk végezni a három különböző rendszer között. Ebben az esetben tesztreakcióul az etil-acetát előállítását választottuk etanolból és ecetsavból kiindulva. Ismeretes, hogy ezek az anyagok erős enzim inhibitorok, így vizsgálatuk külön nehézséget jelentett. Valamennyi esetben a legfontosabb paraméter a reakcióelegy vízakivitása és az érzékelési reakcióban képződő víz eltávolítása, amire különböző megoldásokat alkalmaztunk.

A három különböző módon végzett érzékelés eredményeit összehasonlítva megállapítható, hogy a reakció valamennyi közegben végrehajtható. Összehasonlításként a 4. táblázatban az etil-acetát előállítása során szerzett tapasztalatokat vetjük össze. Választásunk azért erre az anyagra esett, mert ez az egyik, enzinkatalitikus reakcióval legnehezebben előállítható aroma észter, tekintve, hogy mind a kiindulási ecetsav, mindpedig az etanol erős szubsztrátum gátlást okoz. Az értékeléshez kevés számszerű adatot használtunk, inkább csak paraméterek összehasonlítását végeztük. Kivétel az aktiválási energia, ezek összevetéséből látható, hogy az ionos folyadékokban és a szerves oldószerekben értékük közel azonos. Az oldószermentes közegben mért nagy aktiválási energia a magyarázata annak, hogy itt a reakció csak kis reakciósebességgel játszódik le.

A környezetszennyezés szempontját vizsgálva egyértelmű az ionos folyadékok kedvező besorolása, itt még az oldószermentes közeg is megelőzi a szerves oldószereket. Az enzim stabilitását vizsgálva szintén az ionos folyadék kapta a legkedvezőbb besorolást, itt a szerves oldószer megelőzi az oldószermentes közeget. Hasonló a helyzet az enzim visszanyerésénél, a produktivitás vizsgálatokor viszont kiemelkedő az ionos folyadékot

alkalmazó rendszer előnye. A szabályozhatóság megítélésénél a víz elvétel lehetőségét vettük alapul, s ebben a heteroazeotróp desztilláció illetve az oldószermentes közegből végzett vízel távolítás könnyebben megvalósítható, mint ionos folyadék esetében. Hozzá kell tenni azonban, hogy az ionos folyadék rendkívül drága, ezért a pervaporációt egy mindössze 10 cm²-es membránnal végeztük. Léptéknövelés esetében ez a besorolás változhat. Legutoljára hagytuk a toxicitás kérdését. Itt egyértelmű, hogy az alkalmas szerves oldószerek toxikusabbak, mint a feleslegként alkalmazott alkohokok. Az ionos folyadékoknál még nem lehet e kérdésben állást foglalni, ugyanis toxicitásuk vizsgálata most folyik. Néhány anyagra ugyan már ismertek az adatok, ezek kedvezőek (nem toxikusabbak, mint az etanol), de egy általános megfogalmazás még korai lenne.

4. táblázat: A három különböző közegben végzett észter előállítás összehasonlítása

Oldószer	Környezet-szennyezés	Toxicitás	Enzim stabilitás	Enzim visszanyerés	Produktivitás	¹ Aktiválási energia, kJ/mol	Szabályozhatóság
Szerves oldószer	---	--	++	++	+	31.4	++
Oldószermentes	-	-	+	+	+	52.8	++
Ionos Folyadék	-	?	+++	+++	+++	31,1	+

¹Etil-acetát előállítás során, etanol és ecetsav kiindulási anyagokat alkalmazva

A szakaszos rendszerben megtörtént az optimális paraméterek meghatározása, ezt követte a reakció megvalósítása integrált rendszerben, NOVOZYM 435 lipáz enzim (NOVO) jelenlétében. Ebben az esetben – túllépve az eredeti célkitűzéseken – egy olyan rendszert alakítottunk ki, amelyben nemcsak a reakcióban keletkező vizet, hanem a képződő észtert is folyamatosan eltávolítottuk egy másik, az előzőtől függetlenül működő pervaporációs berendezéssel. Ebben a víz eltávolítására az előzőekben ismertetett pervaporációs berendezés mellett egy hidrofób, PERVAP 2255-50 membránt alkalmaztunk. Az előzetes vizsgálataink szerint ennek fluxusa lényegesen nagyobb volt, így az alkalmazott membrán felület mindössze 15.7 cm². Az elreagáló savat és alkoholt a fogyás ütemében egy adagoló szivattyúval folyamatosan pótoltuk, így biztosítottuk, hogy a reakcióelegyben mindig az optimális 1 : 3 sav : alkohol molarány legyen jelen, továbbá, hogy a szubsztrátum gátlást okozó sav koncentrációt a lehető legkisebb értéken tartjuk. A termékek analízise során megállapítottuk, hogy a víz mellett nyomnyi mennyiségű ecetsav is megjelent, de ionos folyadékot nem tudtunk kimutatni a permeát oldalon. A szakaszos vizsgálatok eredményeivel összhangban az etil-acetát mellett kis mennyiségű etanol is kimutatható volt (szeparációs faktor $\gamma = 0.92$). Mivel az aroma észtereket, így az etil-acetátot is etanolos oldatban használják fel, ez az etanol mennyiség az esetleges végfelhasználást semmilyen tekintetben sem befolyásolja. Az etanol ilyenfajta többletfogyását a betáplált sav : alkohol elegy összetételének megállapításánál korrigáltuk. Így teljesen folyamatos működésű berendezést alakítottunk ki, ami 40 órán keresztül működött gyakorlatilag elhanyagolható enzim aktivitás csökkenés mellett. A kialakított berendezés fényképe a 5. ábrán látható. Ismereteink szerint ilyen kialakítású berendezést az irodalomban még nem közöltek, ezért vizsgáljuk annak lehetőségét, hogy iparjogvédelmi bejelentést tegyünk, és csak ezt követően publikáljuk eredményeinket.



5. ábra: A folyamatos észterezésre kialakított berendezés fényképe

Publikációs tevékenység

A szerződésben vállaltaknak megfelelően éves átlagban egy, összesen négy publikációt jelentettünk meg referált folyóiratban, és még legalább egy megjelentetését tervezzük a legutóbbi időszak eredményeinek közzétételére. Ezekre a közleményekre eddig összesen 40 SCI hivatkozást kaptunk. A legutóbbi vizsgálatok eredményeit (aromászterek előállítás folyamatos rendszerben) a Process Biochemistry című lapban kívánjuk közzétenni. Az elért eredmények további nemzetközi elismerése, hogy a „Green Solvents for ...” konferencia sorozatban poszterünk 2002-ben második, 2004-ben pedig első díjat nyert. Ugyancsak első díjat nyert a 2003-ban a genti 17th Forum for Applied Biotechnology rendezvényen bemutatott poszterünk. A szakma hazai képviselőinek elismerést jelzi a 2004-es Fermentációs Kollokviumon kiosztott legjobb fiatal előadónak jóró díj. Nemzetközi elismerést jelent az a személyes felkérés, hogy azACHEMA 2006 konferencián tartsunk előadást a „Green Solvents for Environmentally Friendly Processes” szekcióban.