

Nem-konvencionális közegben történő természetes etil-acetát enzimes szintézisének vizsgálata

Amir Kabiri Badr

A Veszprémi Egyetem Vegyészmérnöki Doktori Iskolájához benyújtott

PhD értekezés



Témavezetők:
Bélafiné dr. Bakó Katalin
és
Dr. Gubicza László

VE MÜKKI



2005

Bevezetés

Napjainkban egyre több természetes aromát használnak az élelmiszeriparban, kozmetikai, gyógyszeriparban, valamint a különféle italok gyártásánál, mivel a fogyasztók előnyben részesítik a természetesként jelölt élelmiszeradalékokat. A „természetes” kifejezés gyakran pozitív kicsengésű, míg a „mesterséges” szóhoz negatív érzések társulnak. A közvetlenül a gyümölcsökből kinyerhető aromák köre meglehetősen korlátozott és összetételük főképp a klíma, az időjárás és a talajviszonyok függvénye. Ezért növekvő igény van olyan megbízható előállítási módszerekre, amelyekkel jó minőségű természetes aromákat lehet nagy mennyiségben nyerni.

Az aromák egyik igen fontos csoportja az észterek. Ezeket az észtereket lipáz enzimmal nem-vizes közegben, pl. szerves oldószerben lehet előállítani. Egy további kihívást jelent azonban, hogy a folyamat során a szerves oldószer felhasználását is kiküszöböljük. Így ugyanis az aroma-észter az oldószer nyomoktól is mentes lesz, s a termék még „természetesebbnek” tekinthető.

Ebben a PhD munkában az ecetsav és az etanol észterezési reakcióját tanulmányoztam. A folyamatot egy biokatalizátor: rögzített lipáz enzim segítségével valósítottam meg. Az észterezés egy igen illékony aroma-észter komponenst eredményezett: etil-acetátot, valamint víz képződött, mint melléktermék. A kutatómunka során mind az oldószerben, mind az oldószer-mentes közegben végzett reakció kinetikáját vizsgáltam, szabályozott víztartalom mellett, valamint a képződött észter kinyerési lehetőségeit tanulmányoztam. Ezeken kívül a folyamat integrált rendszerben történő megvalósításával foglalkoztam, amelynek célja a hatékonyság növelése volt.

Kísérleti módszerek

A rázatott lombikos, hetero-azeotróp desztillációs, pervaporációs illetve adszorpciós vizsgálatoknál, valamint az integrált rendszerben végzett mérések során az etanol és az etil-acetát koncentrációját a mintákban gázkromatográfiával határoztam meg. A víztartalmat Karl-

Fischer módszerrel elemeztem, míg az ecetsav koncentrációját KOH oldat segítségével, titrálással mértem meg.

Eredmények

1. Az észterezési reakció

Elsőként a reakció körülményeknek a lipáz enzimmel katalizált természetes etil-acetát képződésére gyakorolt hatását tanulmányoztam. Kísérleteket végeztem n-heptán oldószerben különböző kiindulási ecetsav és etanol koncentrációk mellett a rendszer vizsgálata céljából, illetve a reakció kinetikájának leírásához, valamint meghatároztam számos paraméter (pl. kezdeti sav és alkohol koncentráció molaránya) hatását. A következő lépésben az oldószer-mentes, két-komponensű rendszert vizsgáltam, ahol szintén az optimális kezdeti sav és alkohol koncentráció volt a legfontosabb meghatározandó paraméter. Az oldószer-mentes és az n-heptános rendszert összehasonlítva, az idő-görbékből számított reakció sebességek az oldószeres közegben jóval magasabbnak adódtak, mint az oldószer-mentes közegben.

Megállapítottam, hogy mindkét rendszerben szubsztrát inhibíció lépett fel az észterezés során. A reakció kinetika leírásához a Michaelis-Menten modellt használtam, s az oldószermentes rendszerben kiszámítottam a maximális reakciósebességet, a Michaelis állandót, valamint az inhibíciós állandót.

A hőmérsékletnek az észterezésre gyakorolt hatását a 25 és 80 °C közötti tartományban vizsgáltam. A legnagyobb etil-acetát képződési sebességet 60 °C-on tapasztaltam. Az észterezési reakció aktiválási energiája az oldószer-mentes közegben 52,9 kJ/mol-nak adódott, s ezt az értéket összehasonlítottam más rendszerekben nyert adatokkal.

2. Víz eltávolítási lehetőségek

A/ Észterezés szerves oldószerben hetero-azeotróp desztillációval történő víz eltávolítással összekapcsolva

Az észterezési reakció során víz képződik, mint melléktermék, amely erős inhibíciós hatást gyakorol az enzim aktivitására. A hozam javítása céljából a vizet el kell távolítani, s

szintjét egy állandó értéken kell tartani. Hetero-azeotróp desztillációs eljárással, n-pentánt (igen alacsony forráspontú oldószer) alkalmaztunk oldószerként, amely vízzel alacsony forráspontú hetero-azeotróp elegyet képez, s a rendszerből együtt párolognak el.

A víz eltávolítási kísérleteket megelőzően számos laboratóriumi előkísérletet végeztem, hogy megállapítsam az optimális kezdeti sav-alkohol mólarányt n-pentán oldószerben. E mérések eredményei azt mutatták, hogy 1:3 sav-alkohol mólarány felett a hozam már nem nő.

Ezután egy összetett, félüzemi méretű berendezést állítottunk össze, ahol az enzimes észterezési reakciót n-pentánban hetero-azeotróp desztillációval kapcsoltuk össze és 120 órás kísérletet végeztünk fél-folytonos üzemeltetési módban. Ez bebizonyította, hogy a hetero-azeotróp desztilláció alkalmas módszer arra, hogy a reakció keverékben a víztartalmat egy állandó értéken tartsuk.

B/ Víz eltávolítása adszorpcióval

Ha az észterezési reakciót oldószer-mentes közegben visszük véghez, a hetero-azeotrópos módszert nem lehet használni a víz eltávolítására. Ezért egy másik eljárást, az adszorpciót teszteltem e célból, ahol A4 zeolitot használtam. Fél-szakaszos eljárással távolítottam el a vizet a rendszerből. A kísérleteket 5:1 etanol-ecetsav aránynál végeztem, s a kezdeti víztartalmat 0,5 %-ra állítottam be. Bár a jelenlévő ecetsav rongálhatja a zeolit szerkezetét, az adszorpció módszer alkalmasnak és megbízhatónak bizonyult a víz eltávolítására.

3. Pervaporáció alkalmazása az észter kinyerésére

A pervaporációs modul, amelyet a kísérletekhez használtam egy GFT teszt cella volt (Sulzer, Németország). A készülékbe helyezett kerek polimer membrán lap két részre osztotta a berendezést: egy felső részre, ahol két csomópont volt a recirkulációhoz; és egy alsó részre, ahonnan a permeátumot lehetett elvenni. A betáplált elegyet folyadék formában a felső részen recirkuláltattam, míg a permeátumot gőz formájában egy vákuum szivattyú és hűtött csapadék segítségével nyertem ki az alsó részen. A pervaporációs modul szerkezetét többször

módosítottam (termosztáló köpeny kialakítása, bemenet átalakítása), ami az egység működési hatékonyságát nagymértékben növelte.

A pervaporáció egy adott szeparációnál való alkalmazásakor a legfontosabb dolog a megfelelő membrán kiválasztása, majd kísérleti jellemzése. A két fő jellemző paraméter a membrán fluxusa és a szelektivitása.

A fő termék, az etil-acetát elválasztása a reakció keveréktől hidrofób pervaporációs membránnal lehetséges. A mérések során meghatározott szelektivitás és a fluxus azt mutatta, hogy a permeátumban lehetséges az etil-acetátot töményíteni (a betápláláshoz képest), s így a pervaporáció alkalmas az adott célra. Vizsgálataim eredményeként megállapítottam, hogy a GFT PV 1060 membrán átlagos szelektivitása 5,1 volt, míg fluxusa $1,6 \text{ kg/m}^2 \text{ h}$.

4. Enzimatisz észterezés integrált rendszerben

Az észterezés tipikus egyensúlyi reakció: a szintézis felé úgy lehet kényszeríteni a reakciót, ha pl. a termékeket eltávolítjuk. Ráadásul, az oldószer-mentes közegben a várható konverzió és reakció sebesség jóval kisebb, mint a szerves oldószerben, így nagyobb erőfeszítést igényel a reakció hatékonyságának javítása. Ezért a víz eltávolításán túl a képződő észter szimultán kinyerését tűztam ki célul, mint egy ígéretes eljárást a szintézis elősegítésére.

Integrált észterezési rendszert terveztem a korábbi vizsgálatok eredményei alapján. A rendszer központi eleme egy kevert tartály reaktor, amely termosztálható. A reakció keveréket a reaktorba helyezve egy szivattyú segítségével cirkuláltattam, egyrészt átvézetve a zeolittal töltött oszlopok egyikén, víz eltávolítás céljából, másrészt a pervaporációs cella felső részén. A membrán modul másik oldala vákuum alatt volt, és a permeátum kondenzálására hűtött csapdákat építettem be a rendszerbe a modul és vákuum szivattyú közé. GFT PV 1060 membránt használtam. A folyamatos működtetéshez két, párhuzamosan kötött, zeolittal töltött oszlopot építettem be a rendszerbe. A keverést a reaktorban a reakció keverék cirkulálása biztosította, míg az enzim készítményt üvegszál-tömítés tartotta bent a reaktorban.

A reakció keverék teljes mennyisége 200 ml volt (kezdeti sav-alkohol molarány 1:20 volt), és 4 g enzimet használtam a folyamathoz. Mindkét kolonnába 12 g zeolitot töltöttem. A reaktor hőmérséklete 40 °C volt és a modul permeátum oldalán a nyomás 8 kPa. Ahogy a reakció elindult, a reakció keveréket elkezdtem cirkuláltatni. A membrán modul folyamatosan működött, míg a kolonnák egyikét csak szabályos időközönként használtam. Mind a reaktorból, mind a permeátumból rendszeresen vettem mintákat.

A rendszerben a lipázzal katalizált észterezési reakció oldószer-mentes közegben szimultán pervaporációs észter kinyeréssel és adszorpció víz eltávolítással volt összekapcsolva. Megállapítottam, hogy az integrált rendszerben magasabb konverziót lehetett elérni, és a két működés közötti különbség több mint 20 % volt. Tehát az integrált rendszer valóban jobb hatékonysággal működött. Az ipari megvalósításhoz azonban, további kísérletek, esetleg nagyobb léptékű mérések szükségesek, s vizsgálni kell a gazdaságossági kérdéseket is.

Eredményeim alapján megállapítható volt, hogy ezek a komplikált reakciórendszerek valóban hasznosak, hatékonyak és remélhetőleg jó például szolgálnak más, hasonló oldószer-mentes enzimes reakció megvalósításához a közel jövőben.

Publikációk

Közlemények

1. Bélafi-Bakó, K., Kabiri-Badr, A., Szamosszegi, V., Keöves, E., Koszorz, Z., Gubicza, L.: Production of natural flavour esters by lipase in integrated system, *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, **64/5a**, 311-4 (1999)
2. Gubicza, L., Kabiri Badr, A., Keöves, E., Bélafi-Bakó, K.: Large scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal, *J. Biotechnol.* **84**(2) 193-6 (2000)
3. Bélafi-Bakó, K., Kabiri-Badr, A., Dörmő, N., Gubicza, L.: Pervaporation and its application as downstream or integrated process, *Hung. J. Ind. Chem.* **28** 175-9 (2000)
4. Koutinas, A., Bélafi-Bakó, K., Kabiri-Badr, A., Tóth, A., Gubicza, L., Webb, C.: Enzymatic hydrolysis of polysaccharides, Hydrolysis of starch by an enzyme complex from fermentation by *Aspergillus awamori*, *Food and Bioproducts Processing, Transactions IchemE, Part C*, **79** 41-45 (2001)
5. Bélafi-Bakó, K., Kabiri-Badr, A., Nemestóthy, N., Ehrenstein, U., Gubicza, L.: Kinetics of ethyl acetate formation by lipase in organic solvent and solvent-free system, *Chem. Pap.* **57** 278-281(2003)

Proceedingek

6. Bélafi-Bakó, K., Kabiri-Badr, A., Gubicza, L.: Bioconversion by Lipase in Integrated System, *Proc. ICOM'99, Toronto*, (Kanada) CD Rom (1999)
7. Kabiri Badr, A., Ehrenstein, U., Bélafi-Bakó, K., Kabasci, S., Kümmel, R., Gubicza, L.: Enzymatic production of natural flavour ester in integrated system, *Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Eng. Stuttgart* (Németország), pp. 176-80 (2000)
8. Kabiri Badr, A., Szabó, I., Pal, T.K., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.: Water removal by molecular sieves and their regeneration, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, Proceedingek*, pp. 231-233 (2000)
9. Dörmő N., Kabiri Badr, A., Ehrenstein, U., Bélafiné Bakó K., Gubicza L.: Kozmaolaj felhasználása természetes aroma észterek előállítására, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, Proceedingek*, pp. 219-224 (2000)
10. Bélafi-Bakó, K., Koutinas, A., Kabiri-Badr, A., Keöves, E., Gubicza, L., Webb, C.: Membrane bioreactors for utilisation of polysaccharides, *Proc. 8th World Filtration Congress, Brighton*, (Anglia, Egyesült Királyság) pp. 725-28 (2000)
11. Bélafi-Bakó, K., Keöves, E., Sárfalvi, N., Kabiri Badr, A., Galán, M.A.: Membrane bioreactors for hydrolysis of lard by lipase, *Proc. 4th Int. Conf. Catalysis in Membrane Reactors, Zaragoza*, (Spanyolország) pp. 133-34 (2000)
12. Kabiri Badr, A., Bélafi-Bakó, K.: Modification of a lab-scale pervaporation unit, *Proc. Annual Membrane Technical Conference, Tata*, 2000, 33-36
13. Ehrenstein, U., Kabiri Badr, A., Bélafi-Bakó, K., Kabasci, S., Kümmel, R., Gubicza, L.: Continuous product removal by pervaporation during enzymatic esterification, *Proc. Annual Membrane Technical Conference, Tata*, 2000, 41-42
14. Ehrenstein, U., Kabasci, S., Kümmel, R., Kabiri Badr, A., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.: Enzymatic esterification with continuous water removal. *Proc. 11th World Congress on Biotechnology, Berlin*, (Németország) Vol. 4. pp. 477-479 (2000)

Előadás

15. Kabiri Badr, A., Bélafi-Bakó, K.: Enzymatic production of flavour esters coupled with pervaporation, előadás a MTA Vegyipari Műveleti Munkabizottság ülésén, Veszprém, 1999. október 15.

Konferencia összefoglalók

16. Kabiri Badr, A., Szamosszegi V., Bélafiné Bakó K., Gubicza L.: Természetes aromaészter előállítása integrált rendszerben, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 1999. április 27-29.
17. Kabiri Badr, A., Keöves, E., Székely, K., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.: Natural flavour ester production by lipase in integrated system, *XVIth Summer School of EMS, Veszprém*, 1999. augusztus 23-27.
18. Kabiri Badr, A., Szamosszegi, V., Pal, T.K., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.: Water removal in esterification by lipase, *XVIth Summer School of EMS, Veszprém*, 1999. augusztus 23-27.
19. Kabiri Badr, A. et al.: Ethyl-acetate production in an integrated process, *8th Mediterranean Congress of Chemical Engineering, Barcelona*, 1999. november 10-12.

Hivatkozások

Gubicza, L., Kabiri Badr, A., Keöves, E., Bélafi-Bakó, K.: Large scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal, *J. Biotechnol.* **84**(2) 193-6 (2000)

- Meissner, J.P., Carta, G.: Continuous regioselective enzymatic esterification in a simulated moving bed reactor, *Ind. Eng. Chem. Res.* **41**(19) 4722-4732 (2002)
- Güvenc, A., Kapucu, N., Mehmetoglu, Ü.: The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system, *Proc. Biochem.* **38** 1-8 (2002)
- Karra-Chaabouni M, Pulvin S, Thomas D, et al.: [Role of water activity on the synthesis of geranyl butyrate by a Mucor miehei esterase in a solvent-free system](#), *Biotechnol. Lett.* **24** (23) 1951-1955 (2002)
- Karra-Chaabouni M, Zouari N, Frikha O, et al.: [Synthesizing natural flavours and reducing oil acidity level in a solvent-free system](#), *OCL-OL CORPS GRAS LI* **9** (4) 260-263 (2002)
- Macedo GA, Lozano MMS, Pastore GM: [Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from Rhizopus sp](#), *ELECTRON J BIOTECHN* **6** (1) 72-75 (2003)
- Guvenc A, Kapucu N, et al: [Optimization of the enzymatic production of isoamyl acetate with Novozym 435 from Candida antarctica](#), *CHEM ENG COMMUN* **190** (5-8) 948-961 2003
- Koszorz Z, Ziobrowski Z, Krupiczka R: [Esterification kinetics of phthalic anhydride with ethanol on sulfuric acid catalyst](#), *INZ CHEM PROCESOWA* **24**(1): 131-138 2003
- Koszorz Z, Nemestothy N, Ziobrowski Z, et al.: *DESALINATION* **162** (1-3): 307-313 2004
- Koszorz Z, Ziobrowski Z, Krupiczka R: *INZ. CHEM. PROC.* **25** (3): 1127-1132 Part 2 2004
- Gryglewicz S, Oko FA: *INDUSTRIAL & ENGINEERING CHEMISTRY RESEARCH* **44** (6): 1640-1644 (2005)
- Romero MD, Calvo L, Alba C, et al.: *J. SUPERCRITICAL FLUIDS* **33** (1): 77-84 (2005)

Bélafi-Bakó, K., Kabiri-Badr, A., Dörmö, N., Gubicza, L.: Pervaporation and its application as downstream or integrated process, *Hung. J. Ind. Chem.* **28** 175-9 (2000)

- Békássy Molnár E., Vatai Gy.: A membrántechnika környezetvédelmi alkalmazásai, *Magyar Kémikusok Lapja*, **56**(10) 369-371 (2001)