



PANNON EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

IONOS FOLYADÉKOK ALKALMAZÁSA KATALITIKUS REAKCIÓK KÖZEGEKÉNT

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

KÉSZÍTETTE:

FRÁTER TAMÁS
OKL. KÖRNYEZETMÉRNÖK

TÉMAVEZETŐ:
DR. GUBICZA LÁSZLÓ
TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS

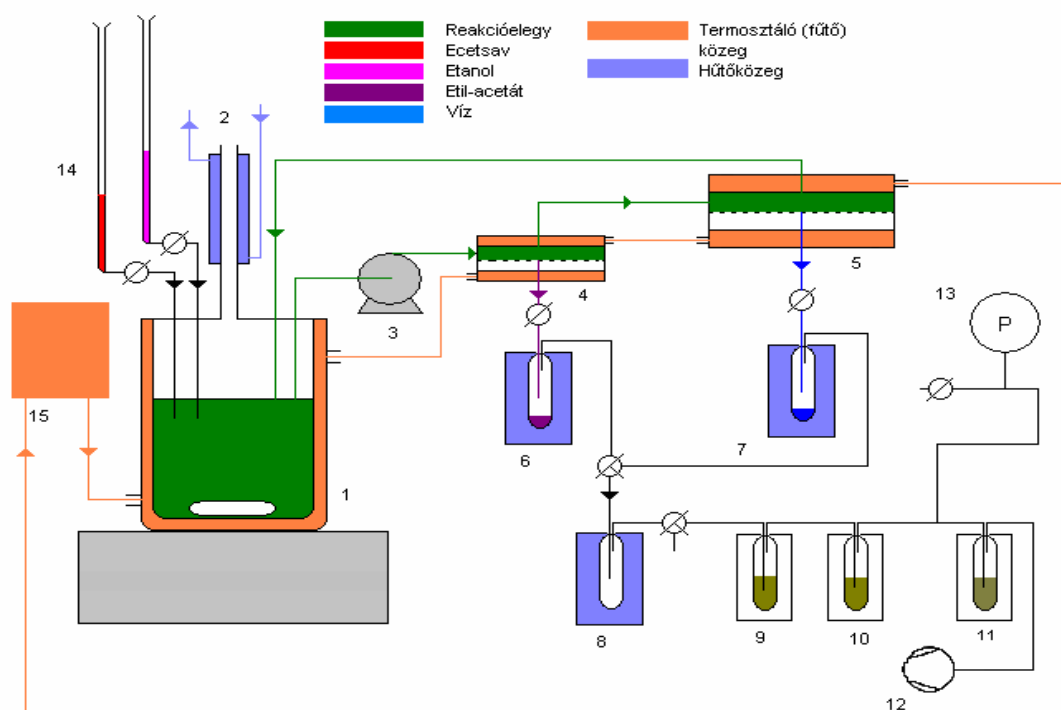


PANNON EGYETEM
MŰSZAKI KÉMIAI KUTATÓINTÉZET

2007

Az ionos folyadékok szobahőmérsékleten folyékony, rendkívül alacsony gőznyomású, sószerű vegyületek. Mivel gyakorlatilag nem párolognak, ígéretes környezetbarát reakcióközegnek bizonyulnak az illékony –emiatt tűzveszélyes és egészségkárosító– hagyományos szerves oldószerek (VOC-k) kiváltására. Doktori munkám során az ionos folyadékok alkalmazását kétféle enzimészterezési, valamint egy fém-organikus katalitikus hidrogénezési reakcióban vizsgáltam.

Az egyik enzimészterezési reakció egy aromaészter, az etil-acetát előállítása volt. Ezt a reakciót ionos folyadékban eddig még nem vizsgálták. Kísérleteim során a reakció optimális paramétereit vizsgáltam rázatott lombikos kísérletekben, majd egy laboratóriumi méretű, pervaporációval integrált berendezésben az észter előállítását folyamatossá tettem (1. ábra).

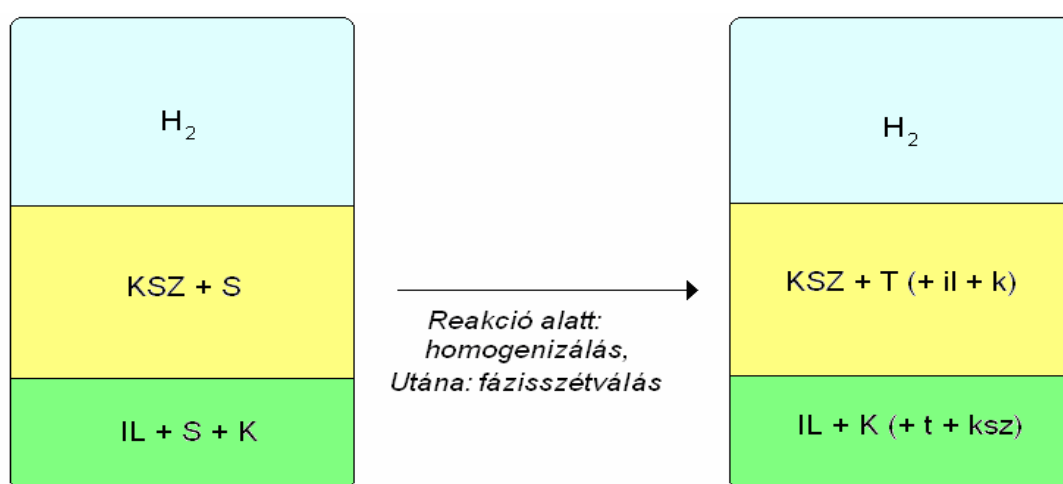


1. ábra: Enzim-membrán bioreaktor az etil-acetát enzimészterezésének vizsgálatára. Jelmagyarázat: 1-reakcióedény mágneskeverővel, 2-intenzív hűtő, 3-perisztaltikus pumpa, 4-hidrofób membrán, 5-hidrofil membrán, 6,7-hűtött csapdák, 8-kifagyasztó, 9,10-szilikonolajos csapdák, 11-zeolitos adszorber, 12-vákuumszivattyú, 13-manométer, 14-szubsztrátum adagoló büretták, 15-termosztát.

A másik vizsgált enzimészterezés egy enantioszelektív reakció, a 2-klór-propionsav n-butanollal való észterezése volt. Kísérleteim során az enzim aktivitáscsökkenését hasonlítottam össze hagyományos szerves oldószerben (n-hexánban) valamint egy ionos folyadékban. Az optimális víztartalom fenntartására egy pervaporációval integrált

berendezésben távolítottam el a reakcióban keletkező vizet. Ennek révén sikerült megnövelnem a reakciósebességet.

Enantioszelektív reakciókat nemcsak enzimek, hanem fém-organikus katalizátorok is képesek katalizálni. Kísérleteim során prokirális olefinek hidrogénezését végeztem. A reakciót kétfázisú rendszerben hajtottam végre, melyben az egyik fázis az ionos folyadék volt (ez tartalmazta a katalizátort), míg a másik fázis izopropanol volt, mely mint ko-szolvens a szubsztrátumokat tartalmazta oldott állapotban. Ez a kétfázisú rendszer az ionos folyadék révén lehetővé tette a költséges katalizátor visszanyerését (2. ábra), amit homogénkatalitikus eljárással csak rendkívül bonyolult módon lehet megvalósítani.



2. ábra: Kétfázisú rendszer ionos folyadék felhasználásával (IL = ionos folyadék, KSZ = koszolvens, S = szubsztrátum, T = termék, K = katalizátor, il = koszolvensbe átoldódott ionos folyadék, k = koszolvensbe átoldódott katalizátor, t = ionos folyadékba átoldódott termék, ksz = ionos folyadékba átoldódott koszolvens)

Tézisek

1. Tézis

Megállapítottam, hogy a (Z)- α -acetamido-fahéjsav és a (Z)- α -acetamido-fahéjsav-metilészter enantioszelektív hidrogénezése ionos folyadék/izopropanol kétfázisú rendszerben [bmim]BF₄ és [bmim]PF₆ ionos folyadékokat alkalmazva 100%-os hozam mellett végbemegy. [bpy]BF₄ ionos folyadékot alkalmazva oldószerként nem keletkezik kimutatható mennyiségű termék.

A magasabb enantioszelektivitást [bmim]BF₄/izopropanol kétfázisú rendszerben tapasztaltam:

- (Z)- α -acetamido-fahéjsav esetén $ee(S) = 92\%$ (55 °C-on 2,5 bar hidrogén nyomás mellett)
- (Z)- α -acetamido-fahéjsav-metilészter esetén $ee(S) = 87\%$ (70 °C-on, 5 bar hidrogén nyomás esetén)

A hozam mindkét esetben meghaladta az irodalomban eddig közölt értékeket. A reakciót több hőmérsékleten kivitelezve, az enantioszelektivitás hőmérsékletfüggéséből megállapítottam, hogy az a *Halpern* által leírt reakciómechanizmus szerint megy végbe.

Homogén katalitikus reakciókban a katalizátor csak egyszer használható fel, és csak igen bonyolult módon nyerhető vissza az elegyből. Az ionos folyadék/izopropanol kétfázisú rendszerrel megoldottam az értékes katalizátor recirkulációját: a katalizátort három további ciklusban újra felhasználtam miközben a hozam és az enantioszelektivitás csak kis mértékben csökkent.

2. Tézis

Az etanol ecetsavval történő észterezését *Candida antarctica* lipáz B (Novozyme 435) enzimmal többféle ionos folyadékban vizsgáltam. Megállapítottam, hogy az észterezési reakció magas hozammal (> 80%) végbemegy [bmim]PF₆ és [bmpyr]Tf₂N ionos folyadékokban. Az erősen hidrofíl karakterű anionnal rendelkező [bmim]BF₄-ben nem keletkezett kimutatható mennyiségű etil-acetát. Az optimális reakciókörülmények [bmim]PF₆ ionos folyadékban a következők voltak:

- 40 °C hőmérséklet
- 5:1 alkohol/sav molarány
- 1 vol% víztartalom

Az etil-acetát etanolból és ecetsavból történő enzimes előállítása során mindkét kiindulási anyag inhibitorként viselkedik. Méréseim alapján a reakció aktiválási energiája [bmim]PF₆ reakcióközegben 21,7 kJ/mol -nak adódott. Ez az irodalomban fellelt, más reakcióközegekben (n-hexán, oldószermentes) tapasztalt értékeknél alacsonyabb, ami azt jelenti, hogy az enzimgátló tényezők ebben a reakcióközegben érvényesülnek legkevésbé, tehát az ionos folyadék stabilizálja az enzimet.

3. Tézis

Az etil-acetát enzimikus előállításának folyamatossá tételére egy laboratóriumi méretű, pervaporációval integrált berendezést állítottam össze, melyben a reakcióelegy keringetésével a vizet egy 200 cm^2 felületű hidrofil, az etil-acetátot pedig egy 12 cm^2 felületű hidrofób membránnal távolítottam el. A szubsztrátum koncentrációjának fenntartására ecetsav- és etanol rátáplálást alkalmaztam. Az irodalom áttanulmányozása alapján ilyen folyamatos rendszert ionos folyadék közegű enzimikus észterezésnél korábban még nem alkalmaztak. Korábbi kísérletek bizonyítják, hogy a *Candida antarctica* lipáz aktivitáscsökkenése ionos folyadékokban igen lassú, így feltételeztem, hogy a kísérlet ideje alatt az enzim dezaktiválódása elhanyagolható. A fluxus meghatározása után, a membránok üzemelésének és a szubsztrátum betáplálásnak megfelelő összehangolásával a reakcióelegyben a komponensek koncentrációi kvázi-stacionáriusak maradtak.

Megállapítottam, hogy a pervaporáció során kapott permeátum 94% észtert és 5% etanolt tartalmaz, ami további tisztítás után alkalmas lehet élelmiszeripari aromakomponensnek.

4. Tézis

A 2-klór propionsav n-butanollal történő észterezését *Candida rugosa* lipázzal végeztem különböző nem-konvencionális reakcióközegekben. Ennek során megállapítottam, hogy a reakció n-hexánban és kétféle ionos folyadékban játszódik le magas hozammal: [bmim]PF₆-ban és [onim]PF₆-ban. A hidrofil karakterű [bmim]BF₄-ben a reakció csak igen lassan játszódik le.

Megállapítottam, hogy az enzim visszanyerése és új reakcióciklusban történő felhasználása során az enzim aktivitása [bmim]PF₆ ionos folyadékban lényegesen kisebb mértékben csökkent, mint szerves oldószerekben. Így azt a következtetést vontam le, hogy az ionos folyadék stabilizálja az enzimet, amit az is alátámaszt, hogy irodalmi adatok alapján az enzim enantioszelektivitása ionos folyadékban lényegesen magasabb, mint szerves oldószerekben.

5. Tézis

A 2-klór propionsav enzimikus észterezése során (és más enzimikus észterezési reakciókban is) döntő jelentőségű paraméter a reakcióelegy víztartalma. Túl alacsony víztartalom esetén az enzim hidratáltsága nem megfelelő, míg túl magas víztartalom esetén a reakció a hidrolízis

irányába tolódik el. Mivel a reakció maga is termel vizet, a legnagyobb reakciósebesség akkor érhető el, ha a reakció során keletkező víz folyamatosan eltávolításra kerül, ugyanakkor biztosítva van az enzim működéséhez szükséges víztartalom is.

A víztartalom szabályozására egy pervaporációval integrált laboratóriumi méretű fél-folyamatos rendszert alakítottam ki. A fluxus meghatározása után, a membrán szakaszos üzemeltetésével a víztartalmat kvázi-stacionárius értéken tartottam. Megállapítottam, hogy az optimális víztartalom [bmim]PF₆ ionos folyadék közegben 0,5 vol%, melynek fenntartásával (a keletkező víz folyamatos elvonásával) a reakciósebesség magasabb, mint a rázatott lombikos kísérletek során. Az irodalmi adatok alapján pervaporációs vízeltávolítást ionos folyadék közegben, nem-enzimes észterezési reakcióban már alkalmaztak ugyan, de míg ott a reakcióelegyből teljesen eltávolították a vizet, addig esetemben a pervaporációt szakaszosan kellett alkalmazni, mivel az enzim hidratáltságához szükséges *konstans víztartalmat* kellett fenntartanom, melyre tudomásom szerint ez volt az első alkalom.

Publikációk és proceedingek

Publikációk:

1. Bélafiné Bakó K., Ulbert O., Fráter T., Gubicza L.: Enzimatisz észterezés ionos folyadékban: a keletkező víz eltávolítása pervaporációval *Membrántechnika* VI./2 2002, 42-47.
2. László Gubicza, Nándor Nemestóthy, Tamás Fráter and Katalin Bélafi-Bakó: Enzymatic esterification in ionic liquids integrated with pervaporation for water removal *Green Chem.*, 2003, 5, 236-239.
3. Fráter, T., Ulbert, O., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.: Thermal stability enhancement of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids, *Comm. Agricult. Appl. Biol. Sci.*, 2003, 68/2a, 293-296.
4. Olga Ulbert, Tamás Fráter, Katalin Bélafi-Bakó, László Gubicza: Enhanced enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids as compared to organic solvents *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 2004, 31, 39-45.
5. T. Fráter, L. Gubicza, K. Bélafi-Bakó: Enhancement of operation and storage stability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* by a protease inhibitor preparation, *Biocatal. Biotransfor.*, 2005, 23, 281-284.
6. T. Fráter, L. Gubicza, Á. Szöllősy, J. Bakos: Enantioselective hydrogenation in ionic liquids: Recyclability of the [Rh(COD)(DIPAMP)]BF₄ catalyst in [bmim][BF₄], *Inorg. Chim. Acta*, 2006, 359, 2756-2759.

Proceedingek:

1. L. Gubicza, N. Nemestóthy, T. Fráter, K. Bélafi-Bakó: Enzymatic Esterification in Ionic Liquids Integrated with Pervaporation for Water Removal, *Green Solvents for Catalysis (DECHEMA)*, Bruchsal (Németország), 2002. október 13-16., poszter, pp. 73.
2. O. Ulbert, T. Fráter, K. Bélafi-Bakó, L. Gubicza: Enzymatic esterification in green solvents: Application of ionic liquids in bioconversions, *The First International Conference on Green & Sustainable Chemistry*, Tokio (Japán), 2003. március 13-15., poszter, A1-13.
3. Fráter Tamás, Bélafiné Bakó Katalin, Gubicza László: Enzimekatalitikus észterezés ionos folyadékokban, *Műszaki Kémiai Napok '03*, Veszprém, 2003. április 8-10., előadás, pp. 300-304.
4. L. Gubicza, N. Nemestóthy, T. Fráter, K. Bélafi-Bakó: Enzymatic Esterification in Ionic Liquids at Constant Water Activity, *27th International Exhibition-Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology (ACHEMA)*, Frankfurt (Németország), 2003. május 19-24., poszter, pp. 65.
5. T. Fráter, O. Ulbert, K. Bélafi-Bakó and L. Gubicza: Thermal Stability Enhancements of *Candida rugosa* Lipase in Ionic Liquids, *17th Forum for Applied Biotechnology (FAB)*, Gent (Belgium), 2003. szeptember 18-19., poszter, Proceedings Part 1, pp. 293-296.
6. Búcsú Dénes, Fráter Tamás, Fülöp Tamás: Tejipari szennyvíz derítése ipari folyadék hulladékkal, *Műszaki Kémiai Napok '04*, Veszprém, 2004. április 20-22., poszter, pp. 166-169.
7. T. Fráter, N. Nemestóthy, L. Gubicza K. Bélafi-Bakó: Stabilization of Glucoamylase from *Aspergillus awamori* Treated by Protease Inhibitors, *6th International Conference on Protein Stabilization (ProtStab)*, Pozsony (Szlovákia), 2004. szeptember 26-29., poszter, pp. 30.
8. L. Gubicza, T. Fráter, N. Nemestóthy, K. Bélafi-Bakó: Enzymatic Production of Short Chain Alkyl Esters in Solvent-free System and Ionic Liquids, *Green Solvents for Synthesis (DECHEMA)*, Bruchsal (Németország), 2004. október 3-6., poszter, pp. 85.
9. Fráter Tamás, Viszlay Renáta, Bélafiné Bakó Katalin, Gubicza László: Enzimekatalitikus észterezés ionos folyadékokban – a keletkező víz eltávolítása pervaporációval, *A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium*, Keszthely, 2004. október 7-9., előadás, pp. 38.
10. Fráter Tamás, Kiss Katalin, Kelemenné Horváth Ilona, Zenon Koszorz, Gubicza László: Glicerimonosztearát előállítása enzimekatalitikus úton, *Műszaki Kémiai Napok*, Veszprém, 2005. április 26-28., előadás, pp. 119.
11. Gubicza László, Fráter Tamás, Kelemenné Horváth Ilona, Bélafiné Bakó Katalin: Rövid szénláncú észterek enzimatikus előállítása szerves oldószerekben, oldószermentes közegben és ionos folyadékokban, *Műszaki Kémiai Napok*, Veszprém, 2005. április 26-28., előadás, pp. 282-285.
12. Fráter Tamás, Gubicza László, Szöllősy Áron, Bakos József: Enantioszelektív hidrogénezés ionos folyadékokban: a Rh(COD)(DIPAMP)BF₄ katalizátor visszaforgathatósága [bmim]BF₄ ionos folyadékban, *Műszaki Kémiai Napok*, Veszprém, 2005. április 26-28., előadás, pp. 286-289.

13. L. Gubicza, T. Fráter, K. Bélafi-Bakó: Recyclability of Enzymes in Ionic Liquid Solvents, *1st International Congress on Ionic Liquids (COIL)*, Salzburg (Ausztria), 2005. június 19-22., előadás, pp. 174.
14. T. Fráter, K. Kiss, K. Bélafi-Bakó, L. Gubicza: Enzymatic Synthesis of Monoglycerides, *Renewable Resources and Biorefineries (FAB)*, Gent (Belgium), poszter, 2005. szeptember 19-21., pp. 78.
15. Fráter Tamás., Fehér Erika, Kelemen Horváth Ilona, Bélafiné Bakó Katalin, Gubicza László: Aromaészterek előállítása ionos folyadékokban, *Műszaki Kémiai Napok*, Veszprém, 2006. április 25-27., előadás, pp. 79-82.
16. L. Gubicza, T. Fráter, K. Bélafi-Bakó: Reuse of Lipase Enzymes in Ionic Liquid Solvents, *28th International Exhibition-Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology (ACHEMA)*, Frankfurt (Németország), 2006. május 15-19., poszter, pp. 111.
17. T. Fráter, K. Kiss, K. Bélafi-Bakó, Z. Zibrowski, L. Gubicza: Enzymatic synthesis of monoglycerides, *33rd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering (SSCHE)*, Tatranské Matliare (Szlovákia), 2006. május 22-26., előadás, pp. 132.
18. E. Fehér, T. Fráter, L. Gubicza: Enzymatic Production of Short Chain Alkyl Esters in Ionic Liquids, *33rd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering (SSCHE)*, Tatranské Matliare (Szlovákia), 2006. május 22-26., előadás, pp. 209.
19. L. Gubicza, E. Fehér, I. Kelemen-Horváth, K. Bélafi-Bakó, T. Fráter: Enzymatic Flavour Ester Production in Organic Solvents, Solvent-free System and Ionic Liquids, *6th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES)*, Salzburg (Ausztria), 2006. augusztus 27-30., poszter, pp.277.
20. L. Gubicza, E. Fehér, I. Kelemen-Horváth, K. Bélafi-Bakó, T. Fráter: Continuous Enzymatic Esterification in an Integrated System Using Ionic Liquids as Solvent, *Green Solvents for Processes (DECHEMA)*, Lake Constance Friedrichshafen (Németország), 2006. október 8-11., poszter, pp.110.