

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM



***1-Feniletanol biokatalizált, kinetikus reszolválása
léggöri nyomáson és szuperkritikus
szén-dioxidban***

OTDK dolgozat

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

Készítette:

VARGA ZSÓFIA ARANKA

BSc hallgató

Témavezető:

DR. SZÉKELY EDIT

Egyetemi docens

Konzulens:

KMECZ ILDIKÓ

Tanársegéd

Budapest

2014

Tartalomjegyzék

Jelölésjegyzék	3
I. Bevezetés	4
II. Irodalmi áttekintés.....	6
II.1. Optikailag aktív vegyületek	6
II.1.1. Enantiomerek elválasztásának módjai	6
II.2 Biokatalízis.....	9
II.2.1. Lipáz enzim	10
II.2. 2. Michealis-Menten kinetika és a lipáz enzim kinetikája	12
II.3 Szuperkritikus fluidumok	14
II.3.1. Szuperkritikus szén-dioxid	15
II.3.2. Enzimkatalizált reakció szuperkritikus fluidumban.....	16
II.4 Reakcióhoz használt vegyületek	21
II.4.1. 1-feniletanol.....	21
II.4.2. Glicerín-triacetát	22
II.4.3. Glicerín-tributirát	22
III. Kísérleti leírás.....	24
III.1. Felhasznált anyagok	24
III.2. Kísérleti módszerek.....	24
III.2.1. Légköri nyomáson végzett kísérletek	24
III.2.2. Nagy nyomáson, szén-dioxid oldószerben végzett kísérletek.....	25
III.3. A minták elemzéséhez használt analitikai módszer	28
III.4. Számítási módszerek	29
III.4.1. Az enantiomereleválasztás hatékonyságát jellemző paraméterek számítása	29
III.4.2. Kinetikai paraméterek számítása	32
IV. Eredmények.....	36
IV.1. A vizsgált reakciók.....	36
IV.2. Légköri nyomáson végzett kísérletek.....	36
IV.2.1. Észterezőszerként triacetint használva.....	36
IV.2.2. Észterezőszerként tributirint használva	41
IV.2.3. Észterezőszerként természetes olajat alkalmazva	43

IV.2.4. Az érzékszerek összehasonlítása	44
IV.3. Opálosodási pont mérése	46
IV.4. Nagy nyomású kísérletek, szuperkritikus szén-dioxid oldószerben	47
IV.4.1. Nagy nyomáson végzett kísérletek ismételhetőségének vizsgálata.....	52
IV.4.2. Enzimaktivitás csökkenésének vizsgálata.....	53
V. Összefoglalás	54
Irodalomjegyzék.....	57

Jelölésjegyzék

Jelölés	Jelölt fogalom	Mértékegység
A	csúcs alatti terület	-
ee	enantiomerfelesleg	%
E-érték	enantioszelektivitás	-
U	produktivitás	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}\cdot\text{g}}$
Y	termelés	%
X	konverzió	%
c	koncentráció	$\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$
m	tömeg	g
n	anyagmennyiség	mol
V	térfogat	dm^3
t	idő	perc
p	nyomás	bar, MPa
T	hőmérséklet	°C
r	reakciósebesség	$\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3\cdot\text{perc}}$
K _m	Michaelis konstans	$\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$
scCO ₂	szuperkritikus szén-dioxid	-
CALB	<i>Candida antarctica</i> lipáz B enzim	-
Indexek		
a	alkohol	
é	észter	
R	(R)-enantiomer	
S	(S)-enantiomer	
0	kezdeti	

I. Bevezetés

Napjainkban egyre nagyobb szerepet kapnak az enantiomertiszta vegyületek, így például a modern gyógyszerfejlesztésben az enantiomertiszta hatóanyagok és intermediér vegyületeik. Az enantiomer-tisztaság fontossága a két enantiomer biológiai aktivitásának különbségében, illetve tulajdonságaik eltérésében rejlik, míg az egyik enantiomer gyógyszer, addig a másik az emberi szervezetben akár súlyos károkat is okozhat. Természetesen nemcsak a gyógyszeriparban fontos az enantiomertiszta vegyületek előállítása, a növényvédőszer-, élelmiszer- és parfümipar is egyre inkább igényli az enantiomertiszta vagy adott enantiomerben feldúsított alapanyagokat. Számos technikát fejlesztettek ki enantiomerek elválasztására racém elegyből kiindulva, ezek lehetnek fizikai, kémiai és biokémiai módszerek.

Az enantiomer-elválasztás egy természetes módja az enzimek alkalmazása, melyek az élő szervezetben szelektív biokatalizátorként vannak jelen. Az enzimek fehérjék, melyeknek adott konformációját, térbeli szerkezetét a környezeti hatásokra érzékeny harmadlagos és negyedleges szerkezetük határozza meg. Ezen fehérjetermészetből és az enzim-szubsztrát komplex létéből adódik specifikitásuk, többek között a sztereospecifikitás, mely azt jelenti, hogy egy adott enzim királis centrumot tartalmazó szubsztrát esetén szinte csak az egyik antipód átalakulását katalizálja. Az enzimek ezen képességükből adódóan kiválóan alkalmasak nagy szelektivitású átalakításokra, többek között enantiomer-párok elválasztására, azaz rezolválásra is.

Sokáig azt hitték az enzimekről, hogy csak vizes közegben képesek katalizátorként működni, de ma már tudjuk, hogy egyes enzimek szerves oldószerekben, sőt szuperkritikus fluidumokban is képesek aktivitásukat megőrizni. A szuperkritikus szén-dioxid (scCO_2) alkalmazása oldószerként és egyben reakcióközegként több előnyt is rejt magában: szobahőmérséklet-közeli kritikus hőmérséklet ($31\text{ }^\circ\text{C}$ - nem denaturálódik az enzim), nyomásmentesítéssel oldószermentes termék kapható, nem toxikus, környezetünkben természetes módon is jelen van. A szuperkritikus szén-dioxidos technológiák nem járnak szén-dioxid termeléssel, azonban alkalmasak szerves oldószerek kiváltására, ezért ezeket kiemelten környezetbarátnak tekintik.

Munkám során egy gyakran alkalmazott modellvegyület, az 1-feniletanol enzimkatalizált kinetikus rezolválását vizsgáltam. A munka távolabbi célja, hogy szintetikus észterezőszer helyett (mint például az általánosan használt vinil-acetát) természetes olajok segítségével végezhesük el az enantioszelektív szintézist, kombinálva a szuperkritikus szén-dioxid kínálta elválasztástechnikai előnyökkel. A hosszabb távú cél első lépéseként az

észterezéshez glicerín-triacetátot és glicerín-tributíratot, mint modell triglicerideket, majd természetes olajokat alkalmaztam. Katalizátorként *Candida antarctica* lipáz B (CALB) enzimet használtam, immobilizált formában.

TDK munkám ezen szakaszának célja a Michaelis-Menten modell paramétereinek becslése volt atmoszférikus nyomáson és nagy nyomáson, szuperkritikus szén-dioxidban megvalósított kinetikus reszolválás esetén a modell rendszerre. A kísérletek lehetőséget adtak a különböző reakcióközegek összehasonlítására, így a hagyományosnál környezetkímélőbb kinetikus reszolválási módszerek előnyeinek felfedésére.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. Optikailag aktív vegyületek

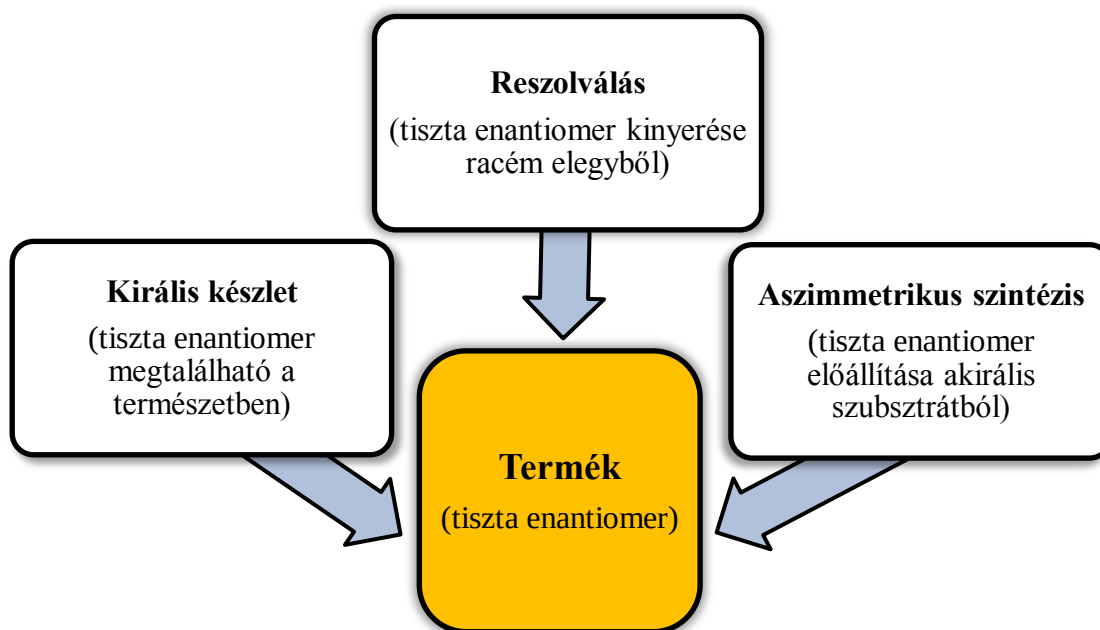
Azonos összegképletű és kémiai szerkezetű / konstitúciójú vegyület esetén is lehetnek eltérések az egyes molekulák között, így a kapcsolódó atomok térbeli elrendeződésében (konfigurációjában), mely makroszkópikus szinten hatással van a vegyület tulajdonságaira. Az azonos összegképletű és konstitúciójú, de eltérő konfigurációjú molekulákat sztereoizomereknek nevezzük. A sztereoizomerek két csoportba sorolhatóak: diasztereomerek vagy enantiomerek. Az enantiomerek olyan sztereoizomerek, melyek egymásnak tükörképei, de elmozgatással vagy forgatással nem hozhatók fedésbe egymással. Ha egy molekulának két különböző konfigurációjú, egymással enantiomer viszonyban álló sztereoizomerje létezik, akkor a molekulát királisnak tekintjük. Az enantiomerek tehát tükörképi párt alkotnak, melyeknek skaláris fizikai tulajdonságai (olvadáspont, forráspont) megegyeznek, míg vektoriális fizikai sajátosságaikban (optikai forgatóképesség) különböznek. Akirális (tükörképével azonos) reagensekkel szemben mutatott kémiai viselkedésükben megegyeznek, de királis reagensekkel szemben eltérően reagálhatnak, mely tulajdonságuk lehetőséget ad az enantiomerek elválasztására. A királis vegyületeket szintézissel általában nem lehet tisztán előállítani, a két enantiomernek valamilyen arányú keverékét kapjuk. A keverékek egy speciális esete, mikor az enantiomerek 1:1 arányú elegyet alkotnak, ezt racém elegynek nevezzük. [1]

II.1.1. Enantiomerek elválasztásának módjai

A kiralitás alapvető fontosságú az élet számára. Az élő szervezetek biokémiai folyamataiban többnyire királis molekulák, homokirális egységekből felépülő fehérjék, nukleinsavak, szénhidrátok vesznek részt. Az élő szervezetekben megtalálható biomolekulák szelektivitását egyedi, gyakran királis szerkezetük biztosítja, így a szervezetbe (de akár egyetlen sejtbe) bekerülő és azzal kölcsönhatásba lépő enantiomerpárok különböző biológiai hatást fejthetnek ki. Az enantiomerek különbözhetnek egymástól aktív transzportjukban, a vér fehérjéihez való kötődésükben, a szövetek közötti eloszlásukban, enzimhez vagy receptorhoz való kötődésükben (például a két enantiomer más-más receptorhoz képes kötődni), metabolizmusukban (különbözhetnek a metabolizmus módjában és sebességében is) és kiürülésükben. [2] Egyes esetekben a szervezetbe juttatott királis gyógyszer-vegyület egyik enantiomere rendelkezik a megfelelő biológiai aktivitással, a másik hatása jelentősen gyengébb, akár biológiailag inaktív is lehet. Ekkor az inaktív enantiomer miatt nagyobb dózis szükséges a megfelelő hatás elérése érdekében, mint csak a tiszta enantiomer adagolása esetén. Ennek szélsőséges esete, ha az inaktív enantiomer káros mellékhatásokat okoz a szervezetben. Ebből adódóan egyre nagyobb figyelmet kap a csak az egyik formát tartalmazó hatóanyagok gyártása [3], melyet enantioszelektív szintézisek, illetve enantiomer-elválasztási technikák által tudnak megvalósítani.

A módszerek, melyekkel enantiomertiszta vegyületek létrehozhatók három kategóriába oszthatók aszerint, hogy milyen típusú a kiindulási anyag (1. ábra):

- kinyerés és esetlegesen azt követő szintetikus átalakítások: természetes forrású királis vegyületek;
- reszolválás: akirális szintézis során keletkező racém elegyből az enantiomerek elválasztása;
- aszimmetrikus szintézis: prokirális szubsztrátok szolgálnak kiindulási vegyületeként.[4]



1. ábra: Tiszta enantiomerek előállítási lehetőségei

Sztereoszelektív szintézisek esetén a természetben található királis vegyületekből kiindulva csak olyan lépéseket alkalmaznak, melyek nagyfokú sztereoszelektivitással rendelkeznek. A módszer hátránya, hogy a természetes királis vegyületek kinyerése például növényekből nem gazdaságos és környezetkímélő, így nem alkalmas enantiomertiszta vegyületek ipari léptékű előállításához. Az aszimmetrikus szintézisek valamilyen királis kölcsönhatást igényelnek. A királis kölcsönhatást biztosíthatja királis környezet (pl. királis oldószer), királis katalizátor vagy valamilyen királis segédanyag. A kiindulási anyag prokirális vegyület, melyből a szintézis során alakul ki egy vagy több királis centrumot tartalmazó vegyület. [5]

II.1.1.1. Racém elegyek reszolválása

A sztereoszelektív, illetve az aszimmetrikus szintézisek gyors fejlődésének ellenére az iparban leggyakrabban a tiszta enantiomereket racém vegyületek reszolválásával állítják elő. Az enantiomerek reszolválási módszerei 4 kategóriába sorolhatóak:

- direkt, klasszikus kristályosítás;

- diasztereomer-só kristályosítás;
- kromatográfia;
- kinetikus reszolválás.

A direkt, klasszikus kristályosítást széles körben alkalmazzák ipari léptékben. A folyamat során a racém vegyület tiszta enantiomerként való kikristályosodását a főtömeghez adott tiszta enantiomermaggal indukálják. Technikailag csak akkor valósítható meg valamely racém vegyülettel, ha az úgynevezett konglomerátumokat képez (a konglomerátum nem más, mint a két enantiomer kristályainak mechanikai keveréke, mely az enantiomereket egyenlő mennyiségben tartalmazza). Sajnos a racém vegyületeknek kevesebb, mint 10 %-a található konglomerátum formában, a maradék valódi racemátot képez, mely ilyen típusú kristályosítással nem választható el. [6] [7] Ha az elegy racemátképző, akkor reszolválható diasztereomer kristályosítással, melyet 1848-ban Pasteur fejlesztett ki. Az eljárás alapja, hogy az elválasztandó enantiomerek a reszolváló ágens egyik enantiomerével történő reakció útján diasztereomer párt hoznak létre, melyek eltérő fizikai tulajdonságokkal (pl. oldhatóság) rendelkeznek, a két diasztereomer például kristályosítással elválasztható egymástól. Annak ellenére, hogy egyszerű fizikai elválasztás alkalmazható a reszolváláshoz, ezen eljárások esetében problémát okoz a megfelelő reszolválószer és oldószer kiválasztása, illetve az optimális reszolválási körülmények meghatározása. [4]

Kinetikus reszolválás

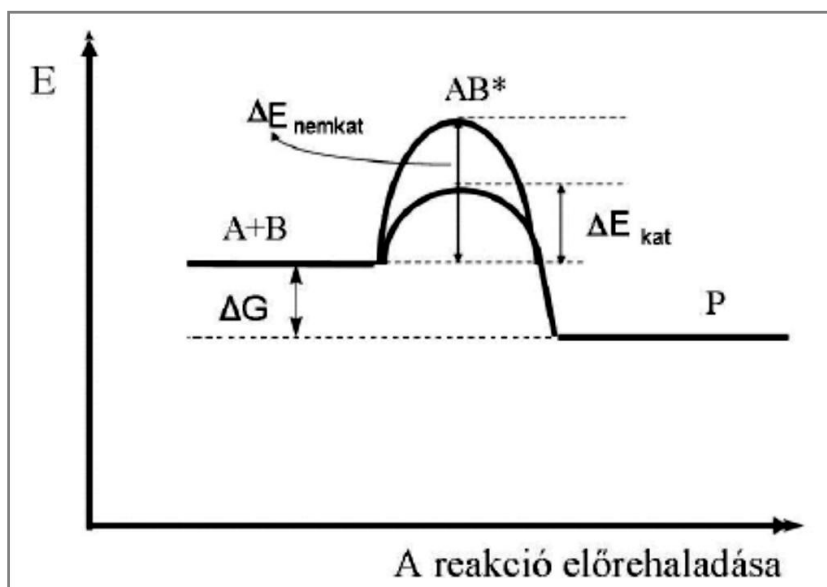
Számos szintetikus eljárás közül, melyekkel nagy tisztaságú királis anyagokat lehet előállítani, a kinetikai reszolválás az egyik legrégebbi és egyben legsokoldalúbb is, hiszen majdnem minden típusú királis vegyület esetében alkalmazható. A módszer sikeressége azon alapul, hogy a két enantiomer eltérő sebességgel reagál a királis entitással, szélsőséges esetben csak az egyik enantiomer reagál, míg a másik változatlanul visszanyerhető a reakcióelegyből. [8] A királis entitásnak katalitikus mennyiségben kell jelen lennie. Ez az entitás lehet biokatalizátor (enzim vagy mikroorganizmus) vagy kémiai katalizátor (királis sav vagy bázis, királis fém komplex). Racém vegyületek kinetikus reszolválásának egyik legáltalánosabb módja az enzim-katalizált transzformáció. Az átalakítás során az enzim a racém elegy két enantiomere között különbséget tud tenni, mely alapjául a térszerkezeti különbségek szolgálnak. Az enzimeknek ezen tulajdonsága lehetővé teszi, hogy az egyik enantiomer gyorsabban átalakul termékké, mint a másik. [9] [10] Ideális esetben az egyik enantiomer sokkal gyorsabban reagál, mint a másik, így például csak az (*R*)-enantiomerből képződik termék ($k_S=0$). Ebben az esetben a reakció végére a végső keverékben 50 % az (*S*)-reaktáns és 50 % az (*R*)-termék aránya. [11] A kinetikus reszolválással elérhető maximális hozam értéke 50 % a racém vegyületre vonatkoztatva, azaz ha az egyik enantiomer teljes mértékben átalakul, míg a másik enantiomer elreagálatlanul visszamarad, akkor a reakció kiindulási anyagmennyiségre számított hozama éppen 50%. Ellenben vannak olyan lehetőségek, melyekkel ez a korlát túlléphető, így például a nemkívánt enantiomer

(elreagálatlan szubsztrát) sztereoinverziója vagy dinamikus kinetikus reszolválása (DKR) útján. [12]

A hagyományos és a dinamikus kinetikus reszolválásnál is az egyik enantiomer, például az (*R*)-enantiomer, mint szubsztrát sokkal gyorsabban átalakul (*R*)-termékké, mint az (*S*)-enantiomer. Az egyedüli különbség, hogy a hagyományos kinetikus reszolválásnál az (*S*)-enantiomer visszamarad, mint elreagálatlan kiindulási anyag, míg dinamikus kinetikus reszolválásnál a szubsztrát folyamatosan racemizálódik a reszolváló folyamat alatt. A DKR tehát egy enantioszelektív transzformáció és egy in-situ racemizációs folyamat kombinációja. A racemizációs lépés lehet spontán, enzim (például racemáz) vagy nem enzim által (például katalitikus fém, bázis) katalizált lépés. A két lépés kombinálásával akár 100 %-os hozam is elérhető, így enantiomertiszta vegyületek előállításában egyre nagyobb figyelmet kap a DKR.[13][14]

II.2 Biokatalízis

A fehérjék egy speciális csoportját képezik az enzimek, melyeknek feladata a sejtekben lejátszódó nagyszámú biokémiai reakció gyorsítása katalízishatás alapján. Enzimek nélkül az egyébként termodinamikailag lehetséges (azaz szabadenergia csökkenéssel járó) reakciók rendkívül lassan mennének végbe, mivel az élő anyag reakciókörülményei (fiziológiás körülmények) enyhék, a 30-40 °C körüli hőmérséklet, az 1 bar körüli nyomás és a semleges körüli pH csak kis reakciósebességet engednek meg a legtöbb spontán reakció esetén. A katalitikus hatás termodinamikai ugyanaz, mint bármely más katalízis esetében, azaz az enzimek is az adott kémiai reakció aktiválási energiáját csökkentik (2.ábra).[15]



2. ábra: Aktiválási energia csökkentése enzímekatalízissel

Enzimeket már az ókori Egyiptomban is használták például sörfőzéshez, alkohol és sajtkészítéshez. Maga a biokatalízis tudatos felhasználása a 18. és 19. században fejlődött ki: 1833-ban Payen és Persoz malátából enzimkomplexet izoláltak, melyet diasztáznak nevezeték

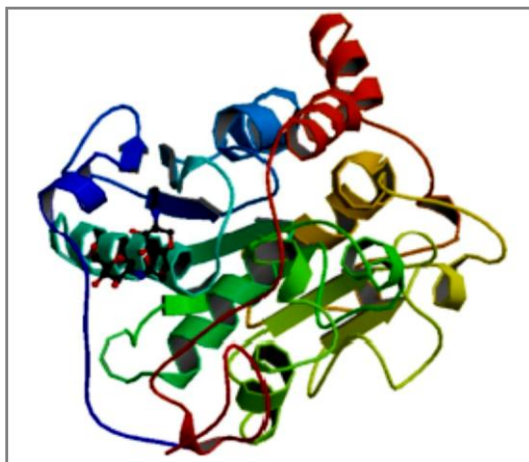
el. Ezt a diasztázt használta fel Berzelius, aki elsőként írta le a keményítő enzim által történő hidrolízisét. Edward és Haus Buchner 1897-ben élesztőből származó sejtmentes extraktummal is képesek voltak alkoholos fermentáció véghezvitelére. Nagy előrelépést jelentett Emil Fischer munkássága: a kulcs-zár modell megalkotása, illetve annak megállapítása, hogy az enzimműködés legrégebbi magyarázata, az enzimet a zár szimbolizálja, míg a kulcs a szubsztrátot jelöli. A szubsztrát az enzim kötőhelyén képes megkötődni, majd az aktív centrumában képes átalakulni. Az átalakítandó szubsztrát mellett más molekulák is megkötődhetnek az enzimen, ennek megfelelően a fehérjén lehetnek aktivátor-, inhibitor- és kosubsztrátkötő helyek. Az enzim és a szubsztrátja enzim-szubsztrát komplexet képez, mely az enzimkatalízis létfontosságú lépése (Victor Henri, 1903). Az enzimek általános működési elvét a matematika nyelvén 1913-ban Leonor Michaelis és Maud Lenora Menten írták le. [16] Az általuk megalkotott, úgynevezett Michaelis-Menten modellt ma is széles körben alkalmazzák az enzimreakciók leírására, amelynek oka a modell egyszerűsége és elfogadható pontossága.

Az enzimek hat fő osztályba csoportosíthatók a katalizált reakciók természete alapján:

- oxidoreduktázok: oxidációs-redukciós folyamatok katalizálása;
- transzferázok: funkcionális csoportokat képesek átvinni egyik szubsztrátról a másikra;
- hidrolázok: víz segítségével különböző kötések hasítására képesek;
- liázok: olyan reakciókat katalizálnak mely során valamilyen csoportot eltávolítva a molekuláról, a molekulában kettős kötés jön létre, víz, ammónia, szén-dioxid vagy más molekula keletkezése közben, illetve ilyen molekulák addíciónálódnak a szubsztrát kettős kötésére;
- izomerázok: különböző izomerizációs reakciókat (cisz-transz, aldóz-ketóz, epimerizáció stb.) katalizálnak;
- ligázok: molekulák közötti kötések kialakulását katalizálják, melyhez szükséges energiát trifoszfátok hasításából nyerik. [17][18]

II.2.1. Lipáz enzim

Napjainkban az enzimek és mikroorganizmusok felhasználása biokatalizátorként szerves szintézisekben jól ismert és széleskörűen elterjedt technika. Enzimes folyamatokkal a termékek széles skálája hozható létre enyhe körülmények között, amely energia-megtakarítás révén csökkent környezetterhelést is jelent. Az enzimkatalízis a kémiai szintéziseknek rendkívül vonzó és ígéretes területe lett, többek között az enzimek kiváló sztereoszelektivitásából adódóan is.



3. ábra: A *Candida antarctica* lipáz B röntgen kristály szerkezete

A lipázok (3. ábra), más néven triacilglicerol hidrolázok, a leggyakrabban alkalmazott enzimek a régió-, reakció- és enantioszelektív biotranszformációkhoz, mivel széles szubtrátspecifitással rendelkeznek, kiváló kiralitásfelismerő-képességük van, illetve nem igényelnek kofaktort és jellemzően nem katalizálnak mellékreakciókat. Elterjedten alkalmazzák az iparban úgy, mint detergens, élelmiszer előállításban, biotranszformációkhoz, hulladékkezeléshez és bioremediációban. A lipázok jól hasznosíthatók a gyógyszer-, kozmetikai-, textil-, bőr- és papíriparban. [19] [20]

A lipázokat a karboxil-észterázoktól az különbözteti meg, hogy míg az észterázok a vízdoldható szubsztrátokat részesítik előnyben, addig a lipázok jelentősen nagyobb aktivitást mutatnak természetes szubsztrátjuk, a trigliceridek felé. A természetben a lipázok a trigliceridek hidrolízisét katalizálják, de nemvizes rendszerben a hidrolízis megfordítható reakció, így ezek a biokatalizátorok észterek kialakítására is képesek megfelelő savszármazék és alkohol jelenlétében. A legtöbb lipáz természetes szubsztrátjától eltérő szerves anyagok átalakulását is képes katalizálni, gyakran használják szerves szintézisek katalizátoraként. A lipázok sztereoselektivitásukból adódóan jól alkalmazhatók olyan reakciókban, melynek végtermékeként enantiomertiszta vegyületeket kapnak, azaz úgynevezett resolválásokban. Ezeket a reakciókat három fő típusba sorolják:

- racém karbonsavak és alkoholok kinetikus resolválása;
- mezo dikarbonsavak vagy mezo diolok enantioszelektív csoportjainak differenciációja;
- prokirális dikarbonsavak és diol származékok enantiotóp csoportjainak megkülönböztetése.

A felsoroltakból a racém alkoholok kinetikus resolválása az egyik legelterjedtebb felhasználása a lipázoknak, mely során egy (át)észterezési reakcióval történik az enantiomerek elválasztása. [11]

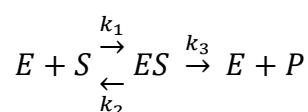
II.2.1.1. Kinetikus reszolválás lipáz enzimmel

A lipázok számos racém vegyület reszolválását képesek katalizálni az alkoholokon kívül is, mint például aminok, savak, α -hidroxi-szelenidek és telluridok reszolválását. [21] [22] [23] [24] [25] Ezen vegyületek vízben való gyenge oldhatósága miatt az enzim reszolválást általában nemvizes közegben valósítják meg, bár így fennáll az enzim denaturációjának lehetősége. A gyakorlati módszer az enzim hatékonyságának, működési stabilitásának és teljesítményének növelésére szerves oldószerben vagy szuperkritikus fluidumokban (SCF) az immobilizált biokatalízis alkalmazása. [26]

A lipáz-katalizált kinetikus reszolválásnak modellreakciói közé tartozik az alkoholok és aminok acilezése, mely szerves oldószerben egyensúlyi reakció. Ezen reakciók irreverzibilitása biztosítható aktivált észterdonorok használatával, illetve az enantioszelektivitás növelhető hosszabb, telített szénláncú észterezőágensek alkalmazásával. Az átészterezési reakcióhoz használt észterezőszerek kiválasztása mellett R. Chênevert és társai szerint a megfelelő eredetű lipáz enzim megválasztása is fontos szerepet játszik a reszolválás eredményeiben. Több észterdonort és lipáz enzimet is kipróbáltak az 1-feniletanol észterezési reakciójában. Minden esetben az (R)-enantiomert észterezte gyorsabban az enzim és az (S)-konfigurációjú szubsztrát maradt elreagálatlan. A tesztelt lipázok közül a *Candida antarctica* lipáz B (CALB) mutatkozott a leghatásosabbnak és a legnagyobb enantioszelektivitással bírt a reakciók során. Az enzim az észterező ágensek széles választékával képes volt reagálni standard körülmények között. [27]

II.2. 2. Michealis-Menten kinetika és a lipáz enzim kinetikája

Sok enzim követi a Michaelis és Menten által felállított alapmodellt. Ez a modell néhány alapfeltételt bevezetve képes az egyszerű enzimes reakciók mechanizmusának matematikai leírására. A modell alkalmazhatóságához a következő feltételezéseket kell elfogadni: az enzim-szubsztrát (ES) komplex létezése, illetve, hogy az enzim-szubsztrát komplex egy reverzibilis reakcióban jön létre szabad enzimből (E) és szubsztrátból (S), mely reverzibilis reakció rendkívül gyorsan egyensúlyra vezet. Az előző állítás következménye, hogy viszonylag rövid időt követően az ES komplex koncentrációja lényegében állandó marad. Továbbá feltételezni kell, hogy az ES komplex termékké (P) és szabad enzimmé alakulása irreverzibilis lépés az adott reakció körülményei között. Az állandósult állapot kritériuma abban az esetben teljesül, ha az átmeneti intermedier koncentráció-változásának sebessége nagyon kicsi a reaktánsok és a termékek koncentráció-változásának sebességéhez képest.



A sebességmeghatározó lépés az ES komplex disszociációja szabad enzimmé és terméké. A reakció kezdeti sebességére (r) egyszerű szubsztrát-enzim reakciónál az úgynevezett Michaelis-Menten egyenlet írható fel.

$$r = \frac{r_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

1. egyenlet: Michaelis-Menten egyenlet

(r : kezdeti reakciósebesség, $r_{\max}$: maximális kezdeti reakciósebesség, K_m : Michaelis konstans, S : kiindulási szubsztrát koncentráció)

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

2. egyenlet: Michaelis konstans

(K_m : Michaelis konstans, k_1 , k_2 , k_3 : reakciósebességi állandók)

Ez az egyenlet kapcsolatot teremt az egyes szubsztrát-koncentrációkhoz (S) tartozó sebesség (r) és a maximális reakciósebesség ($r_{\max}$) között, melyet végtelen szubsztrát-koncentrációval lehetne elérni. Fontos meghatározni $r_{\max}$ és K_m értékeket, melyekre, mint az enzim kinetikai paraméterei utalnak, hiszen az enzimek jellemzésének fontos részét alkotják.

Gyakran az enzimreakciók nemcsak egy szubsztrátot, hanem kettő vagy több versenyző szubsztrátot is tartalmaznak, így például a lipáz-katalizált észterezésnél is. Ezek a reakciók nem írhatók le egyszerűen a Michaelis-Menten kinetikával, bár az állandósult állapot feltételezése ezen esetekben is érvényes lehet. A két szubsztrátos enzim-katalizált reakciók általában háromféle mechanizmust követhetnek:

- random bi bi;
- határozott sorrendű bi bi mechanizmus;
- ping-pong bi bi mechanizmus.

A kinetikai kutatások alapján a lipázok nem követik a Michaelis-Menten kinetikát, de a szubsztrát koncentrációjának növelésével a reakciósebessége szigmoid alakú növekedést mutat. A lipáz-katalizált észterezés a ping-pong bi bi mechanizmust követi. A mechanizmus lényege, hogy első lépésben a zsírsav kapcsolódik az enzimhez, miközben víz vagy alkohol szabadul fel, majd a már észterezett enzimhez kötődik a királis alkohol. Végül a savcsoportot és az alkoholt az enzim összekapcsolja, és észter keletkezik, mely leválik az enzimről, így az regenerálódhat. A lipáz a szabad enzimforma és az észterezett-enzim intermediér között oszcillál. A reakciósebesség a következő kifejezéssel írható le [16]:

$$r = \frac{r_{\max}[A][B]}{K_m B[A] + K_m A[B] + [A][B]}$$

3. egyenlet: Reakciósebesség két szubsztrátos reakció esetén

($[A]$: alkohol koncentrációja, $[B]$: zsírsav koncentrációja)

Ha az egyik reaktáns, például a zsírsav koncentrációja ($[B]$) állandó, akkor az előbbi egyenlet a Michaelis-Menten egyenletté egyszerűsödik:

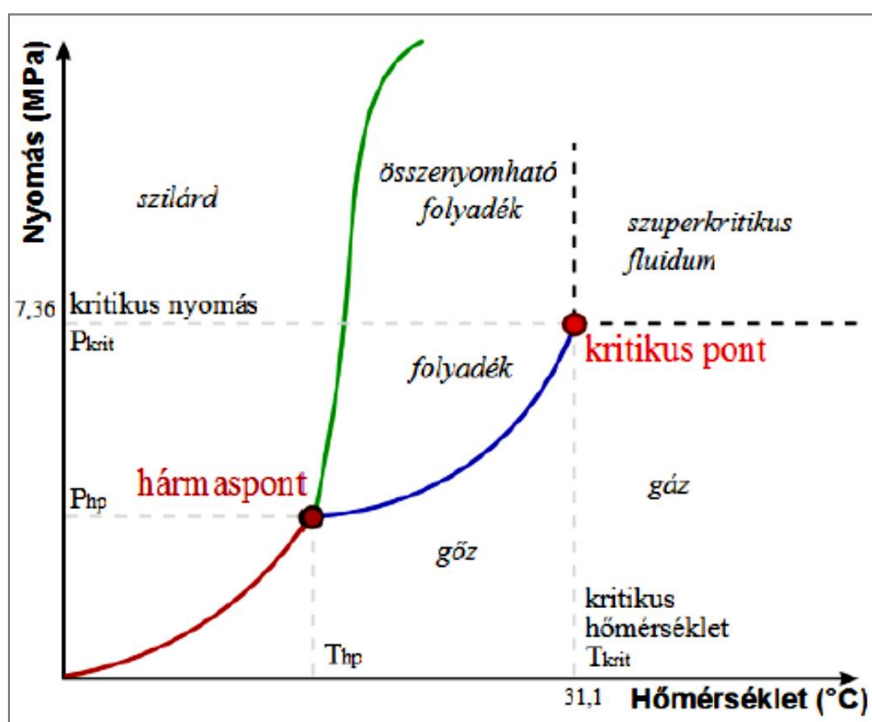
$$r = \frac{r_{max}[A]}{K_m + [A]}$$

4. egyenlet: Reakciósebesség az egyik szubsztrát állandósága esetén

Az előbbi feltételezéseket Dumont és társainak vizsgálatai is igazolták. Mirisztinsav etanollal történő lipáz-katalizált észterezését vizsgálták *n*-hexánban és scCO_2 -ban az etanol koncentrációjának rögzítésével, a mirisztinsav koncentrációját változtatva a különböző etanol koncentrációknál. A reciprok kezdeti reakciósebességet ábrázolva a reciprok savkoncentráció függvényében az egyes alkohol koncentrációknál egyeneseket kaptak, mely a klasszikus enzimatis reakciók esetén Lineweaver-Burk ábrázolás során is fennáll. Mindkét oldószer esetén alacsony alkohol koncentrációknál, ahol az egyenesek párhuzamosak, az alkohol mennyiségét növelve az $1/r$ tengelymetszet $1/r_{\max}$ határértékig csökkent. Nagyobb etanol koncentrációk esetén az egyenesek ugyanazon $1/r_{\max}$ értéknél metszték a tengelyt és csak az egyenesek meredeksége változott. Az ábrázolás alapján az etanol kompetitív inhibitorként működött, mely megfigyelés összefér azzal a feltevésével, hogy a lipáz ping-pong bi bi mechanizmus szerint katalizálja az észterezési reakciót *n*-hexánban és scCO_2 -ban is. [28]

II.3 Szuperkritikus fluidumok

A hagyományos szerves oldószerek használata a kémiai reakciókhoz, a szerves oldószerek nehéz kezelhetősége miatt környezetünk károsodását idézheti elő. Ebből adódóan egyre növekszik az emberi szervezet, illetve a környezet számára kevésbé megterhelő oldószerek iránti kereslet, így a szuperkritikus fluidumok (SCF) iránt.



4. ábra: A szén-dioxid fázisdiagramja

A szuperkritikus állapot minden anyagnál egy rá jellemző úgynevezett kritikus nyomás (p_{krit}), illetve kritikus hőmérséklet (T_{krit}) felett érhető el. Példaként a 4. ábrán a szén-dioxid fázisdiagramja látható, ahol a szuperkritikus állapotnak megfelelő területet a kritikus hőmérséklet (31,1 °C) és a kritikus nyomás (7,38 MPa) szaggatott vonalai határolják.

Ha az adott anyag hőmérséklete és nyomása eléri vagy megközelíti a kritikus értékeket, akkor az anyag fizikai tulajdonságai jelentősen megváltoznak: a folyadékfázis sűrűsége a hőmérsékletnövekedés hatására csökken, míg a gázfázis sűrűsége nő a nyomás növekedésével a kritikus pontig, ekkor a fázisok sűrűsége egyenlővé válik és eltűnik közöttük a fázishatár. [29] A kritikus pont elérésével az anyag olyan halmazállapotba kerül, melyben tulajdonságai a folyadék és a gáz állapot között helyezkednek el.

A szuperkritikus fluidumok a hagyományos oldószerek alternatívái lehetnek mind extrakciókban, frakcionálásokban, kémiai reakciókban, biokémiai reakciókban illetve analízisek esetén is, mely számos előnyös tulajdonságukból adódik. Ezen előnyök közé tartozik a gyors anyagtranszport, mely a magas diffuzivitásból és az alacsony viszkozitásból ered; az anyagok oldhatóságának egyszerű szabályozhatósága (két független paraméter, a hőmérséklet és a nyomás, változtatása útján szabályozható az anyagok oldhatósága szuperkritikus fluidumokban), mellyel egyben a reakciók szelektivitása is változtatható. Emellett a szuperkritikus fluidumnak a reakció vagy extrakció utáni könnyű eltávolíthatósága lehetővé teszi az oldószermaradványoktól mentes reakciótermékek elérését. [30] [31]

II.3.1. Szuperkritikus szén-dioxid

1879-ben Hannay és Hogarth fedezte fel, hogy a szuperkritikus fluidumok képesek feloldani alacsony gőznyomású szilárd anyagokat (például szervesetlen sókat). Szuperkritikus etanolban a nyomás növelésével a kobalt-klorid jól oldódott, míg a nyomás csökkentésével a só kivált az oldatból. Ez a sajátos tulajdonság a tudósok számára érdekessé tette az SCF-ok oldó-tulajdonságainak széleskörű vizsgálatát, mely az 1960-as évekre már az SCF-ok ipari alkalmazását is lehetővé tette. A szuperkritikus fluidumok közül elsősorban a szén-dioxidot használták ipari léptékben a toxikus szerves oldószerek helyettesítőjeként, elsőként kávébab, komló, fűszerek és tealevél szerves anyagainak extrakciójához. [32] Korai alkalmazásai közé sokáig mindössze az extrakció és az elválasztás tartozott, előrelépés csak a 20. század végén történt, mikor szuperkritikus reakciókban kezdték alkalmazni, mint reakcióközeg, szerves oldószerek helyettesítője, illetve társoldószerként. Ma már az extrakció mellett hidrogénezésnél és kontrollált polimerizációknál, kémiai szintéziseknél és biokémiai, enzimkatalizált reakcióknál is egyre elterjedtebben alkalmazzák, illetve jelentős vizsgálatok folynak gáz-folyadék és folyadék-folyadék (acetilálás, alkilálás, észterezés) reakciókra vonatkozóan.

A szuperkritikus szén-dioxidot ($scCO_2$) sokan, mint „zöld” oldószert definiálják, mivel nem toxikus, nem karcinogén, kémiailag inert, nem tűzveszélyes, emellett nem túl drága és

könnyen hozzá lehet jutni. A szén-dioxidnak viszonylag alacsonyak a kritikus paraméterei (kritikus nyomás: 7,38 MPa, kritikus hőmérséklete: 31,1 °C), így biológiailag aktív hőmérséklet-érzékeny anyagokkal végzett reakciókhoz is alkalmas oldószer lehet. A scCO_2 előnyös tulajdonságaihoz tartozik, hogy sűrűsége, diffuzivitása, viszkozitása és oldóképessége is változtatható a nyomás és/vagy a hőmérséklet változtatásával a folyékony és a gáz állapotú szén-dioxid értékei között, mely által a reakciósebesség és a szelektivitás is befolyásolható. Szuperkritikus közegben végzett reakciók során is magas hozam érhető el nagy szelektivitás mellett, illetve az anyagtranszport problémái is kiküszöbölhetőek. Mellékreakciók és a melléktermékek keletkezése számos esetben jelentősen visszaszorul, hiszen a reaktánsokra nézve a szén-dioxid inert. [33] Legnagyobb technológiai előnyének tartott tulajdonsága, hogy a reakciót követően nyomáscsökkentéssel a szén-dioxid gáz formájában eltávozik, így oldószermentes terméket kapunk. Hátránya viszont, hogy a hidrofíl anyagok oldhatósága alacsony szuperkritikus szén-dioxidban, mely probléma esetenként kiküszöbölhető valamilyen poláris folyadék hozzáadásával, például segédoldószerként kis mennyiségű etanol adagolásával javítható a poláris molekulák oldhatósága. [34] Ugyancsak hátrányai közé tartozik, hogy megfelelő, nyomásálló berendezések szükségesek, illetve nagyobb energiafelhasználással járhat a szén-dioxidban végzett reakció, mint atmoszférikus körülmények között.

II.3.2. Enzimkatalizált reakció szuperkritikus fluidumban

Az enzimek alapvetően az élő szervezetekben megtalálható katalizátorok, így természetes közegük a víz. A víz ellenben gyenge oldószer az iparban, mivel számos szerves vegyület vízoldhatatlan, illetve instabillá válhat a vizes közegben. Ráadásul a víz eltávolítása a reakciót követően költséges a víz magas forráspontja és nagy párolgáshője miatt. Ugyancsak hátránya a vizes közegnek a mellékreakciók, mint például hidrolízis, racemizáció vagy polimerizáció, mely a fő folyamatokat kísérheti. [35] [36]

A víz helyett megoldást jelenthet a hagyományos szerves oldószerek használata vagy a szuperkritikus fluidumok, hiszen egyes enzimek, főleg a lipázok, képesek megőrizni aktivitásukat szuperkritikus állapotú oldószerekben, így például scCO_2 -ban. Több mint két évtized telt el azóta, hogy az első szuperkritikus fluidumban végzett enzim-katalizált reakciót publikálták. Randolph és társai (1985) [37], illetve Hammond és társai (1985) [38] egyaránt használták az enzimeket szuperkritikus fluidumban. [39] Az 1990-es évekig kevés publikáció született a szuperkritikus fluidumok biokémiai reakciókban való alkalmazására vonatkozóan. Ez elsősorban a magas nyomású üzemeltetés technikai nehézségeivel volt összefüggésben. 1990-es évek legelején Dumont és társai etil-mirisztát, mirisztinsav etanollal történő észterezésén keresztüli enzimatiszintézisét vizsgálták scCO_2 -ban, melyet a laborukban kifejlesztett egyszerű, kevert, szakaszos tartályreaktorban valósítottak meg, átlépve ezzel az addigi technológiai problémákat. [28] Az 1992-ben készült publikáció óta számos kutatás folyt a szuperkritikus fluidumban megvalósítható biokatalízis témakörében. Beckman átfogó tanulmányokat végzett a scCO_2 „zöld” kémiai szintézisekben és folyamatokban

megvalósítható széles körű felhasználását illetően. [40] Mesiano és társai mélyebbre ható kutatásokat végeztek a fizikai és egyéb paraméterekre vonatkozóan, melyek hatással vannak az enzimkatalízisre szuperkritikus fluidumokban. [41] Emellett több dokumentum is született arról, hogy az enzimkatalizált reakciók által szuperkritikus szén-dioxidban átlagon felüli eredményeket értek el, összehasonlítva a hagyományos szerves oldószeres vagy éppen az oldószermentes rendszerekhez képest. A reakciósebesség és a konverzió emelkedése mellett számos esetben az enantioszelektivitás is befolyásolhatónak bizonyult. Ezen előnyök mind a scCO_2 specifikus előnyeinek tulajdoníthatók, mint például az alacsony viszkozitásnak vagy az oldott szubsztrátok nagy diffuzivitásának. A biokatalízisre legalkalmasabb szuperkritikus fluidum a scCO_2 az eddig felsorolt tulajdonságok mellett többek között azért is, hiszen olcsó, könnyű hozzájutni, biztonságos, nem-oxidáló közeget biztosít, egyszerűbb „downstream” műveleteket tesz lehetővé [42] és ezt tartják a „legzöldebb” szuperkritikus fluidumnak az enzimreakciókhoz megfelelően alacsony kritikus hőmérséklet és nyomás értékekkel. Napjainkban széles körben használják a szuperkritikus szén-dioxidot az élelmiszeriparban illetve a finomkémiai iparban. [43]

II.3.2.1. Enzimstabilitás szuperkritikus fluidumokban

Biokatalízis esetén az enzimstabilitás kulcsfontosságú kritérium, ahhoz hogy az enzim-katalizált reakciót alkalmazó eljárás gazdaságos lehessen. A nyomás és a hőmérséklet növelése az enzim inaktivációjához vezethet. Nagy nyomáson a fehérjék térbeli szerkezete átalakul, így denaturálódhat elvesztve aktivitását. Hasonlóan a hőmérséklet növelésének hatására, a protein hőmérséklet optimumát meghaladva, az enzimaktivitás drasztikusan csökkenni kezd a hődenaturáció következtében. Ennek ellenére sok enzim stabil marad szuperkritikus fluidumokban. A nyomás és hőmérséklet enzimre gyakorolt hatása mellett, a szubsztrát és a végső termék is okozhat enzimaktivitás csökkenést szuperkritikus fluidumokban, az egyéb oldószerekben lejátszódó folyamatokkal analóg módon. Az aktivitáscsökkenést okozó szubsztrát- vagy termék-inhibíció abban az esetben lép fel, ha a szubsztrát vagy a termék blokkolja az enzim aktív centrumát, így nem csak az aktivitását, de a szelektivitását is befolyásolhatja a katalizátornak. A szubsztrát-inhibíciót viszonylag könnyű meggátolni a szubsztrát alacsony koncentrációjának fenntartásával folyamatos szubsztrátadagolás mellett. Ezzel szemben a termék-inhibíciót problémásabb kezelni, hiszen biztosítani kell a képződő termék folyamatos eltávolítását a reakcióelegyből. [17]

II.3.2.2. Nyomás és hőmérséklet hatása az enzimikus reakciókra

A kémiai reakciókat önmagában is befolyásoló hőmérséklet (az Arrhenius-összefüggés alapján a hőmérséklet emelkedésével nő a reakciók sebessége általában (5. egyenlet)) és nyomás a szuperkritikus szén-dioxid tulajdonságait is meghatározza, emellett fontos figyelembe venni az enzimre gyakorolt hatásukat is. Ebből adódóan a két paraméter egyenkénti, avagy együttes változtatása jelentős befolyással bír a reakció lefolyására és eredményére (szelektivitás, hozam stb.).

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}}$$

5. egyenlet: Arrhenius összefüggés

(A: preexponenciális tényező, E_a : aktiválási energia [J/mol], R: egyetemes gázállandó [J/mol·K], T: hőmérséklet [K])

A hőmérséklet esetében a hőmérséklet növekedése általában növeli a reakciósebességet, hiszen a molekulák kinetikai energiája nagyobb, így könnyebben leküzdhető a reakció végbemeneteléhez szükséges aktiválási energia, emellett a scCO_2 viszkozitása és sűrűsége csökken. Az anyagok oldhatósága általában nő, így gyorsabb az anyagtranszport a reakcióközegben. Ebből kiindulva a hőmérséklet növelése a reakció gyors lefolyásának kedvez, mégis figyelembe véve az enzimek fehérje voltát, túl magas hőmérséklet nem alkalmazható, mivel az enzim denaturálódhat, elveszítve ezáltal katalitikus aktivitását. Az enzimek jellegzetes térszerkezettel rendelkező, megfelelően „hajtogatott” polipeptid molekulák, a hajtogatottságukat hidrogén-híd, ionos és hidrofób kapcsolatok, illetve diszulfid-hidak stabilizálják. A nyomás és hőmérséklet megváltozása okozta szerkezetmódosulások pedig a fehérje denaturációját okozhatják, így csökkentve az enzim produktivitását. [30] [17] Paljevac és társai racém 1-feniletanol vinil-acetáttal történő lipáz-katalizált átészterezését vizsgálták szuperkritikus szén-dioxidban, mely során vizsgálták a nyomás és hőmérséklet hatását. 40 és 80 °C között nem tapasztaltak jelentős különbséget a reakció menetében, de míg 40 és 60 °C esetén az 50 %-os konverziót már 3 óra után elérték, addig 80 °C-on végzett reakció esetén csak 4 órát követően érték el ugyanezt az értéket, 100 °C felett pedig a konverzió drasztikus csökkenést mutatott az alacsonyabb hőmérsékletű reakciókhoz képest. A jelenséget azzal magyarázták, hogy bár a hőmérséklet növelése több molekuláris ütközést tesz lehetővé, bizonyos hőmérséklet felett az enzim a megszűnő hidrogén-kötések következtében elveszti háromdimenziós szerkezetét, denaturálódik. A kezdeti reakciósebesség tekintetében 80 °C-on érték el a legmagasabb értéket, míg 80 °C felett a kezdeti reakciósebesség jelentős csökkenést mutatott feltehetően az enzim termikus inaktivációja és a vinil-acetát elpárolgása (a vinil-acetát forráspontja 72 °C légköri nyomáson) miatt. [44]

A nyomás a szén-dioxid sűrűségfüggő tulajdonságait befolyásolja, úgymint a szubsztrátok megoszlási hányadosát, a dielektromos konstanst, a Hildebrandt oldhatósági paramétert, mely közvetetten szabályozza az enzim aktivitását, specifitását és stabilitását is. A nyomás hatással van a reakciósebességre, hiszen a reaktánsok és a termékek oldhatósága nyomásfüggő. [17] Emellett például egy polimerizációs reakcióban a kapott termék is meghatározható a nyomás szabályozásával, hiszen a polimerizáció foka is nyomásfüggő. [30] A nyomás növelése a reakció végbemenetelének szempontjából általában nem okoz változást, ellenben 150 MPa felett már lehet nyomás-indukált enzim inaktiváció, mely általában még reverzibilis, de 300 MPa felett már irreverzibilis az enzimdenaturáció. Paljevac és társai rac-1-feniletanol vinil-acetáttal történő enzimatis reakciójában vizsgálták a nyomás hatását 40 °C-on 8 és 30 MPa között. A legnagyobb különbségeket a reakciók első két órás szakaszában tapasztalták. 8 MPa-ról 10 MPa-ra növelve a nyomást a konverzió

növekedését figyelték meg, mely valószínűleg annak tudható be, hogy a reakcióelegy oldhatósága megnőtt a szén-dioxidban. Ezzel szemben, ha 20 MPa-ról 30 MPa-ra növelték a nyomást, abban az esetben a konverzió csökkent. Ezt azzal magyarázták, hogy a nagyobb nyomás létrehozásához több szén-dioxidot kell a rendszerbe juttatni, így hígítási hatás érvényesül. A kezdeti reakciósebesség vizsgálatakor a legmagasabb értéket 10 MPa esetén érték el. A nyomás növelésének következtében két ellentétes hatás léphet fel: a nyomást növelve nő a szubsztrát oldhatósága szuperkritikus szén-dioxidban, ezáltal nagyobb lesz a kiindulási reakciósebesség, de a nagy nyomás hatására a fehérje szerkezete deformálódhat, így olyan konformációváltozások jöhetnek létre, mely alacsonyabb enzimaktivitást eredményezhet. [44]

Nyomás és hőmérséklet hatása az enantioszelektivitásra

A szuperkritikus szén-dioxid oldószerként, illetve reakcióközegként történő felhasználása lehetőséget ad az oldószer hatásának vizsgálatára az oldószer típusának változtatása nélkül. Ráadásul a reakció szabályozható a nyomás és hőmérséklet megfelelő beállításával, így például a biokatalitikus reakció enantioszelektivitása is befolyásolható a nyomás és hőmérséklet szabályozásával Matsuda és társai szerint. Matsuda kutatócsoportjával 1-(p-klorofenil)-2,2,2-trifluoretanol enantioszelektív acetilálását vizsgálta scCO_2 -ban. Elsőként egy rögzített hőmérsékleten vizsgálták a nyomás hatását, majd több különböző hőmérsékletértéken is megismételték a kísérleteket. A kísérletek eredményei azt mutatták, hogy állandó hőmérsékleten az enantioszelektivitást jellemző E-érték a nyomás növelésével folyamatosan csökkent. Ezt a jelenséget magyarázza, hogy a nyomás növelése okozta sűrűségváltozás megváltoztatja a CO_2 és az enzim közötti kapcsolatot. A szén-dioxidból karbamát alakul ki, míg az enzim felszínén szabad amino-csoport jön létre, így a CO_2 az enzim felszínére képes adszorbeálódni és/vagy az enzim szubsztrátkötő helyére kötődik. Ez a kölcsönhatás fokozatosan megváltoztatja az enzim konformációját, így reagálva a nyomás módosulására és folyamatos változást eredményezve az enantioszelektivitásban. [45] Második lépésben a hőmérséklet hatását vizsgálták az enantioszelektivitásra: alacsony hőmérsékleten (30-40 °C) az E-érték gyorsan csökkent kis nyomástartományban 10 MPa alatt, ezzel szemben magasabb hőmérsékleten 14 MPa alatt folyamatos és lassabb változást figyeltek meg szélesebb nyomástartományban végzett kísérletek alapján. Az eredmények erőteljesen korreláltak a sűrűségváltozással: alacsony hőmérsékleten 10 MPa alatt a sűrűség gyorsan változik, míg magasabb hőmérsékleten a sűrűség széles nyomástartományban folyamatosan csökken. Emellett összehasonlították az ugyanolyan sűrűség (különböző nyomás és hőmérséklet, de azonos sűrűség) esetén kapott E-értékeket, melyek eltértek egymástól. Magasabb hőmérsékleten alacsonyabb enantioszelektivitást tapasztaltak, azaz az enantioszelektivitást nem csak a sűrűség, hanem a hőmérséklet is meghatározza, így a nyomás és hőmérséklet külön-külön és együttes szabályozása is befolyásolja a reakció enantioszelektivitását. [46]

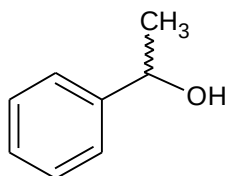
II.3.2.3. A víztartalom hatása

Az enzimkatalizált reakciókban az egyik legfontosabb faktor, mely hatással van az enzimaktivitásra a reakcióközeg víztartalma. Az enzimnek adott mennyiségű kötött vízre minden közegben szüksége van ahhoz, hogy megőrizze aktivitását. A víznek az enzimműködésre gyakorolt hatása három módon is megnyilvánulhat: az enzimszerkezetre nem kovalens kötésekkel keresztül; hidrogénkötések szétszakítása révén ugyancsak elsősorban az enzim szerkezetére hat; míg a reagensek diffúzióját elősegítve a reakció egyensúlyát is befolyásolhatja. A víz teljes eltávolítása nem-vizes oldószerből (szerves oldószerből vagy SCF-ből) a natív enzimszerkezet eltorzulásához, az enzimaktivitás drasztikus csökkenéséhez vezet. A katalízis vízszükséglete nyilvánvaló, de az igényelt víz mennyisége már kevésbé egyértelmű. Dumont és társai etil-mirisztát szuperkritikus szén-dioxidban, illetve *n*-hexán oldószerben végrehajtott enzimatiszintézise esetén vizsgálták a reakció vízigényét. Mindkét oldószer alkalmazása esetén egy-egy optimumot állapítottak meg, melynél kisebb vagy nagyobb víztartalom esetén a reakció kezdeti reakciósebessége erősen lecsökkent. A két oldószer esetén az optimumok nem egyeztek meg, mely abból adódik, hogy a szén-dioxid nagyobb mennyiségű víz oldására képes, mint a hexán, ezáltal több víznek kell jelen lennie a reakcióközegben ahhoz, hogy a szén-dioxid vízzel való telítődése ne az enzim számára létfontosságú vízréteg elvonásával történjen meg. Bár CO₂ esetén nagyobb víztartalom szükséges, mint szerves oldószer esetén, még ez is viszonylag alacsonynak számít. Az optimum vízmennyiséget túllépve a reakciósebesség jelentős csökkenést mutat, melyet okozhat a víz enzimre gyakorolt közvetlen hatása túlnyomás alatt avagy a termékek hidrolízise is. Dumont a jelenséget azzal magyarázta, hogy a felesleges vizet az enzim adszorbeálja és több réteg vízzel teljes mértékben hidratálódik. Az enzim felszínén kialakult vízréteg pedig válaszfalként viselkedik az enzim és a reakcióközeg főtömege között, így csökkentve az enzimaktivitást. [28] Nagy vízakaktivitás a fehérje szerkezetének megváltozását is okozhatja denaturációját indukálva vagy aggregáció következtében a reakcióra alkalmas aktív felületet csökkenti, de akár kompetitív inhibitorként is viselkedhet a víz. Ezt a feltevést Halling kinetikai tanulmánya is megerősítette: a K_m érték (az a szubsztrátkoncentráció, amelynél az enzimreakció a maximális sebesség felével halad) a vízakaktivitás növelésével növekedett, mely az enzim kisebb affinitását eredményezte a szubsztrátra nézve. [47] Összességében a vízakaktivitás megfelelő értékre való beállítása azért is fontos, mivel megfelelő vízmennyiség nélkül az enzim veszíthet a szelektivitásából, illetve a reakció egyensúlya eltolódik az eredetihez képest. Ezzel szemben nagy mennyiségű víz hozzáadása csökkenti mind az enzim aktivitását, mely alacsony konverzió értékhez vezet, mind az enantioszelektivitást, illetve erősen csökkenti a reakciósebességet is. A felsorolt nem kívánt hatások kiküszöbölhetőek a vízkoncentrációnak az enzimre jellemző optimális tartományon belül tartásával a reakció során. [34]

II.4 Reakcióhoz használt vegyületek

II.4.1. 1-feniletanol

Az 1-feniletanol (CAS: 98-85-1, 5. ábra) a legegyszerűbb szekunder alkoholok közé tartozik, kiválóan alkalmas modell-vegyület enzimkatalizált (át)észterezési reakciókhoz.



5. ábra: 1-feniletanol szerkezeti képe

Az optikailag aktív 1-feniletanol, különösen az (*R*)-1-feniletanol, gyakran használt királis építőelem és szintetikus intermedier a finomkémiai-, gyógyszer- és agrokémiai iparban. A gyógyszeriparban az (*R*)-1-feniletanolt természetes konvzerválószerként alkalmazzák, de képes gátolni a koleszterin bélen keresztüli adszorpcióját, így csökkentve a koleszterin-szintet. Az enantiomerek más felhasználási területei közé tartoznak a kémiai analízisek. Mind az (*R*)-, mind az (*S*)-1-feniletanolt királis reagensként alkalmazzák az enantiomertisztaság meghatározásához és ciklikus anhidridek, illetve epoxidok aszimmetrikus gyűrűnyitásához. [48]

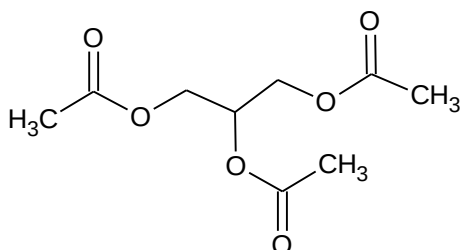
Racém 1-feniletanol vegyület enzimkatalizált kinetikus reszolválása általában észterezésen keresztül az egyik legtöbbet vizsgált modell reakció. Publikációk készültek különböző reakcióközegekben megvalósított reszolválási reakciókról: szerves oldószerben [49]; nagy nyomáson szuperkritikus szén-dioxidban [50]; scCO_2 /ionos folyadék rendszerben [44]; illetve különböző ionos folyadékokban [51]; de vákuum alatti reakciókat is vizsgáltak. [52] Tanulmányok születtek a műveleti paraméterek optimalizálásához, kinetikai modell vizsgálatához kapcsolódóan, illetve a kapott eredmények alapján reaktormodellezést is végeztek. [53] [21] [54] Chua és társai például hatféle immobilizált lipáz enzim, többek között a *Candida antarctica* lipáz B enzim, kinetikai paramétereit vizsgálták *rac*-1-feniletanol kinetikus reszolválásának reakcióján keresztül, reakcióközegként szerves oldószert, észterdonorként zsírsavakat választva. Vizsgálták a szubsztrátok koncentrációinak hatását, a zsírsavak (laurinsav, mirisztinsav, palmitinsav, sztearinsav) szénláncainak hossz-különbségéből adódó eltéréseket, illetve az alkalmazott oldószer (izooktán, heptán, hexán, ciklohexán) és a hőmérséklet hatását. Az enzimkatalizált észterezési reakciókat szakaszos és folyamatos reaktorban is vizsgálták. [55] Az oldószer és a reakcióközeg víztartalmának, illetve a vízhez hasonló vegyületek, mint például glicerín, enzim aktivitására és szelektivitására gyakorolt hatásával Chua munkatársaival a későbbiekben is részletesen foglalkozott. [56]

Az 1-feniletanol észterezését legtöbbször vinil-acetáttal végzik, de ennél hosszabb szénláncú észterezőszerrel is magas konverziójú és enantioszelektivitású reszolválás

valósítható meg. Wolfson és társai többféle szekunder alkohol, köztük racém 1-feniletanol, kinetikus reszolválását glicerín-triacetát (triacetin) oldószerben hajtották végre egyéb oldószer hozzáadása nélkül. A triacetin, mint oldószer és egyben észterdonorként való alkalmazását a vegyület fizikai tulajdonságai tették lehetővé: folyékony halmazállapot, magas forráspont, alacsony gőztenzió. A kísérleteket 80 °C hőmérsékletű olajfürdőben végezték 5 órán keresztül, immobilizált *Candida antarctica* lipáz B enzimet használtak a reakciókhoz katalizátoraként. A reakciók végén a reakcióelegyet lehűtötték és a termékeket belőle dietil-éterrel extrahálták, melyet gázkromatográffal analizáltak. A reakciók során magas konverziót és enantioszelektivitást értek el (konverzió: 50% körüli értékek, enantiomerfelesleg [ee]: 97% környékén ingadozó értékek), azonban az enzimkinetikai paramétereket nem határozták meg. [57]

II.4.2. Glicerín-triacetát

A glicerín-triacetát (CAS: 102-76-1, 6. ábra) vagy más néven triacetin a glicerinnel három molekula ecetsavval alkotott észtere. Színtelen, áttetsző, gyenge szagú, kissé olajszerű folyadék, mely vízkötő hatása miatt képes az élelmiszert nedvesen tartani. Elsősorban az élelmiszeriparban rágógumi és aromák előállításához használják (E1518).

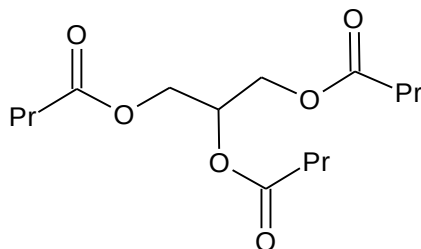


6. ábra: Glicerín-triacetát szerkezeti képe

A triacetint, mint észterező ágenszt, lipáz-katalizált reszolválásokban többen is vizsgálták. Lokotsch és munkatársai *D,L*-mentol kinetikus reszolválását tanulmányozták izooktánban, észterdonorként triacetint alkalmazva. [58] Claon és munkatársai terpén-észterek szintézisét valósították meg metil/etil-észterek és triacil-gliceridek enzimkatalizált átészterezése útján. [59] Gerániol és citronellol *Candida antarctica* lipáz által katalizált átészterezési reakciója kapcsán részletesen vizsgálták az oldószer, a reakcióidő, a reakcióhoz adott víz mennyiségének, a hőmérsékletnek és az enzim újra felhasználásának hatását. A reakciókhoz észterezőszerként triacetint alkalmaztak. [60]

II.4.3. Glicerín-tributirát

A glicerín-tributirát (CAS: 60-01-5, 7. ábra) vagy más néven tributirin a vajsav és a glicerín jellegzetes szagú észtere, mely természetes módon elsősorban a vajban fordul elő. A tributirint az élelmiszeriparban margarin gyártásához használják, míg mikrobiológiai laboratóriumokban *Moraxella catarrhalis* baktérium egyéb *Neisseria* törzsektől való elválasztásához a butirát-észteráz (tributirin) spot-teszten alapuló identifikálás útján. [61]



7. ábra: Glicerín-tributirát szerkezeti képlete

A tributirin észterezési reakcióját már többen is vizsgálták, így például Bagi Krisztina sertés hasnyálmirigyből kinyert lipáz enzim szubsztrátspecifitását tanulmányozta tributirin és fruktóz reakciójával.[62] Urban, Svec és Fréchet immobilizált lipáz enzimet tartalmazó reaktort készített triacil-gliceridek transzészterezéséhez. A készített reaktor segítségével olyan zsírsav-metil-észtereket tudtak előállítani, mely a biodízel szintézis alapanyagául szolgálhat. A reaktor paramétereinek optimalizálása során modellreakcióként a tributirin metanollal történő átészterezését alkalmazták. [63]

III. Kísérleti leírás

III.1. Felhasznált anyagok

- 1-feniletanol (PE), ($\geq 98\%$ tisztaságú, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Glicerín-triacetát (GTA), ($\geq 99\%$ tisztaságú, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Glicerín-tributirát (GTB), ($\geq 99\%$ tisztaságú, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- 1-feniletil-acetát (PEAc), ($\geq 99\%$ tisztaságú, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Makropórusos gyantán rögzített *Candida antarctica* lipáz B (CALB) enzimkészítmény (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Szén-dioxid ($\geq 99,5\%$ tisztaságú, Linde Gáz Magyarország Zrt.)
- *n*-Hexán ($\geq 95\%$ tisztaságú, Merck KGaA)
- kukoricacsíra-, szója- és tökmagolaj (a kutatócsoport extrahálta szuperkritikus szén-dioxiddal)

III.2. Kísérleti módszerek

III.2.1. Légköri nyomáson végzett kísérletek

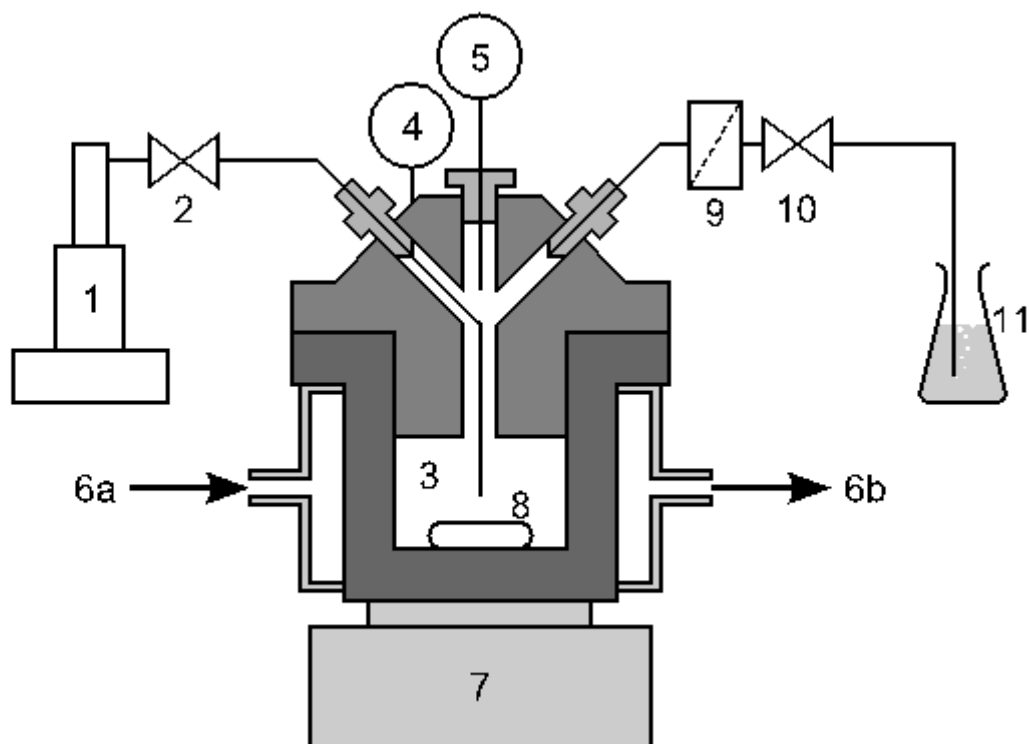
A légköri nyomáson végzett kísérleteket 20 ml térfogatú, csavaros kupakkal zárható üvegekben végeztem. A reakció kezdete előtt a vízfürdőt kívánt hőmérsékletűre melegítettem. Az üvegekbe először az adott térfogatú PE-t és a triacetint vagy tributirint, illetve oldószeres reakcióknál *n*-hexánt mértem be, majd a mágneses keverőmagot tettem bele és végül 20 mg enzimet mértem be analitikai mérlegen. Az enzim reakcióelegyhez történő öntése után az üveget rögtön lezártam és a vízfürdőbe helyeztem, ettől a pillanattól számítottam a reakcióidőt. A reakció során adott időközönként mintát vettem a reakcióelegyből: a reakcióelegyből 20-30 μ l térfogatú mintát vettem pipettával, majd *n*-hexánnal 1 ml térfogatra hígítottam. A reakció során vett mintákat gázkromatográffal elemeztem.

Természetes olajokkal végzett reakciók esetén az előző reakciókhoz hasonlóan 20 ml térfogatú, csavaros kupakkal zárható üvegekbe először 1 ml olajat és adott mennyiségű PE-t mértem be pipettával. A bemért PE pontos tömegét visszaméréssel határoztam meg analitikai mérlegen. A reakcióelegyhez 20 mg enzimet adtam, majd a mágneses keverőmag üvegcsébe helyezése után az üveget lezártam és az előmelegített vízfürdőbe helyeztem. A reakcióidőt ettől a pillanattól számítottam. A reakcióelegyből adott időközönként mintát vettem a következő módon: a reakcióelegyből 5 μ l mintát pipettáztam 4 ml metanolba, mely két fázist alkotott. Az alkohol-komponenseket az elegy erőteljes megrázásával extraháltam a metanolos fázisba. Az opálössz álló elegyet hagytam leülepedni, majd a kitisztult metanolos

fázisból 1 ml mennyisényt pipettáztam át GC-üvegcsébe, melyet gázkromatográffal elemeztem.

III.2.2. Nagy nyomáson, szén-dioxid oldószerben végzett kísérletek

A szén-dioxid oldószerben végzett kísérleteket a 8. ábrán látható szakaszos, kevert, rozsdamentes-acél tartályreaktorban végeztem, melynek belső térfogatát kalibrációval állapítottam meg: a mérések alapján 37,2 ml-nek adódott a térfogat.



8. ábra: A szakaszos, kevert tartályreaktor sematikus vázlata

(1: ISCO típusú nagy nyomású CO₂ szivattyú, 2: bevezető szelep, 3: reaktortér, 4: digitális manométer, 5: hőmérő, 6a és 6b: termosztáló közeg be- és kivezetése, 7: mágneses keverő, 8: mágneses keverőmag, 9: szűrőbetét, 10: kivezetőszelep, 11: folyadékcsapda)

A kísérlet megkezdése előtt a reaktort kívánt hőmérsékletűre melegítettem: a reaktor dupla falú, így a termosztáló köpenyen keresztül átvezetett megfelelő hőmérsékletű termosztáló vízzel történt a felmelegítés, illetve a reakció során a hőmérséklet állandó értéken tartása a reaktorban. A kívánt hőmérséklet elérését követően a reaktorba elsőként adott mennyiségű reaktánsokat (PE és GTA/kukoricacsíra-olaj) pipettával mértem be, majd 20 mg tömegű enzimet mértem hozzá analitikai mérlegen, tömeg-visszaméréssel. A reaktort lezártam, ettől a pillanattól számítottam a reakció kezdetét. A reaktort szén-dioxiddal töltöttem fel a CO₂-palackból 100 bar nyomásra az ISCO 920D típusú nagy nyomású szivattyú (1) segítségével, a töltés sebességét a reaktor bemenő szelepével (2) szabályoztam, az elért nyomást a reaktorhoz kapcsolódó digitális manométeren (4) ellenőriztem. A kívánt nyomás elérését követően elzártam a bevezető szelepet, illetve elindítottam a keverést. A mágneses keverőmag (8) forgási sebességét 250 rpm fordulatszámra állítottam be. A reakció

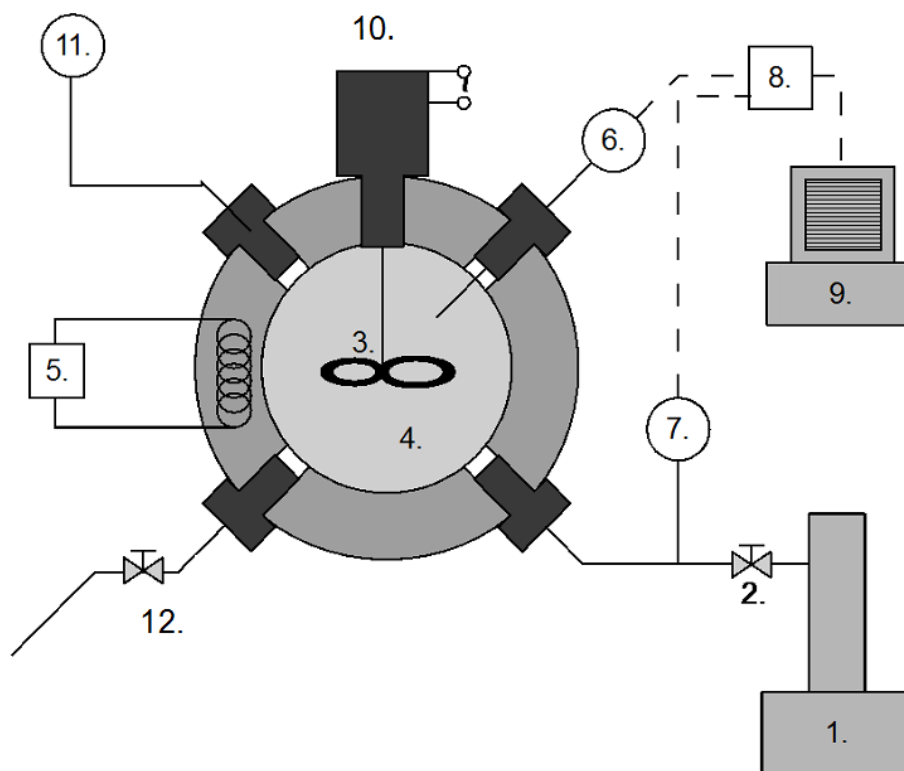
során a reaktor belsejében lévő pillanatnyi hőmérsékletet a reaktorba nyúló hőmérővel (5) tudtam ellenőrizni.

A feltöltést követően megvártam a nyomás és hőmérséklet állandósulását (ez körülbelül 3-5 perc), ezután vettem az első mintát. A mintavételhez 10 ml térfogatú üvegcsébe 4 ml *n*-hexánt (kukoricacsíra-olaj esetén metanolt) pipettáztam, az üvegcsét úgy rögzítettem, hogy a reaktor kivezetőcsöve a folyadékszint alá merüljön. A reaktort 2 ml (a reaktor körülményei között számolt térfogat érték) szén-dioxiddal mostam át, a reaktorból távozó szén-dioxidot folyadékcsapdán (11) átvezetve. A mintát a kivezető szelep (10) megnyitásával engedtem ki a reaktorból a folyadékcsapdába, miközben a bevezetőszelepen keresztül az ISCO típusú nagynyomású szivattyú segítségével pótoltam a kieresztett szén-dioxidot, hogy a nyomás állandó maradjon. A reaktorban lévő enzim kihordását a kivezető szelep elé helyezett szűrő (9) akadályozta meg. A mintavétel körülbelül 0,5-0,8 ml szén-dioxid/perc sebességgel történt. A mintavételt követően a kivezető szelepet 2 ml hexánnal mostam át, majd a kapott mintából 1 ml-nyit pipettáztam át GC-üvegcsébe, melynek tartalmát gázkromatográffal elemeztem. A kívánt reakcióidő leteltét követően a reaktort 90 ml szén-dioxiddal mostam át. A reaktorból távozó szén-dioxidot ezen esetben is *n*-hexános/metanosos folyadékcsapdán vezettem keresztül. A mosást követően a reaktorból a szén-dioxidot és ezzel együtt a nyomást is leengedtem és ugyanabba a folyadékcsapdába vezettem bele, mint amiben a mosás során felfogtam a reaktorból távozó szén-dioxidot. A mosásnál, illetve leengedésnél használt *n*-hexánból/metanóból 1 ml-t GC-üvegcsébe pipettáztam, majd ezt is a többi mintához hasonlóan gázkromatográffal elemeztem. A reakciót követően a használt enzimet enzimaktivitás visszamérés céljából átmostam: az enzimet a reaktorból négyszer 5 ml *n*-hexánnal mostam át egy G4-es pórusméretű üvegszűrőbe. A hexánt az enzimről vákuumszűréssel távolítottam el. A visszamaradt enzimre 2 ml izopropanolt pipettáztam rá, ebben 3 percig hagytam állni, a folyadék vákuummal történő leszívását követően megismételtem ezt a mosási lépést. A két izopropanolos mosást követően *n*-hexánnal mostam az enzimet: 2 ml *n*-hexánt pipettáztam az enzimre, majd 3 percig hagytam ebben állni, végül az *n*-hexánt is vákuumszivattyú segítségével távolítottam el. A tisztított enzimet spatulával Eppendorf-csőbe kapartam és lezárva hűtőbe helyeztem az újra felhasználásig.

III.2.2.1. Oldhatósági próba glicerín-triacetátra

A nagy nyomású kísérletek során a rögzített hőmérséklet és nyomás értékek mellett az egyes reakcióknál állandó triacetin beméréssel dolgoztam, az egyetlen változtatott faktor az 1-feniletanol koncentrációja volt. A szén-dioxid oldószerben végzett kísérleteknél a reakció során a fázisok száma elsősorban a triacetin szén-dioxidban való oldhatóságától függ, mivel sokkal nagyobb bemérési koncentrációban alkalmaztam, mint az alkoholt. Emellett az 1-feniletanol szuperkritikus szén-dioxidban való oldhatóságáról pontos adatok találhatóak az irodalomban. Paiva és társainak vizsgálatait, illetve Gamse és Marr mérései alapján az 1-feniletanol rendkívül jól oldódik szén-dioxidban. [64] [65] Ezen alapfeltevésből kiindulva a reakció során kialakult fázisok számának megállapítása érdekében a glicerín-triacetát

szuperkritikus szén-dioxidban való oldhatóságára egy változtatható térfogatú, nyomásálló, termosztálható cellában (New Ways of Analytics Messgeräte GmbH, Lörrach, Baden-Württemberg, Germany) mérést végeztem. Az oldhatóságot több triacetin koncentrációnál vizsgáltam. Az oldhatósági adatok ismeretében határoztam meg a beméréseket a III.2.2. fejezetben ismertetett nagynyomású, enzimkatalizált reakciót vizsgáló mérésekhez. Az oldhatósági méréshez használt készülék a 9. ábrán látható.



9. ábra: Változtatható térfogatú, nyomásálló cella

(1: ISCO típusú nyomásálló pumpa, 2: bevezető szelep, 3: keverő, 4: cellatér, 5: fűtőszál, 6: hőmérséklet távadó, 7: nyomás távadó, 8: jelátalakító, 9: számítógép, 10: keverőmotor, 11: manométer, 12: kivezető szelep)

A cella két részből áll: cellatest, melynek térfogatát egy mozgatható fémdugattyú segítségével lehet változtatni; és a cella elülső része, melynek közepén egy zafírüveg ablak található, amin keresztül a cellában történő folyamatok nyomon követhetőek. A cella térfogata a fémdugattyú mozgatásával 40 és 70 ml között változtatható, a cellában lévő elegy megfelelő homogenizálását a cellába beépített keverő teszi lehetővé.

A mérés megkezdése előtt az összeszerelt cellát megfelelő hőmérsékletűre fűtöttem fel, majd a glicerín-triacetátot automata pipettával mértem be hőmérő csatlakozási csomópontján keresztül. A bemért glicerín-triacetát pontos tömegét visszamérésessel határoztam meg. Az anyag bemérését követően a cellát lezártam, a cella térfogatát 42 ml-re állítottam be, majd az ISCO 920D típusú nagy nyomású szivattyú (1) segítségével szén-dioxiddal 100 bar nyomásra töltöttem fel. Az egyensúly beállítását követően, állandó hőmérsékleten a dugattyú

mozgatásával változtatva a térfogatot a nyomás is változott, így az adott hőmérsékleten az opálosodási, illetve kitisztulási ponthoz tartozó nyomásértékeket tudtam mérni. Az opálosodási, illetve kitisztulási pontokhoz tartozó nyomásértékeket 40-55 °C-os hőmérséklettartományban vizsgáltam 5°C-onként változtatva a hőmérsékletet. Minden hőmérsékleten legalább két opálosodási, illetve kitisztulási pontot mértem, melyekhez tartozó nyomás-, hőmérséklet- és cellatérfogat értékeket jegyeztem fel.

III.3. A minták elemzéséhez használt analitikai módszer

A reakciók lejátszódása során vett mintákat Finnigan Trace GC ultra típusú gázkromatográfval elemeztem.

Az elemzéshez használt kolonna adatai: Agilent J&W GC Columns, HP-CHIRAL-20 B (30 mm hosszú, 0,250 mm átmérőjű, 0,25 µm filmvastagságú). A triacetint tartalmazó reakciók analitikájához kétlépcsős hőmérsékletprogramot fejlesztettem, mely hőmérsékletprofilja 110 °C-ról indul (6 perc 110 °C-on tartás), majd 4,5 °C/min sebességgel 175 °C-ra melegszik fel, ezt a hőmérsékletet 3 percig tartja meg, majd 12 °C/min sebességgel a végső hőmérsékletig, 230 °C-ig történik a további melegítés, ezt a hőmérsékletet mindössze 1 percig tartja a gázkromatográf. Az elemzés teljes időtartama 29,42 perc. A gázkromatográfban alkalmazott fejnyomás állandó 195 kPa. A tributirines minták esetén kidolgozott elválasztás kissé eltért: az injektálás pillanatától a kolonna hőmérséklete 110 °C-os 18 percen keresztül, ezt követően 20 °C/min sebességgel a végső hőmérsékletig, 240 °C-ig melegszik a kolonna, mely hőmérsékletet 5 percig tartja. Az elemzés teljes időtartama: 29,5 perc. A művelet során a kolonna fejnyomása 170 kPa volt.

A gázkromatográf detektora hidrogén-lángionizációs detektor, vivőgázként héliumot alkalmaztam. A minták injektálását automata mintaadagoló (típus: Thermo Finnigan Autoinjector AI3000) végezte, a mintákból 1 µl mennyiséget injektált Hamilton fecskendővel a 250 °C hőmérsékletű injektorba. Az injektálás előtt ötször *n*-hexánnal öblíti át, majd az injektálandó mintával háromszor mossa át a fecskendőt a mintaadagoló és csak ezt követően történik a minta injektorba adagolása. Végül, az injektálást követően a mintaadagoló ötször mossa át a fecskendőt *n*-hexánnal, ez a lépés az automatikus injektálási program végét jelenti.

A természetes olajat tartalmazó reakcióelegyekből vett minták esetén az elemzési módszer jelentősen eltért az előző kettőtől. A minták metanolos extrakcióját követően a metanolos fázisból vett oldat elemzése történt gázkromatográfval. Az injektálást ezen esetben is az automata mintaadagoló végezte: a mintákból 1 µl mennyiségnyi injektált a 250 °C hőmérsékletű injektorba, a mintaadagoló injektálási programja az előzőekben ismertetettől mindössze annyiban tért el, hogy a Hamilton-fecskendő mosása, öblítése metanollal történt. Jelentősebb eltérés az elemzéshez használt hőmérséklet-programban mutatkozik meg: a program 100 °C-ról indul, mely hőmérsékletet 5 percig tartja állandónak a gázkromatográf, majd 10 °C/perc sebességgel felfűti a kolonnát 200 °C-ra, mely hőmérsékletet 6 percig tart

állandó értéken. A teljes elemzés időtartama 21 perc, az elemzés során alkalmazott állandó fejnnyomás értéke 170 kPa. A detektor és a vivőgáz megegyezik a tributirines és a triacetines minták esetén alkalmazottakkal.

III.4. Számítási módszerek

III.4.1. Az enantiomerelválasztás hatékonyságát jellemző paraméterek számítása

A gázkromatográfiás módszerrel a racém kiindulási elegyet és a racém termékeket is megfelelően el lehetett választani, ezt a vegyületekből készített standard-ok alapján ellenőrizni tudtam. Az eddigi kutatási eredmények ismeretében feltételeztem, hogy a szekunder alkohol (*R*)-enantiomerje sokkal gyorsabban reagál, mint az (*S*)-enantiomer, így a reakció során (*R*)-acetát képződik nagy enantiomerfeleslegben, míg az (*S*)-alkohol marad enantiomertiszta, elreagálatlan formában a reakcióelegyben. [11] [49] [44] A kromatogramokon megjelenő termékcsúcsot így az (*R*)-acetát csúcsának feltételeztem, míg az (*S*)-acetát nem volt kimutatható gázkromatográfiával a reakcióelegyek mintáiból. A reakció kiértékelése során alkalmazott egyszerűsítés, hogy a melléktermékek keletkezését elhanyagolhatónak feltételeztem, mely feltételezést a lipáz enzim specifikására alapoztam.

Az enzimkatalizált reakció enantioszelektivitása két fogalommal jellemezhető: enantiomerfelesleg (*ee* (-)), mely a szubsztrátra és a termékre is számolható, illetve az enantioszelektivitás avagy *E*-érték (-). Az enantiomerfelesleg az enantiomerek egymáshoz viszonyított arányát adja meg:

$$ee = \frac{S - R}{S + R}$$

6. egyenlet: Enantiomerfelesleg számítása

ahol *S* a szubsztrát vagy a termék *S*-enantiomerjének, míg *R* a vegyület (*R*)-enantiomerjének koncentrációja. Az *E*-értéket, mint a két enantiomer specifikus konstansának arányát definiálják:

$$E_{R,S} = \frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right)_R}{\left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right)_S}$$

7. egyenlet: *E*-érték számítása

ahol k_{cat} sebességi konstans avagy turnover number és K_m a Michaelis-konstans, míg az *R* és *S* az enantiomer formáját jelöli. Az egyenlet átalakításával az *E*-érték a szubsztrátra vagy a termékre számolt enantiomerfeleslegből és a konverzióból is számolható (a három változóból kettő mérése elegendő):

$$E = \frac{\ln \left[\frac{1 - ee_s}{1 + (ee_s/ee_p)} \right]}{\ln \left[\frac{1 + ee_s}{1 + (ee_s/ee_p)} \right]} = \frac{\ln[(1 - X)(1 - ee_s)]}{\ln[(1 - X)(1 + ee_s)]}$$

8. egyenlet: E-érték

ahol ee_s a szubsztrátra számolt enantiomerfelesleg, ee_p a termékre számolt enantiomerfelesleg és X a reakció során elért konverzió. Mivel gázkromatográfiás elemzéssel a reakcióelegyből az (S)-terméket nem lehetett kimutatni, így az E-érték számolásához a szubsztrátra számolt enantiomerfelesleget és a konverzió értékeit használtam fel. Az E-érték 1, ha a reakció nem szelektív, míg 20 feletti érték esetén már rezolválásról beszélhetünk, a 200 értéket meghaladva pedig már nincs értelme a pontos érték jelzésének, mivel rendkívül magas enantioszelektivitású már a reakció. [66][67]

Az enzimkatalizált reakció hatékonyságát a termeléssel ($Y(-)$) jellemeztem, mely megadja a reakció során, hogy a kiindulási anyag hányad része alakult át a kívánt terméké:

$$Y = \frac{(R)\text{-észter}}{\text{rac-PE}}$$

9. egyenlet: A termelés általános leírása

ahol (R)-észter a reakció során keletkező termék pillanatnyi koncentrációja, míg rac-PE az alkohol kiindulási koncentrációja. A termelés értéke 0-tól 0,5-ig változhat, mivel racém elegy a kiindulási anyag. Jelen esetben az értéke egyenlő a konverzióval, mivel mellékreakció nem játszódik le.

A reakciókat jellemző értékek számításához a gázkromatográfiás elemzés kromatogramjain megjelenő csúcsalatti területeket használtam fel, melyek arányosak az adott vegyület koncentrációjával. A csúcsterületekből számoltam ki a reakció során elért enantiomerfelesleget a szubsztrátra (ee_s), illetve a termelést (Y_{kal}). A szubsztrátra vonatkozó enantiomerfelesleg számítása a következő egyenlet szerint történt, mely százalékos formában adja meg az ee értékét:

$$ee_s = \frac{A_{S-PE} - A_{R-PE}}{A_{S-PE} + A_{R-PE}} \cdot 100\%$$

10. egyenlet: Enantiomerfelesleg

ahol A_{R-PE} az (R)-alkohol, míg A_{S-PE} az (S)-alkohol csúcsterülete a kromatogramon.

Hasonlóan a csúcsterületek felhasználásával számolható a termelés (Y_{kal}), mely százalékos arányban adja meg a reakció során képződő (R)-észter és a kiindulási racém-alkohol arányát:

$$Y_{kal} = \frac{A_{R-PEAc} \cdot a}{A_{R-PEAc} \cdot a + A_{R-PE} + A_{S-PE}} \cdot 100\%$$

11. egyenlet: Termelés számítása

ahol A_{R-PEAc} az (R)-acetát csúcsterülete a kromatogramon és 'a' az úgynevezett válaszfaktor. A termék az alkoholhoz képest nagyobb csúcsterületet ad adott koncentrációnál, így szükség van a válaszfaktorra a termelés számításához. A 'a' válaszfaktort kalibráció segítségével határoztam meg, ehhez ismert koncentrációjú standard oldatokat készítettem az alkoholból és az észterből is, majd a csúcsterületek arányából és a koncentrációk arányából egy aránypárt számítottam a következő egyenlet alapján:

$$a = \frac{\frac{c_e}{c_a}}{\frac{A_e}{A_a}}$$

12. egyenlet: Válaszfaktor

ahol c_e és c_a az észter illetve az alkohol koncentrációja, míg A_e és A_a az észter és az alkohol csúcsterülete a kromatogramon. Az 'a' válaszfaktor tehát az acetátnak az alkoholra vonatkoztatott relatív jelerősségét adja meg az alkalmazott detektoron, így a számolásokhoz nem szükséges a koncentrációk pontos ismerete, csak a csúcsterületek és a válaszfaktor.

Ha feltételezzük, hogy az (S)-alkohol értéke állandó, azaz elreagálatlanul visszamarad a reakcióelegyben, amelyet a gyakorlat is alátámaszt, abban az esetben az alkohol két enantiomerének csúcsterületeiből is számolható a termelés a következő egyenlet alapján:

$$Y = \left(1 - \frac{A_R}{A_S}\right) \cdot 100\%$$

13. egyenlet: Alkoholok csúcsterületeiből számolt termelés

ahol A_R az (R)-alkohol, A_S az (S)-alkohol csúcsterülete a kromatogramon. A termelés ezen leírása azt fejezi ki, hogy az (R)-enantiomernek hány százaléka alakul át a reakció során (R)-termékké. Azaz szigorúan véve ez egy (R)-enantiomerre számított konverzió, mely értékében megegyezik a termeléssel, mivel nincs mellékreakció. Tehát ha a termelés 100%, akkor az (R)-enantiomer teljes mértékben elreagált. Mivel a kiindulási elegy racém, a kiindulási anyag fele (R)-enantiomer és az (S)-enantiomer átalakulása gyakorlatilag elhanyagolható, így a teljes kiindulási anyag mennyiségére vonatkoztatva ez 50%-os termelést jelent. Elmondható, hogy a 13. egyenlet alapján számított termelés kétszerese a 11. egyenlet szerint számított értéknek. A termelésnek ilyen módú számítása természetesen durva közelítés csak, hiszen alapfeltétele a 100%-os enantiomerfelesleg a termékre nézve.

Az E-érték mellett a reakciót a produktivitás (U ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$)) jellemzi, melyet a reakciónál elsőként levett mintához tartozó konverzióból számoljuk:

$$U = \frac{n_{s_0} \cdot X}{t \cdot m_e}$$

14. egyenlet: Produktivitás

ahol n_{s_0} a kiindulási szubsztrát anyagmennyisége (μmol), az X az első mintához számolt konverzió (-), a t mintavétel ideje percben kifejezve és m_e a bemért enzim tömege (g).

Mivel nincs mellékreakció a resolválás során, ebből adódóan a termelés és a konverzió értéke a racém alkoholra számolva megegyezik.

III.4.2. Kinetikai paraméterek számítása

Az enzim kinetikai paraméterek, azaz a Michaelis-Menten egyenlet konstansai ($r_{\max}$ és K_m) két módszer szerint határozhatók meg: a reakciók lefutása alapján számított kezdeti reakciósebességeket egy kezdeti reakciósebesség - szubsztrátkoncentráció diagramon ábrázoljuk, mellyel egy telítési görbét kapunk; vagy a Michaelis-Menten egyenletet linearizáljuk és a linearizált egyenletet illesztjük a mérési pontokra. Annak érdekében, hogy jobb becslést kapjak a konstansokra, mindkét módszert alkalmaztam a meghatározásához. Az eljárás alkalmazásához szükséges az egyes reakciók esetén a szubsztrát (jelen esetben az 1-feniletanol) bemérési koncentrációja, illetve a reakció kezdeti reakciósebessége. A kiindulási alkohol koncentrációjának számolásánál feltételeztem, hogy a reakció egy izoterm, tökéletesen kevert, szakaszos reaktorban játszódik le, a reakció során a reakcióelegy térfogata nem változik. A kiindulási alkohol koncentrációt az atmoszférikus kísérletek esetén a bemért alkohol mennyiségéből és a reakcióelegy térfogatából (ezt a komponensek térfogatának összegeként határoztam meg) számoltam, míg szuperkritikus szén-dioxidban végzett kísérletek esetén a reakcióelegy térfogatának a reaktor kalibrációval megállapított térfogatát vettem.

A kezdeti reakciósebesség meghatározásának ugyancsak két lehetősége van: a reakció során az egyes minták esetén számolt termelés értékek termelés – idő rendszerben történő ábrázolásával egy exponenciális görbét kapunk, melyre egy matematikai szoftver segítségével görbét illeszthetünk. A másik lehetőség, hogy a termelésből számolt termékkoncentrációt az idő függvényében ábrázoljuk, és az így kapott görbe lineáris szakaszára (ez az első kettő vagy három mérési pont) egyenest illesztünk és ennek a meredekségéből határozzuk meg a kezdeti reakciósebességet.

Görbeillesztés esetén meg kell találni a megfelelő modellt, mely alapján a görbeillesztés történik, jelen esetben a reakciókinetika modelljét. Az enzimkatalizált reakciók alapvetően egyensúlyi reakciók, de abból adódóan, hogy az észterezőszert nagy feleslegben alkalmaztam és a reakciók közel teljesen lejátszódtak, elsőrendű, egyirányú kinetikát alkalmaztam a reakciók sebességének meghatározására.

$$r = k \cdot c_a$$

$$\frac{dc_a}{dt} = -k \cdot c_a$$

15. egyenlet: Elsőrendű kinetika egyenletei

(r : reakciósebesség [$\text{mol}/\text{dm}^3 \cdot \text{perc}$], k : reakciósebességi együttható [$1/\text{perc}$], c_a : kezdeti alkohol koncentráció [mol/dm^3])

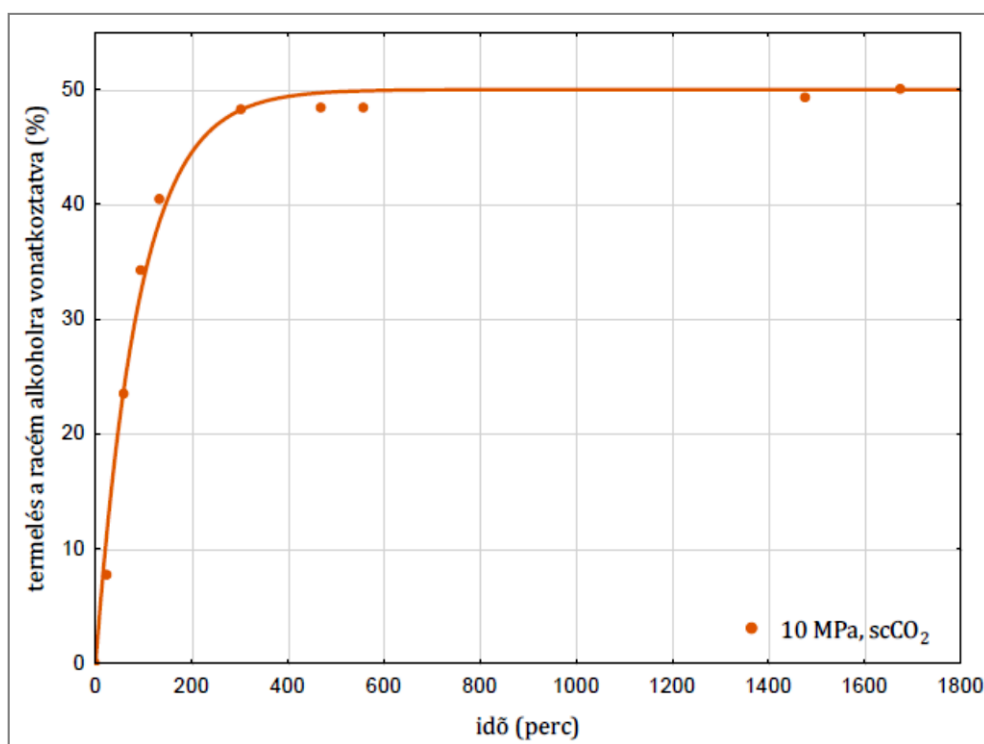
Az egyenlet integrálása és átrendezése után kapjuk a 16. egyenletet, mely összefüggés felhasználásával a kapott termelés - idő pontokra Statistica 12.0 szoftver segítségével görbét illesztettem.

$$c_a = c_{a_0} \cdot e^{-kt}$$

16. egyenlet: A szoftverrel illesztett egyenlet

(c_a a t időpillanathoz tartozó alkohol-koncentráció, c_{a_0} a kezdeti alkohol koncentráció, k a reakciósebességi együttható)

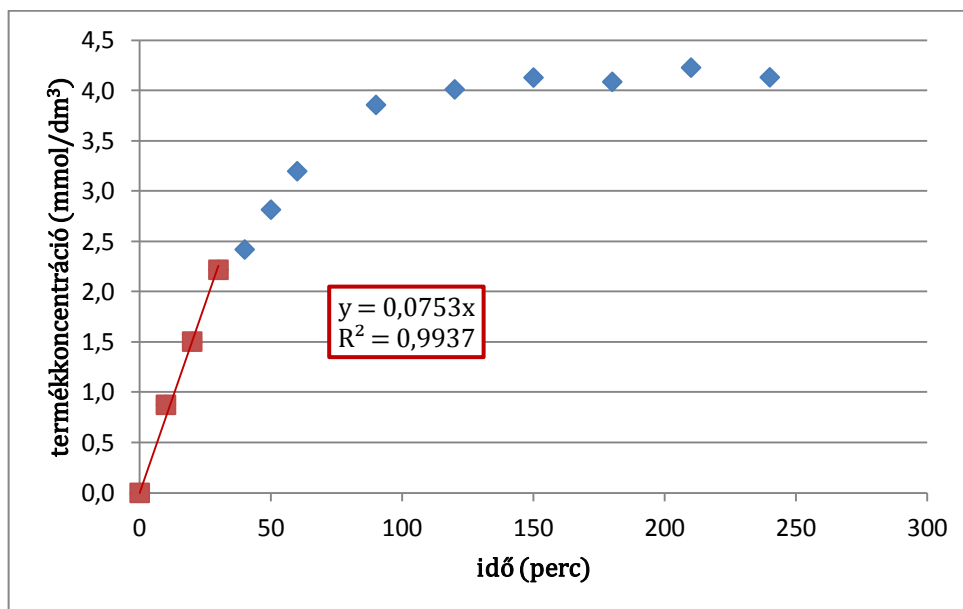
Az illesztett görbék egyenletéből meg tudtam határozni a reakciósebességi együtthatókat (k), az együttható és a kiindulási alkoholkoncentráció szorzata pedig megadja a kezdeti reakciósebességet (15. egyenlet). Annak érdekében, hogy a reakciósebességek függetlenek legyenek az egyes reakciók esetén alkalmazott enzimmennyiségtől, a kezdeti reakciósebességet a bemért enzimmennyiség tömegével normáltam, mely módon a normált kezdeti reakciósebességet kaptam ($r_{0_{norm}}$). Példaként a 10. ábrán egy nagy nyomású, szuperkritikus szén-dioxidban végzett reakció termelés – idő pontjai láthatók, illetve a pontokra illesztett görbe.



10. ábra: Termelés - idő pontokra illesztett görbe egy választott nagy nyomáson végzett reakció esetén (40 °C, 10 MPa (scCO₂), 30 µl PE, észterezőszer: glicerín-triacetát)

A kezdeti reakciósebesség másik típusú meghatározásához a képződött észter-termék koncentrációjának nyomon követése szükséges a reakció folyamán. Az észter-koncentráció - idő pontok ábrázolásával egy fokozatosan csökkenő meredekségű görbét kapunk, melynek a kezdeti lineáris szakaszára illesztett egyenes meredeksége adja a kezdeti reakciósebességet. Mivel az (S)-alkohol átalakulásának sebessége olyan kicsi volt, hogy nem

tudtam megmérni, így a meghatározott reakciósebesség megegyezik az (R)-alkohol átalakulásának kezdeti reakciósebességével. Az ilyen módon kapott reakciósebesség értékeket a reakcióhoz használt enzimmészítmény tömegére vonatkoztatva normalizáltam. A 11. ábrán egy atmoszférikus reakció termékkoncentráció időbeli alakulása látható és az első három pontra illesztett egyenes.



11. ábra: Egy választott atmoszférikus reakció esetén a kezdeti reakciósebesség meghatározása egyenesillesztéssel (40 °C, 0,1 Mpa, 40 µl PE, észterezőszer: glicerín-triacetát, oldószer: *n*-hexán)

A görbe- illetve egyenesillesztésekkel kapott normált kezdeti reakciósebességeket ($r_0 \left(\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3 \cdot \text{perc} \cdot \text{mg enzimmészítmény}} \right)$) a kiindulási szubsztrát-koncentráció ($S_0 \left(\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3} \right)$) függvényében ábrázolva egy olyan görbét kapunk, mely a szubsztrát-koncentráció növekedésével folyamatosan csökkenő meredekségű. A kezdeti reakciósebesség - kezdeti koncentráció pontpárookra a Statistica 12.0 programmal a Michaelis-Menten egyenletnek (17. egyenlet) megfelelő görbét illesztettem.

$$r_{0\text{norm}} = r_{\text{max}} \cdot \frac{S_0}{K_m + S_0}$$

17. egyenlet: A Statistica programmal illesztett Michaelis-Menten egyenlet

A fenti egyenletben $r_{0,\text{norm}} \left(\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3 \cdot \text{perc} \cdot \text{mg enzimmészítmény}} \right)$ a felhasznált enzim tömegével normált kezdeti reakciósebesség, $r_{\text{max}} \left(\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3 \cdot \text{perc} \cdot \text{mg enzimmészítmény}} \right)$ a maximális kezdeti reakciósebesség, $K_m \left(\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3} \right)$ a Michaelis konstans és $S_0 \left(\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3} \right)$ a kezdeti alkohol koncentráció. Az illesztett egyenlet konstansai adják a kinetikai paramétereket.

A kinetikai paraméterek meghatározásának másik lehetősége a Michaelis-Menten egyenletet linearizálása, így például Lineweaver-Burk, Hanes/Langmuir vagy az Eadie-Hofstee módszerrel a reakciósebesség – szubsztrát-koncentráció pontokra egyenesek illeszthetők, az illesztett egyenesek és a koordinátatengelyek metszéspontjaiból a kinetikai konstansok meghatározhatóak. A linearizált egyenletek a következők:

Lineweaver-Burk egyenlet:

$$r_{0norm} = \frac{1}{r_{max}} + \frac{K_m}{r_{max}} \cdot \frac{1}{S_0}$$

Hanes-Langmuir egyenlet:

$$\frac{S_0}{r_{0norm}} = \frac{K_m}{r_{max}} + \frac{S_0}{r_{max}}$$

Eadie-Hofstee egyenlet:

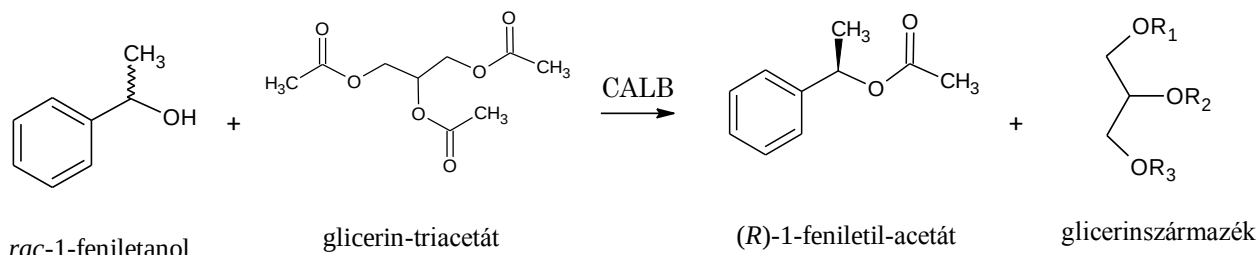
$$r_{0norm} = r_{max} - K_m \cdot \frac{r_{0norm}}{S_0}$$

ahol r_{0norm} a kezdeti, normált reakciósebesség $\left(\frac{mol}{dm^3 \cdot perc \cdot mg \text{ enzimkészítmény}}\right)$, r_{max} a maximális kezdeti reakciósebesség, S_0 a kiindulási szubsztrát-koncentráció $\left(\frac{mol}{dm^3}\right)$ és K_m a Michaelis-konstans $\left(\frac{mol}{dm^3}\right)$.

IV. Eredmények

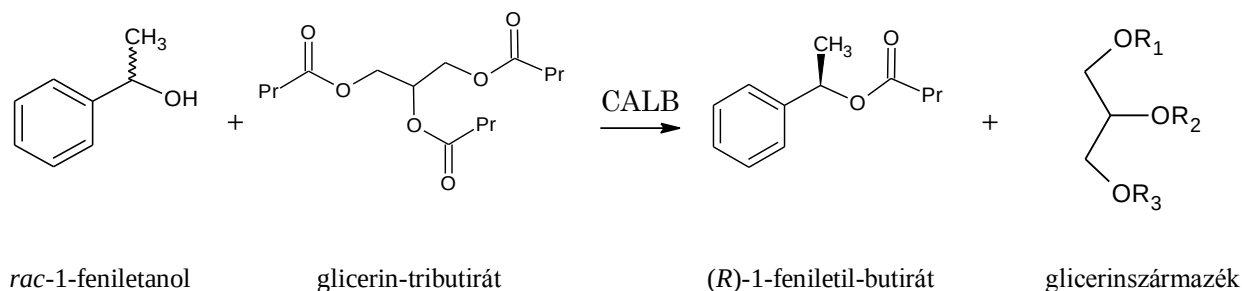
IV.1. A vizsgált reakciók

Munkám során a racém 1-feniletanol enzimkatalizált észterezési reakcióját vizsgáltam glicerín-triacetátot, glicerín-tributíratot, illetve szuperkritikus szén-dioxidos extrakcióval nyert természetes olajokat (kukoricacsíra olaj, tökmagolaj és szójaolaj) használva észterezőszerként. A glicerín-triacetáttal és glicerín-tributíráttal lejátszódó reakciókat a 12. és a 13. ábrák szemléltetik.



12. ábra: 1-feniletanol reakciója glicerín-triacetáttal

(R₁, R₂ és R₃ közül legalább az egyik hidrogén, a másik kettő lehet hidrogén vagy acetil csoport)



13. ábra: 1-feniletanol reakciója glicerín-tributiráttal

(R₁, R₂ és R₃ közül legalább az egyik hidrogén, a másik kettő lehet hidrogén vagy butiril csoport)

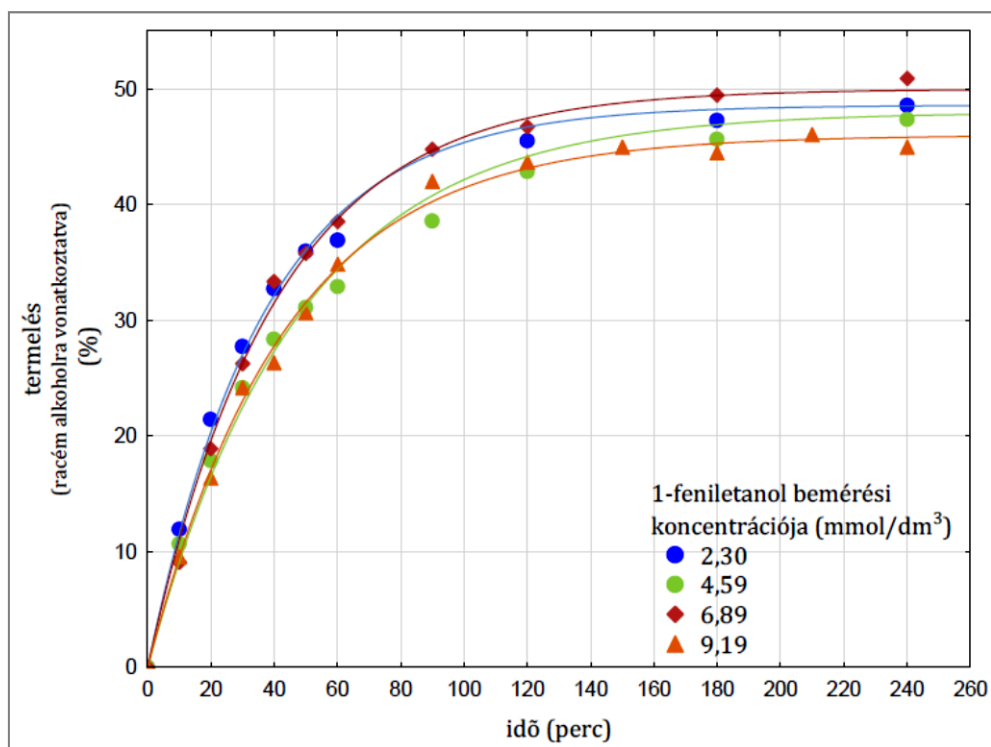
A reakciók során az alkohol enantiomereiből különböző sebességgel képződik az észter, miközben az triacetinből/trubutirinből di- és mono-glicerinszármazékok, illetve glicerín keletkezik. Mivel a mérési eredményeim szerint a két enantiomer reakciósebessége között jelentős a különbség (az (S)-észter nem mutatható ki az analizált reakcióelegy-minták kromatogramjairól), így a reakciók alkalmasak racém 1-feniletanol kinetikus rezolválására.

IV.2. Léggöri nyomáson végzett kísérletek

IV.2.1. Észterezőszerként triacetint használva

Az enzim viselkedését elsőként *n*-hexán oldószerben, léggöri nyomáson vizsgáltam. A glicerín-triacetátot nagy feleslegben alkalmaztam, így a reakciót limitáló egyetlen komponens az 1-feniletanol volt. A méréseket 40 °C hőmérsékleten végeztem, 4 különböző 1-feniletanol koncentráció ($2,3 \cdot 10^{-3}$ - $9,19 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³) mellett. A gázkromatográfiás analízissel az alkohol enantiomerei jól elválaszthatóak voltak egymástól, így a rezolvált alkohol

enantiomertisztasága meghatározható volt a reakcióelegyből vett mintákból. A gázkromatográfiás elemzés alapján elmondható, hogy a CALB enzim nagy szelektivitást mutatott az alkalmazott reakciókörülmények között. A termékek közül csak az (*R*)-acetát volt kimutatható a reakció-mintákból, így a kromatogramok zajosságát figyelembe véve 99,5%-nál nagyobb volt az enantimertisztaság a termékekre nézve. Az alkohol enantimertisztasága a termeléssel együtt fokozatosan nőtt a reakció előrehaladtával. Az (*R*)-alkoholra vonatkoztatott 90% feletti termelés mellett az enantimertisztaság 80-90% közötti értékeket ért el.



14. ábra: 4 különböző PE koncentrációnál 40 °C-on, n-hexánban végzett kísérletek termelés - idő pontjai és a pontokra illesztett görbék

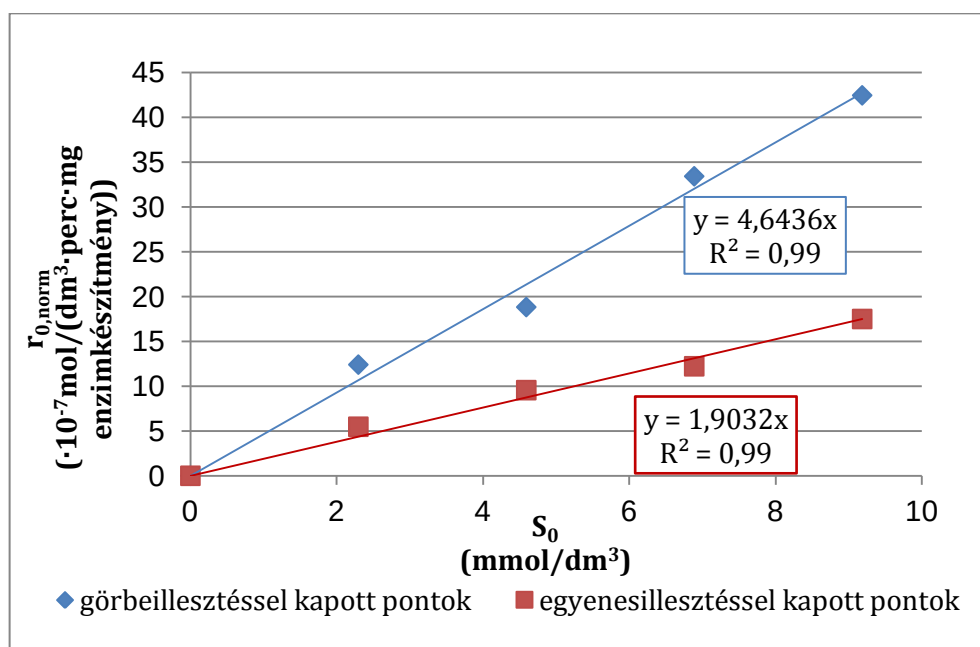
A 14. ábrán láthatóak a termelés-idő pontok (a termelés a teljes bemért alkoholmennyiségre számított érték) és a Statistica programmal a mérési pontokra illesztett görbék a négy különböző PE bemérés esetén. A *Számítási módszerek* fejezetben ismertetett módon a görbeillesztésekből meghatároztam a reakciósebességi állandókat (k), illetve a kezdeti reakciósebességeket ($r_{0,norm}$). Összehasonlításuképpen a kezdeti reakciósebességeket a termékkoncentráció – idő pontok alapján, az első-második mérési pontokhoz húzott egyenes meredekségéből is meghatároztam az előző fejezetben leírt módon.

Az *n*-hexán oldószerben, légköri nyomáson, 40 °C-on végzett kísérletek eredményeit az 1. táblázatban foglaltam össze.

Kísérlet kódja	S ₀ (mmol/dm ³)	Egyenesillesztéssel számolt	Görbeillesztéssel kalkulált		
		r _{0,norm} (·10 ⁻⁷ mol/(dm ³ ·perc·mg enzimkészítmény))	k (1/perc)	r ₀ (·10 ⁻⁵ mol/(dm ³ ·perc))	r _{0,norm} (·10 ⁻⁷ mol/(dm ³ ·perc·mg enzimkészítmény))
GTA1	2,30	5,47	0,0271	6,22	12,4
GTA2	4,59	9,55	0,0211	9,67	18,8
GTA3	6,89	12,2	0,0249	17,1	33,4
GTA4	9,19	17,5	0,0231	21,3	42,4

1. táblázat: *n*-Hexán oldószerben, légköri nyomáson végzett kísérletek kezdeti reakciósebességei kétféle módon meghatározva

A kapott kezdeti reakciósebességeket a kiindulási PE koncentráció függvényében ábrázoltam, a mérési pontok többnyire egy egyenesre illeszkedtek, azaz az alkalmazott szubsztrát-koncentrációk a Michaelis-Menten görbe lineáris szakaszát rajzolták ki. A pontok és a pontokra illesztett egyenes a 15. ábrán látható.



15. ábra: Egyenes- illetve görbeillesztéssel kapott reakciósebességek összehasonlítása

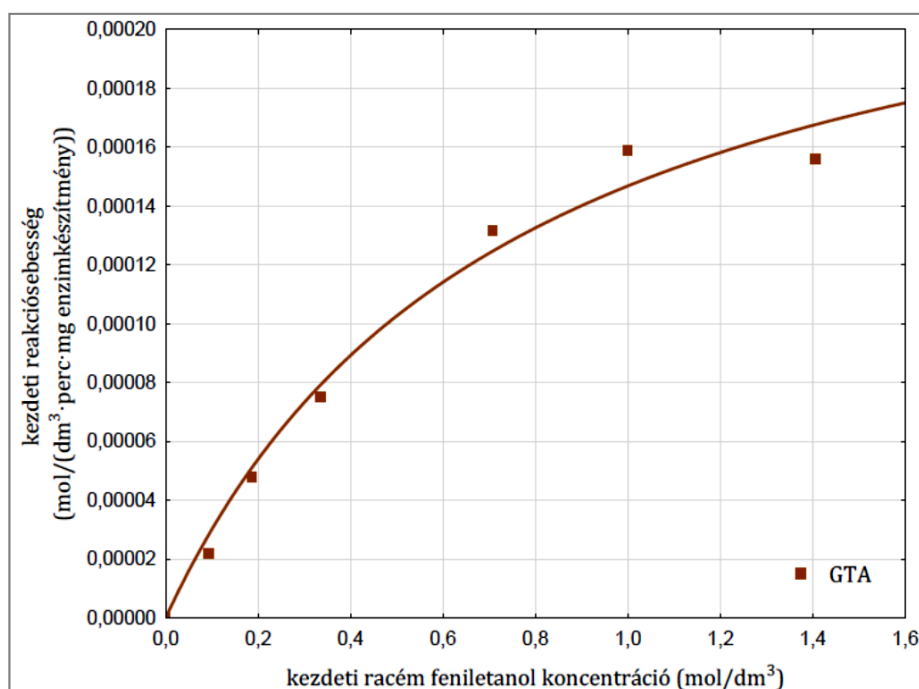
Az egyenes meredekségből számolt reakciósebességek és a görbeillesztéssel kapott reakciósebességek által meghatározott egyenesek meredeksége jelentősen eltérőnek bizonyult. Valószínűleg a termelés – idő pontokra történő görbeillesztések útján meghatározott kezdeti reakciósebességek alapesetben pontosabbak lehetnek a számolt értékeknél. Előbbi módszer hátránya ellenben, hogy a termelés – idő görbe egyes esetekben rosszul illeszthető. Ezt okozhatja a pontok nagymértékű szórása, vagy az, hogy a reakció nem ment teljesen végig, így nincs elég mérési pont az egyensúlyi szakaszban, mely megnöveli a görbeillesztés bizonytalanságát. TDK munkám során a további összehasonlításra a termékkoncentráció – idő görbe kezdeti, lineáris szakaszára illesztett egyenes meredekségből számolt kezdeti reakciósebesség értékeket alkalmaztam.

A feniletanol és a glicerín-triacetát is folyékony halmazállapotú, így a szerves oldószer elhagyásával, a triacetin oldószerként való felhasználásával is megfelelő volt a reakcióközeg a reakció lejátszódásához. A szerves oldószer hígító hatásának kiküszöbölésével az észterezési reakciót nagyobb kezdeti kiindulási koncentrációknál tudtam vizsgálni. A nagyobb alkohol-koncentráció következtében ellenben a reakciók végére elért konverzió kisebb volt, mint az *n*-hexánban lejátszódott reakciók során elért értékek. A kezdeti reakciósebességeket a termékkoncentráció - idő görbék első két pontjához illesztett egyenes meredekségéből számoltam, melynek eredményeit a 2. táblázatban foglaltam össze. A kapott kezdeti reakciósebesség – szubsztrátkoncentráció pontokra pedig a Michaelis-Menten egyenletet illesztettem.

Kísérlet kódja	S_0 (mol/dm ³)	r_0 ($\cdot 10^{-4}$ mol/(dm ³ ·perc))	$r_{0, \text{norm}}$ ($\cdot 10^{-5}$ mol/(dm ³ ·perc·mg enzimkészítmény))
GTA6	0,093	3,39	2,19
GTA7	0,186	5,07	4,78
GTA8	0,336	7,89	7,52
GTA9	0,707	13,8	13,2
GTA10	1,00	17,0	15,9
GTA11	1,41	16,2	15,6

2. táblázat: Számolt kezdeti reakciósebességek

Az előzőekben meghatározott kezdeti reakciósebesség – szubsztrát koncentráció pontokra a 16. ábrán látható Michaelis-Menten egyenletnek megfelelő függvényt illeszttem.

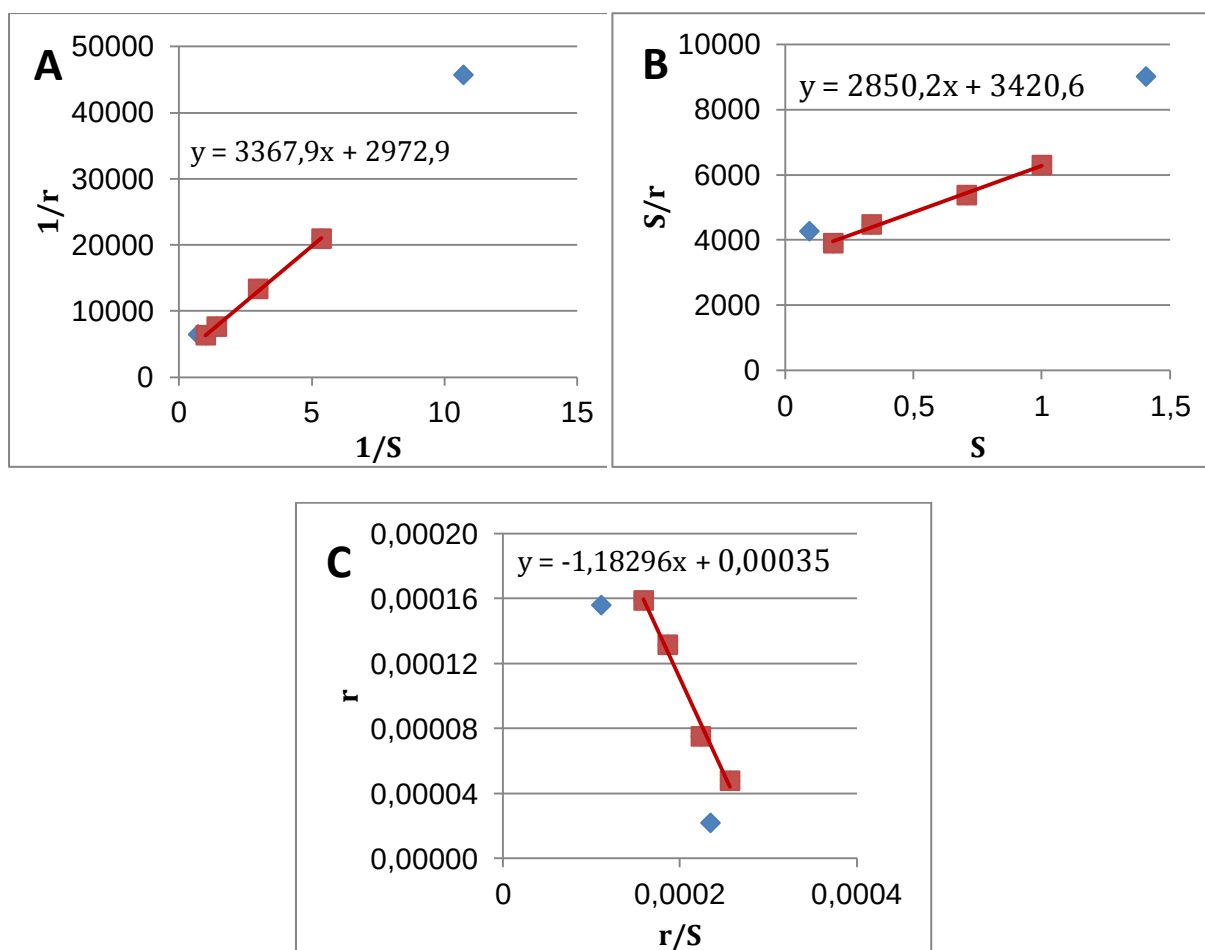


16. ábra: Kezdeti reakciósebesség - szubsztrátkoncentráció pontok és a pontokra illesztett görbe

A Michaelis-Menten egyenlet illesztésével meghatároztam a kinetikai paramétereket a légköri nyomáson, 40 °C-on, oldószermentesen végzett kísérletekre. A maximális kezdeti reakciósebességet és a Michaelis-konstans a következő értékeknek adódott:

$$r_{max} = 2,58 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \cdot \text{perc} \cdot \text{mg enzim}, K_m = 0,755 \text{ mol/dm}^3$$

Összehasonlításképpen a paramétereket a Michaelis-Menten egyenlet linearizálásával is meghatároztam. A linearizálás eredményei a 17. ábrán láthatóak. A linearizált egyenletek megfelelő illeszkedéséhez csak a valóban egy egyenesre eső pontokat használtam fel az illesztésekhez (az ábrákon a kékkel jelölt pontok az illesztésnél kihagyott értékek).



17. ábra: A Michaelis-Menten egyenlet linearizált formáinak illesztése a kezdeti sebesség – kezdeti koncentráció pontokra

(A: Lineweaver-Burk, B: Hanes-Langmuir, C: Eadie-Hofstee típusú)

A linearizálással, illetve görbeillesztéssel meghatározott paraméterek értékét a 3. táblázatban foglaltam össze. A különböző linearizálási módszerekkel nagyon hasonló értékeket kaptam a paraméterekre, de jelentősen eltérő az eredeti egyenlet illesztésével kapott konstansoktól. A linearizált egyenletek illesztésével valószínűleg pontatlanabb eredményeket kapunk, mint az eredeti egyenlet illesztésével. A Lineweaver-Burk típusú egyenlet erre a legszemléletesebb példa. Ez esetben a kezdeti szubsztrát-koncentráció reciprokának függvényében vesszük a kezdeti reakciósebesség reciprokát, így az eredetileg lineáris skálán

felvett kezdeti koncentráció értékek a reciprok skálán nem lesznek egyenletesek. Az egyenes illesztésnél legmeghatározóbb pontok éppen a kisebb koncentrációtartományba esnek, melyeknél legnagyobb a bemérési hibából adódó pontatlanság. A kis koncentrációk esetében bekövetkező minimális eltérés is az egyenes meredekségének és a tengelymetszetének szignifikáns eltérését okozhatja. Ezzel szemben az eredeti egyenlet illesztése esetén a bemérés hibája minimálisan befolyásolja csak a paraméterek becslését, ebből adódóan a görbeillesztéssel kapott paramétereket vettem alapnak és ezekhez hasonlítottam a linearizálás eredményeit.

Illesztés típusa	K_m	r_{max}
	(mol/dm ³)	($\cdot 10^{-4}$ mol/(dm ³ ·perc·mg enzimkészítmény))
<i>Lineweaver-Burk</i>	1,133	3,36
<i>Hanes-Langmuir</i>	1,200	3,51
<i>Eadie-Hofstee</i>	1,183	3,50
<i>Eredeti egyenlet</i>	0,755	2,58

3. táblázat: Glicerín-triacetát észterezőszerként tartalmazó reakciók esetén számolt kinetikai konstansok

Jelen esetben a linearizálással kapott értékek közel estek egymáshoz, de a jó illeszkedéshez az adatsor első és utolsó pontját el kellett hagynom, míg az eredeti egyenlet illesztésénél az összes mérési pontot felhasználtam. Ebből adódóan a további összehasonlításra a következő, az eredeti egyenlet illesztésével kapott konstansokat használtam fel: $K_m = 0,755 \text{ mol/dm}^3$; $r_{max} = 2,58 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \cdot \text{perc} \cdot \text{mg enzim}$

IV.2.2. Észterezőszerként tributirint használva

Hasonlóan a triacetinhez, a tributirin is folyékony halmazállapotú, így a tributirines reakciók esetén is elhagyhattam a szerves oldószert a reakcióelegyből. A glicerín-tributirátot nagy feleslegben alkalmazva a reakciót limitáló egyetlen komponens ebben az esetben is csak az 1-feniletanol volt. A reakciókat 40 °C-on végeztem, 8 különböző 1-feniletanol koncentrációnál: $8,3 \cdot 10^{-3}$ és $1,4 \text{ mol/dm}^3$ koncentráció tartományban. A gázkromatográfiás analízis alapján a lipáz enzim szelektív volt az (R)-alkoholra, a mintákban a keletkező terméknek általában csak az (R)-enantiomere volt kimutatható, az (S)-enantiomer nem jelent meg a kromatogramokon, vagy annyira kicsi volt a csúcsa, hogy mennyiségi meghatározásra nem volt alkalmas. A kromatogramok zajosságát figyelembe véve az enantiomertisztaság így 99,9%-nál nagyobb volt. A reakció során visszamaradó szubsztrát enantiomertisztasága a termeléssel fokozatosan nőtt, közel 100%-os termelés mellett az ee érték 99%-os értéket ért el a reakció végén.

A triacetines kísérleteknél alkalmazott módon a termék-koncentráció - idő pontok által meghatározott görbék első két pontjához illesztett egyenes meredekségéből határoztam meg a

kezdeti reakciósebességet, majd a kapott értékeket normáltam a bemért enzimmennyiség tömegével. A tributirines mérések eredményeit a 4. táblázat tartalmazza.

Kísérlet kódja	S_0 (mol/dm ³)	$r_{0,norm}$ ($\cdot 10^{-6}$ mol/(dm ³ ·perc· mg enzimmennyiség))
GTB1	0,008	6,29
GTB2	0,041	62,6
GTB3	0,082	91,2
GTB4	0,162	95,7
GTB5	0,318	111
GTB6	0,612	393
GTB7	0,951	425
GTB8	1,378	524

4. táblázat: Glicerín-tributirátos kísérletek kezdeti reakciósebességei

A kezdeti reakciósebességet a kiindulási alkoholkoncentráció függvényében ábrázoltam, majd az eredeti Michaelis-Menten egyenletet, illetve a linearizált egyenleteket is illesztettem a pontokra. Ebben az esetben is az eredeti egyenlet illesztésével kapott értékeket tekintettem referenciának, többek között azért is, mivel a linearizált egyenletek rosszul illeszkedtek a mérési pontokra. Az 5. táblázatban összefoglaltam az összes felhasznált illesztés-típussal kapott paraméter-értéket.

Illesztés típusa	K_m (mol/dm ³)	r_{max} ($\cdot 10^{-4}$ mol/(dm ³ ·perc·mg enzimmennyiség))
<i>Lineweaver-Burk</i>	3,03	16
<i>Hanes-Langmuir</i>	0,477	6,8
<i>Eadie-Hofstee</i>	0,413	6,0
<i>Eredeti-egyenlet illesztése</i>	0,792	8,2

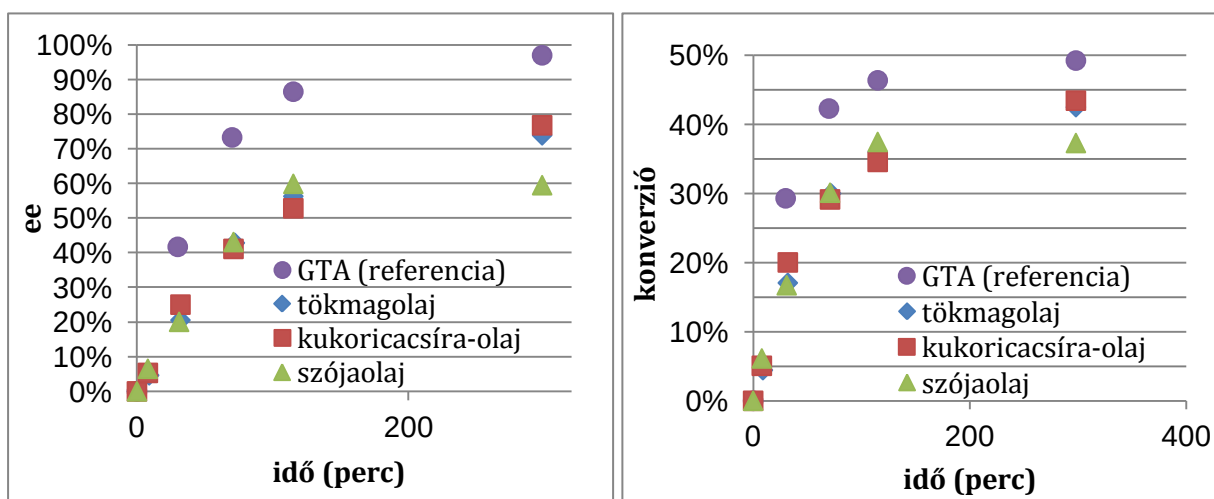
5. táblázat: Egyenletillesztésekkel kapott kinetikai paraméterek a tributirines kísérletekre

Az 5. táblázatból látható, hogy a különböző illesztésekkel kapott paraméter-értékek erőteljes szórást mutatnak, mely az illesztések bizonytalanságából adódhat. Míg a Hanes-Langmuir és az Eadie-Hofstee egyenlet illesztése hasonló értékeket adott, addig a legkiugróbb értékeket a Lineweaver-Burk egyenlet illesztésével kaptam. A további összehasonlításhoz a mérési pontokra legjobban illeszkedő egyenletekből (Hanes-Langmuir, Eadie-Hofstee és a Michaelis-Menten egyenlet) számolt paraméterek átlagát vettem alapul:

$$K_m = 0,561 \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}; r_{max} = 7,01 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3 \cdot \text{perc} \cdot \text{mg enzim}}.$$

IV.2.3. Észterezőszerként természetes olajat alkalmazva

A kinetikus resolválás mind triacetinnel, mind a hosszabb szénatomszámú zsírsav-részt tartalmazó glicerín-észterrel nagy enantiomerszelektivitással (99% feletti értékkel) és magas hozammal volt kivitelezhető. Ebből adódóan hosszabb szénláncú, természetes eredetű észterezőszerekkel is próbát tettem. A kutatócsoport által szuperkritikus szén-dioxiddal extrahált olajokkal teszteltem az 1-feniletanol kinetikus resolválását. Alapként az előző kísérleteknél alkalmazott körülményeket vettem: légköri nyomás, 40 °C, szerves oldószert nem tartalmazó reakcióelegy, mivel az alkalmazott olajok is folyékony halmazállapotúak. Mivel az olajok ez esetben is amellet, hogy az észterezési reakció észter-donorjául szolgáltak, egyben a reakció oldószerei is voltak, azaz elég nagy feleslegben voltak ahhoz jelen, hogy a reakciót limitáló komponens csak az 1-feniletanol legyen. A tesztreakcióhoz 1 ml olajat (tökmag, kukoricacsíra és szójaolajat vizsgáltam), 20 µl racém 1-feniletanolt és 20 mg lipáz enzimet mértem össze. A tesztreakciókhoz referenciaként az előbb leírt reakcióelegyet állítottam össze, de a természetes olajat glicerín-triacetáttal helyettesítettem. Az olajok többféle zsírsavat is tartalmaznak, ám ezek gázkromatográfiás analízisnél szennyezik a kolonnát, ezért metanollal extraháltam a reakcióelegy-mintákból az alkohol enatiomereket, illetve valószínűleg termék-észtereket is, melyek csúcsai a reakció előrehaladtával folyamatosan nőttek, de minőségileg nem tudtam azonosítani őket. Ezen csúcsok azonosításához az olajok pontos zsírsav-összetételének ismeretére és a zsírsav-észterek standard-jeire lett volna szükségem. Az analízis alapján a szubsztrát enantiomertisztasága nőtt a konverzióval, bár mind a konverzió, mind az *ee* érték kicsit elmaradt a referenciaként használt triacetines reakciónál mért értékektől. Az alkohol csúcsterületeiből számolt *ee* értékeket, illetve konverziót (racém alkoholra számolva) a reakcióidő függvényében ábrázoltam, mely a 18. ábrán látható.



18. ábra: Enantiomerfelesleg és termelés időbeli alakulása a három típusú olajjal végzett kísérlet esetén, melyekhez referenciaként triacetines mérést végeztem

A tesztkísérletek alapján 6 különböző PE koncentrációnál (0,063 és 2,15 mol/dm³ koncentrációk között) végeztem kísérleteket légköri nyomáson kukoricacsíra-olajjal. A triacetines és tributirines kísérleteknél leírt módon számoltam a kezdeti reakciósebességeket. A kísérletek eredményeit a 6. táblázatban foglaltam össze.

Kísérlet kódja	S_0 (mol/dm ³)	$r_{0,norm}$ ($\cdot 10^{-5}$ mol/(dm ³ ·perc·mg enzimkészítmény))
KUK1	0,063	1,84
KUK2	0,177	4,16
KUK3	0,350	6,28
KUK4	0,694	9,99
KUK5	1,360	12,6
KUK6	2,150	15,1

6. táblázat: A kukoricacsíra-olajjal végzett kísérletek során kapott reakciósebesség értékek

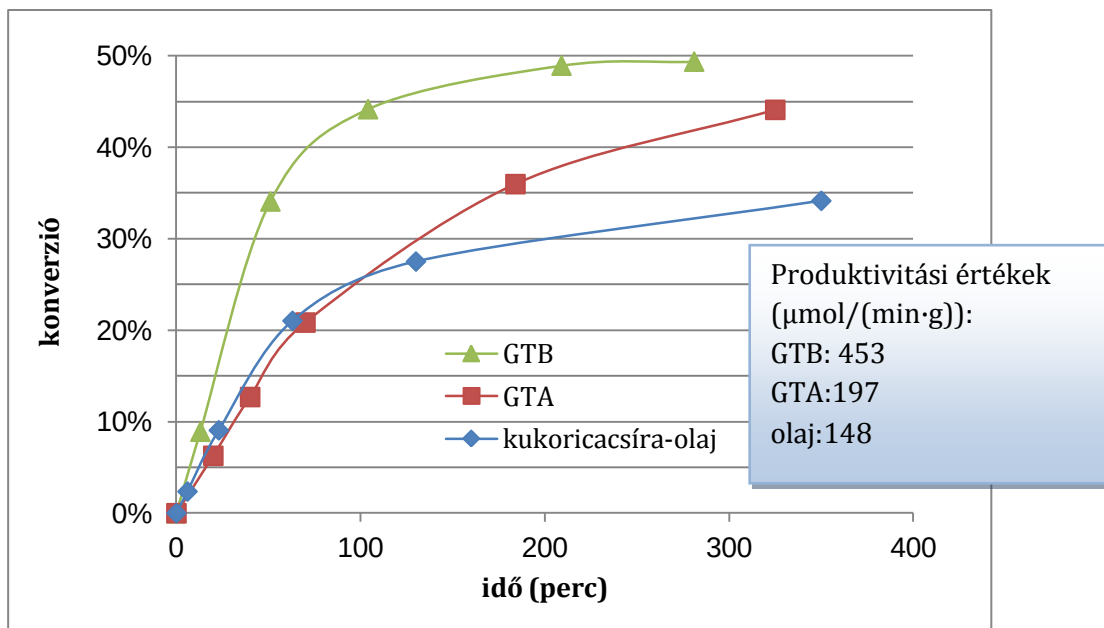
A kezdeti reakciósebesség - kezdeti alkohol-koncentráció pontpárookra Statistica szoftverrel illesztettem a Michaelis-Menten egyenletet, illetve összehasonlításképpen a linearizált egyenleteket is ráillesztettem a mérési pontokra. A mérési pontokra mind az eredeti, mind a linearizált egyenletek jól illeszkedtek (R^2 meghaladta a 0,99 értéket). A számolt kinetikai paraméterek nagyon hasonló értékeket adtak, a leginkább eltérő értékeket a Lineweaver-Burk egyenlet illesztésével kaptam, így az átlag-számításnál nem vettem figyelembe. A kinetikai paramétereket, illetve a számolt átlagértéket a 7. táblázat tartalmazza.

Illesztés típusa	K_m (mol/dm ³)	r_{max} ($\cdot 10^{-4}$ mol/(dm ³ ·perc·mg enzimkészítmény))
<i>Lineweaver-Burk</i>	0,515	1,7
<i>Hanes-Langmuir</i>	0,666	1,9
<i>Eadie-Hofstee</i>	0,595	2,0
<i>Eredeti egyenlet illesztése</i>	0,707	2,0
Átlag	0,656	2,0
Szórás	0,056	$2,83 \cdot 10^{-6}$
Szórás százalékosan	9%	1%

7. táblázat: Kukoricacsíra-olajos mérések kinetikai paraméterei

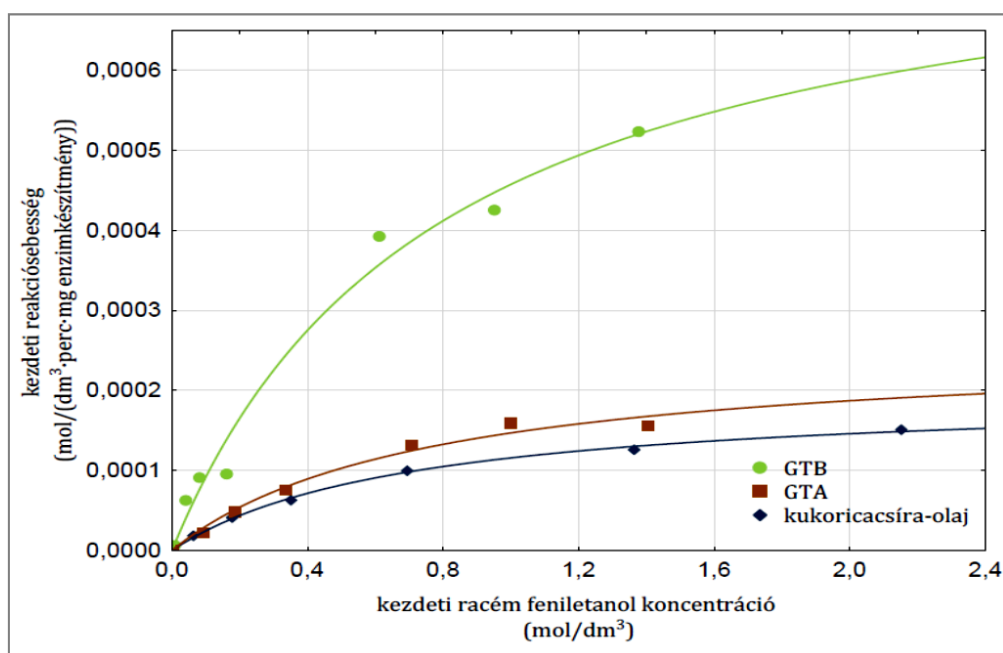
IV.2.4. Az észterezőszerk összehasonlítása

A légköri nyomáson végzett kísérletekhez háromféle észterterezőszert vizsgáltam részletesen: glicerín-triacetátot, glicerín-tributíratot és kukoricacsíra-olajat. Mindhárom esetben lehetőség nyílt arra, hogy a reakcióelegyből a szerves oldószert (*n*-hexánt) elhagyjam, így nagy feleslegben alkalmazva az észterező ágenszt, a reakciót limitáló komponens csak az alkohol volt. Ezek a feltételek lehetővé tették, hogy a reakció vizsgálatához elsőrendű, egyirányú kinetikát alkalmazzak. A három esetben a különbség a reakciósebességben volt mérhető, a legnagyobb kezdeti reakciósebességet tributirin esetén lehetett elérni, míg a legkisebbet a természetes olajok esetén azonosan beállított reakciókörülmények mellett. A 19. ábrán azonos kiindulási feniletanol koncentrációjú reakciók konverzió - idő pontjait ábrázoltam a három észterező ágens esetén, melyen jól látható, hogy a leggyorsabban a tributirinnel játszódtott le a reakció.



19. ábra: 40 μl PE bemérésnél elért termelés értékek időbeli alakulása 40 °C-on, légköri nyomáson végzett reakciók esetén
(a vonalak csak a jobb áttekinthetőséget szolgálják, nem illesztett függvények)

A 20. ábrán a kezdeti reakciósebesség - kezdeti alkohol koncentráció pontokra illesztett görbék láthatók. Az eredmények alapján (8. táblázat) megállapítható, hogy a racém alkohol kinetikus resolválása tributirinnel végzett észterezés esetén a leggyorsabb, illetve a maximális reakciósebesség eléréséhez kisebb szubsztrát-koncentráció is elegendő, mint a másik két észterező ágens esetén. Ezzel szemben az is látható, hogy a természetes olajjal történő kinetikus resolválás megközelíti a triacetinnel elért eredményeket.



20. ábra: Kinetikai görbék alakulása a kinetikus resolváláshoz alkalmazott észterezőszerrek függvényében

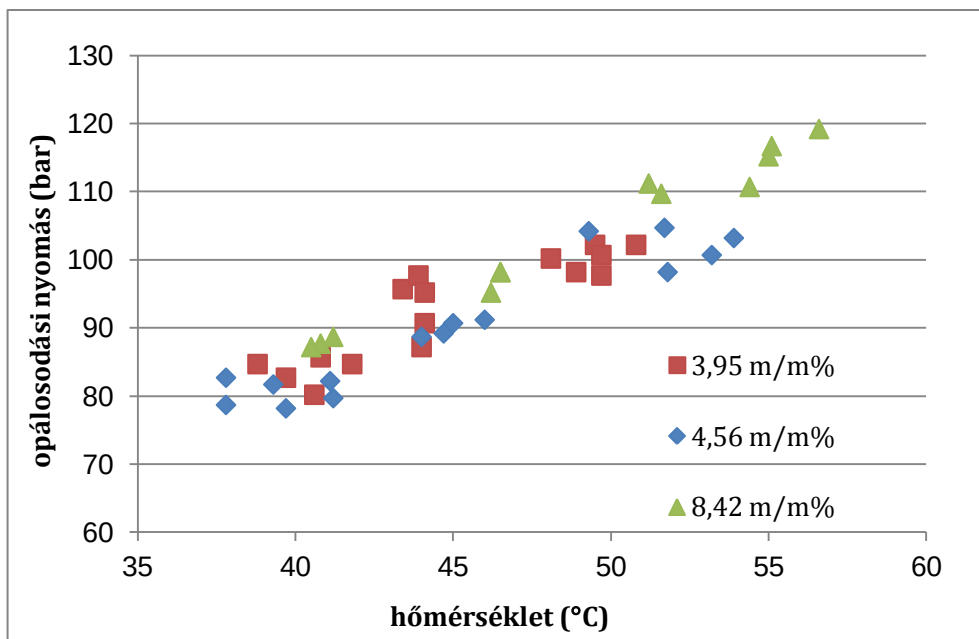
Alkalmazott észterező ágens	K_m (mol/dm ³)	r_{max} ($\cdot 10^{-4}$ mol/(dm ³ ·perc·mg enzimkészítmény))
Glicerín-tributirát	0,561	7,01
Glicerín-triacetát	0,750	2,56
Kukoricacsíra-olaj	0,656	1,97

8. táblázat: Kinetikai paraméterek az alkalmazott észterezőszerk függvényében

Az eredményekből úgy tűnik, hogy az észterezőszer szénláncának hossza befolyásolja a kinetikus reszolválás eredményeit, illetve az alkalmazott észterező ágens szénlánc hosszának lehet egy optima, amely alkalmazása esetén a legjobb reszolválási eredmények érhetők el. Emellett azt sem szabad elfelejteni, hogy egy természetes olaj a trigliceridek mellett számos egyéb komponenst is tartalmaz, ami befolyásolhatja a reakciót, akár inhibíciót okozva.

IV.3. Opálosodási pont mérése

A szén-dioxid oldószerben végzett kísérletek előtt vizsgáltam a felhasznált vegyületek oldhatóságát annak érdekében, hogy megbecsülhessem a nagy nyomású kísérletek esetén a reakcióelegyben kialakult fázisok számát. Az 1-feniletanol oldhatóságáról az irodalomban rendelkezésre állnak adatok, így a nagy nyomású reakcióknál észterezőszerként használt glicerín-triacetát szén-dioxidban való oldhatóságát vizsgáltam. Az opálosodási pontokat 40 °C-ról kiindulva 55 °C-ig mértem 3 különböző triacetin koncentráció esetén: 3,95; 4,56 és 8,42 m/m%. Ezeket a koncentráció-értékeket azért választottam, mivel a nagy nyomású kísérletek során az alkalmazni kívánt triacetin koncentrációja a reaktorban ebbe a koncentráció-tartományba esett. A pontos koncentrációt a bemért glicerín-triacetát és a cellába töltött szén-dioxid tömegéből számoltam ki. A szén-dioxid tömegét a cellába töltött szén-dioxid térfogatából, illetve a sűrűségéből számítottam. A szén-dioxid sűrűségét a mért hőmérséklet, illetve nyomás alapján határoztam meg a National Institute of Standards and Technology Chemistry Webbook internetes adatbázis alapján. Az opálosodási pontokat a 21. ábrán látható hőmérséklet-nyomás diagramon ábrázoltam.



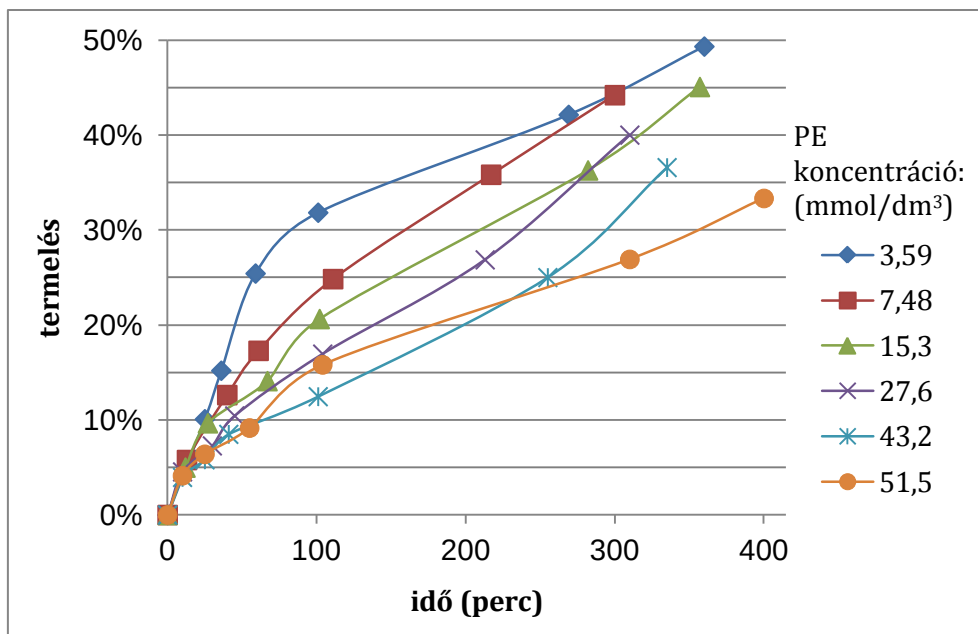
21. ábra: Mért opálosodási nyomások a hőmérséklet függvényében 3 különböző glicerintriacetát koncentrációnál

A mért opálosodási pontok a koncentrációtól függetlenül közel egy egyenesre estek, azaz a mérési tartományban a koncentrációtól függetlenül, adott hőmérséklethez közel ugyanaz az opálosodási nyomás tartozik. Az egyes hőmérsékleteken mért opálosodási nyomások nagymértékű szórása abból adódhat, hogy nehezen lehetett mérni azt a hőmérséklet - nyomás értéket, amikor az addig homogén elegy opállossá vált, de még nem vált szét két fázisra. Jellemzően az egyes értékek mérésénél a nyomás fokozatos csökkentésével először a még homogén, de az olajos anyagtól kissé zavarosnak tűnő közeg elkezdett homályosodni, de az egyértelműen opálos jelleg elérése előtt az elegy két fázissá vált szét, mely egyben a nyomás hirtelen lecsökkenését is maga után vonta. Az opálosodási nyomás nehéz megállapíthatósága miatt adott hőmérsékleten több mérést is végeztem, hogy minél inkább megközelítsem a valós opálosodási nyomást az egyes hőmérsékleteken.

Összességében a mérésekből megállapítható, hogy a nagy nyomású kísérletek esetén, 40 °C hőmérsékleten a vizsgált koncentráció tartományban 100 bar nyomás elegendő ahhoz, hogy a reakcióelegy egy fázist alkosson a reaktorban.

IV.4. Nagy nyomású kísérletek, szuperkritikus szén-dioxid oldószerben

Az opálosodási pont mérések alapján a reakciókat 40°C hőmérsékleten, 100 bar nyomáson végeztem, 20 mg enzim beméréssel, rögzített triacetin koncentráció (1550 µl bemérés, mely a szén-dioxidban a reakció körülményei között 6,47 m/m% koncentrációnak felel meg) és változó 1-feniletanol bemérés ($3,59 \cdot 10^{-3}$ és $5,15 \cdot 10^{-2}$ mol/dm³ között változtatva a PE koncentrációját) mellett. Ilyen bemérések esetén a reakcióelegy valószínűleg egy fázist alkothattott a reaktorban. A nagy nyomású kísérletek termelés értékeinek időbeli alakulása a 22. ábrán látható.



22. ábra: Termelés (racém alkoholra) időbeli alakulása 10 MPa nyomáson és 40 °C-on, szuperkritikus szén-dioxidban végzett kísérletek esetén
(a vonalak csak a jobb áttekinthetőséget szolgálják, nem illesztett függvények)

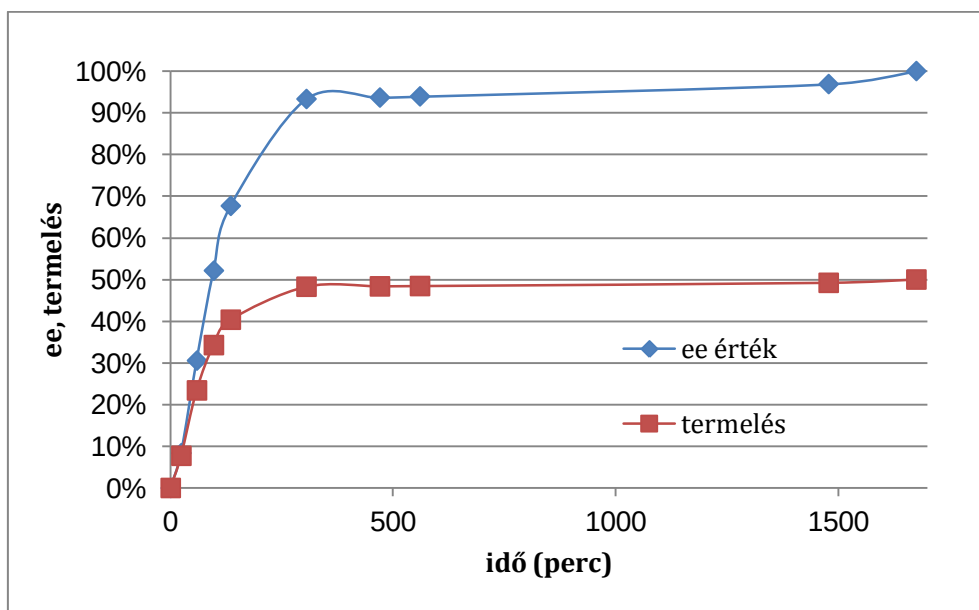
Az ábrán megfigyelhető, hogy a legkisebb bemérési PE koncentrációjú kísérletnél sem állt be az egyensúly 300 perc reakcióidőt követően, bár az utolsó termelés érték már megközelítette az 50 %-ot, valószínűleg hosszabb reakcióidővel az egyensúly elérhető lett volna. Ezek a reakciók bizonyítják, hogy szuperkritikus szén-dioxidban lehetséges az 1-feniletanol kinetikus reszolválása magas hozam elérése mellett. A termelés-pontok által meghatározott görbék a légköri nyomáson végzett kísérletekhez hasonlóan alakultak, így a szuperkritikus szén-dioxidban végzett reakciók kiértékelését, a reakciósebességek meghatározását az atmoszférikus reakcióknál tárgyalt módon végeztem. A nagy nyomású kísérletek eredményeit a 9. táblázatban foglaltam össze.

Kísérlet kódja	S_0 (mmol/dm ³)	$r_{0,norm}$ ($\cdot 10^{-6} \text{mol}/(\text{dm}^3 \cdot \text{perc} \cdot \text{mg enzimkészítmény})$)
GTA_HP1	3,59	0,686
GTA_HP2	7,48	1,64
GTA_HP3	15,3	2,97
GTA_HP4	27,6	5,45
GTA_HP5	43,2	8,63
GTA_HP6	51,5	10,9

9. táblázat: 100 bar nyomáson, szén-dioxid oldószerben végzett kísérlet eredményei

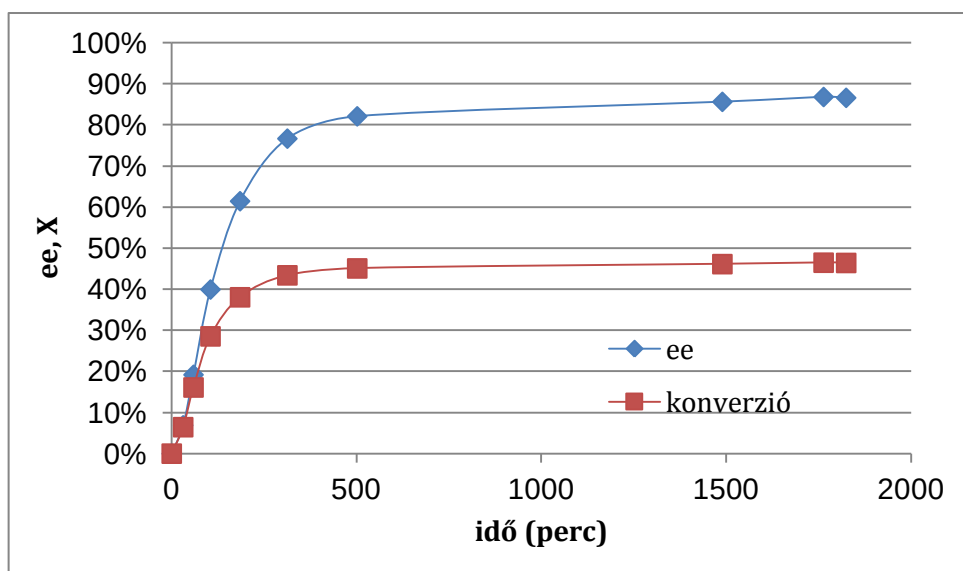
A nagynyomású reakciók során vett minták alapján az enzim szelektivitása a légköri nyomáson végzett reakciókhoz képest nem változott kimutatható mértékben: az (S)-alkoholból nem képződött észter-termék, vagy csak olyan kis mennyiségben, melyet gázkromatográfiás elemzéssel nem lehetett kimutatni, így a kromatogramok zajosságát

figyelembe véve az enantimertisztaság 99,5% feletti értéket ért el. A szubsztrát enantimertisztasága folyamatosan nőtt a reakció előrehaladtával: 45%-ot meghaladó termelés (racém alkoholra megadva) mellett az *ee* érték a 90% feletti értékeket ért el. Annak érdekében, hogy megbizonyosodjak arról, hogy megfelelően megválasztott reakcióidő mellett elérhető az egyensúly és megközelíthető az 50%-os racém alkoholra vonatkoztatott termelés mellett a legalább 99% enantimertisztaság a szubsztrátra nézve; 28 óra reakcióidejű, 30 μ l PE beméréssel végzett nagy nyomású reakciót végeztem. A 23. ábrán a reakció során a termelés és az *ee* érték időbeli alakulását ábrázoltam.



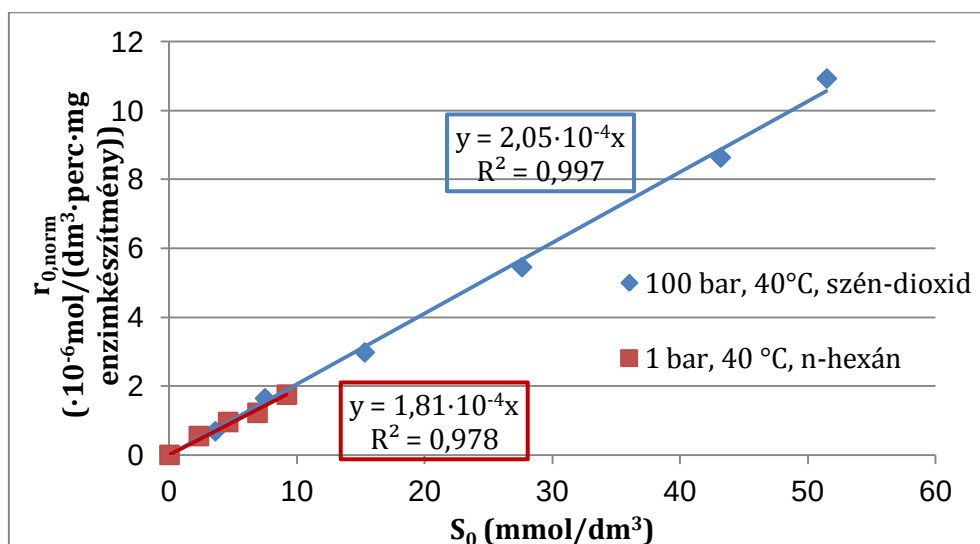
23. ábra: 28 óra reakcióidejű, 40 °C-on, 100 bar nyomáson, scCO₂-ban végzett reakció *ee* értékének és termelésének (racém alkoholra megadva) időbeli alakulása

Látható, hogy a termelés és az *ee* érték az 500. perc környékére megközelítette az 50 és a 100%-ot, itt állhatott be az egyensúly, míg az utolsó mintában gázkromatográfiás elemzéssel már nem volt kimutatható az (*R*)-alkohol. Azonos reakciókörülmények között, azonos PE bemérés mellett megismételtem a reakciót kukoricacsíra-olaj észterezőszerrel is. Az alkohol *ee* értékének és a konverzió (racém alkoholra vonatkoztatott) az időbeli alakulása a 24. ábrán látható. Az enantiomerfelesleg, illetve a konverzió értékei egymással párhuzamosan folyamatosan növekednek, mely arra utal, hogy a kívánt észterezési reakció mellett nem játszódik le egyéb mellékreakció. A triacetines reakcióhoz képest viszont az egyensúly alacsonyabb enantiomerfelesleg (87%), illetve konverzió értékhez (47%) áll be. Ennek oka lehet például a termékinhibíció, melynek vizsgálatához a keletkező termékek pontos ismeretére lenne szükség.



24. ábra: 40°C-on, 100 bar nyomáson, scCO₂-ban, kukoricacsíra-olaj észterezőszerrel végzett reakció ee értékének és konverziójának (racém alkoholra megadva) időbeli alakulása

A triacetines eredmények alapján összehasonlítást végeztem az atmoszférikus körülmények között *n*-hexán oldószerben és a szuperkritikus szén-dioxidban végzett reakciók között. A nagy nyomású reakciók kezdeti reakciósebességeit a kiindulási alkohol koncentrációjának függvényében ábrázoltam. A pontok egy egyenesre estek, melynek meredekségét egyenes-illesztéssel határoztam meg és összehasonlítottam a légköri nyomáson, szerves oldószerben végzett kísérletek esetén illesztett egyenessel (25. ábra).



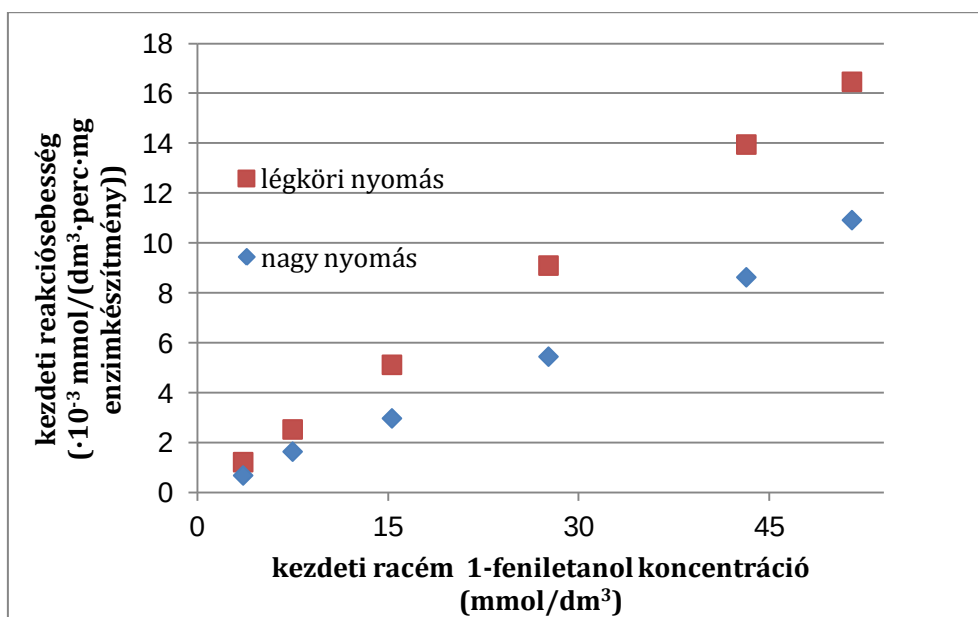
25. ábra: Légköri nyomáson és nagy nyomáson végzett reakciók esetén meghatározott kezdeti reakciósebességek

A légköri nyomáson és a szuperkritikus szén-dioxidban végzett kísérletek közel egy egyenesre estek, az egyenesek meredeksége közötti kisebb eltérés valószínűleg a mérési pontatlanságból adódhat. A légköri nyomáson, oldószerben végzett reakciók kinetikája tehát jelentős mértékű egyezést mutatott a nyomás alatt végzett kísérletekével.

A reakciósebességek összehasonlítását a légköri nyomáson, oldószermentesen végzett, illetve a nagynyomású reakciók között is elvégeztem. Hat különböző alkohol-koncentrációnál végzett nagy nyomású kísérlet kezdeti reakciósebességét a triacetines, oldószermentes méréseknél meghatározott Michaelis-Menten egyenletből azonos alkohol koncentrációkra számolt reakciósebességgel hasonlítottam össze. A légköri nyomáson végzett kísérletek alapján a kezdeti reakciósebesség a következő egyenlet szerint függ a kiindulási alkohol koncentrációtól:

$$r_{0norm} = r_{max} \cdot \frac{S_0}{K_m + S_0} = 2,58 \cdot 10^{-4} \frac{mol}{dm^3 \cdot perc \cdot mg \text{ enzim}} \cdot \frac{S_0}{0,755 \frac{mol}{dm^3} + S_0}$$

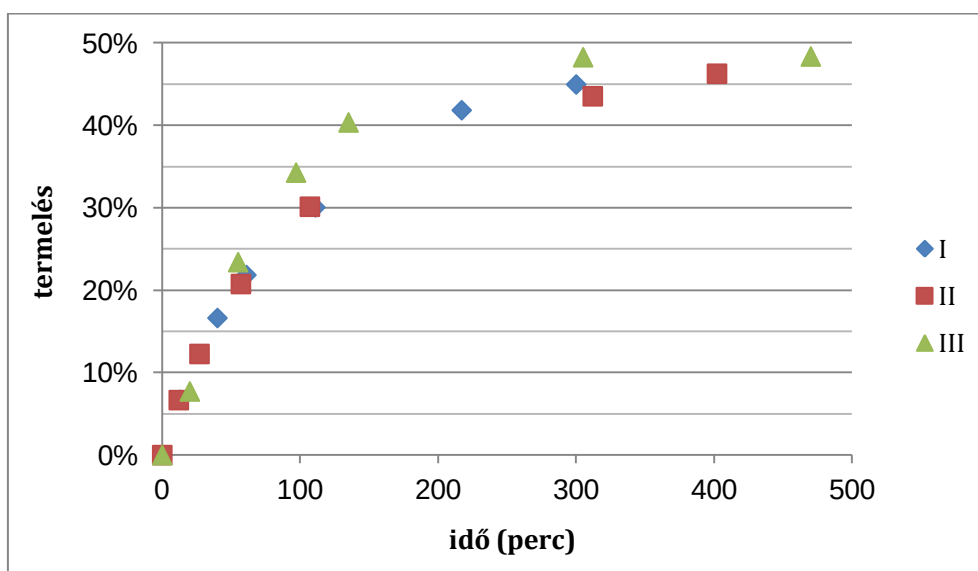
A nagy nyomású kísérletek és a Michaelis-Menten egyenlettel atmoszférikus körülményekre meghatározott kezdeti reakciósebesség értékeket a 26. ábrán ábrázoltam. Az oldószermentes kísérletek kezdeti reakciósebességeire körülbelül 1,6-szor nagyobb reakciósebességet kaptam, mint a szén-dioxidban végzett kísérletek esetén ugyanakkora PE bemérési koncentráció mellett. Ez azt jelenti, hogy légköri nyomáson, oldószermentes közegben ugyanakkora bemérési szubsztrát-koncentráció mellett kicsit több, mint másfélszer gyorsabban játszódik le az észterezési reakció, mint 100 bar nyomás alatt. Ez a másfélszeres szorzó természetesen nem pontos érték, mivel a kezdeti reakciósebesség meghatározásának és a Michaelis-Menten egyenlet illesztésének is van bizonytalansága.



26. ábra: Légköri és nagynyomáson végzett reakciók kezdeti reakciósebességeinek összehasonlítása

IV.4.1. Nagy nyomáson végzett kísérletek ismételhetőségének vizsgálata

Annak érdekében, hogy a reakciók ismételhetőségét, illetve a számítások bizonytalanságát meghatározzam egy adott reakció-beállításnál három ismétlést végeztem. 1550 μl glicerín-triacetát és 30 μl racém 1-feniletanol bemérés mellett azonos hőmérsékleten és nyomáson végeztem az ismétléseket. A reakciók menetét az alábbi termelés - idő diagram (27. ábra) ábrázolja, melyen az látszódik, hogy közel hasonló volt a reakciók menete, a kisebb eltéréseket a reakciókörülmények ingadozása, a bemérési pontatlanság és az elemzési bizonytalanság okozhatja. Az ismételhetőség számszerűsítéséhez az egyes reakciók esetén számoltam a kezdeti reakciósebességet, a produktivitást, a 300. perc környékére elért termékkoncentrációt és az E-értéket. Az eredményeket a 10. táblázatban foglaltam össze. A számolt értékek szórása 2-6%, ami azt jelenti, hogy a kísérleti körülmények ingadozásából származó és az elemzési hibák okozta eltéréseken kívül a kísérletek ismételhetősége rendkívül jó, mely a reakció és a rendszer stabilitását is jellemzi.



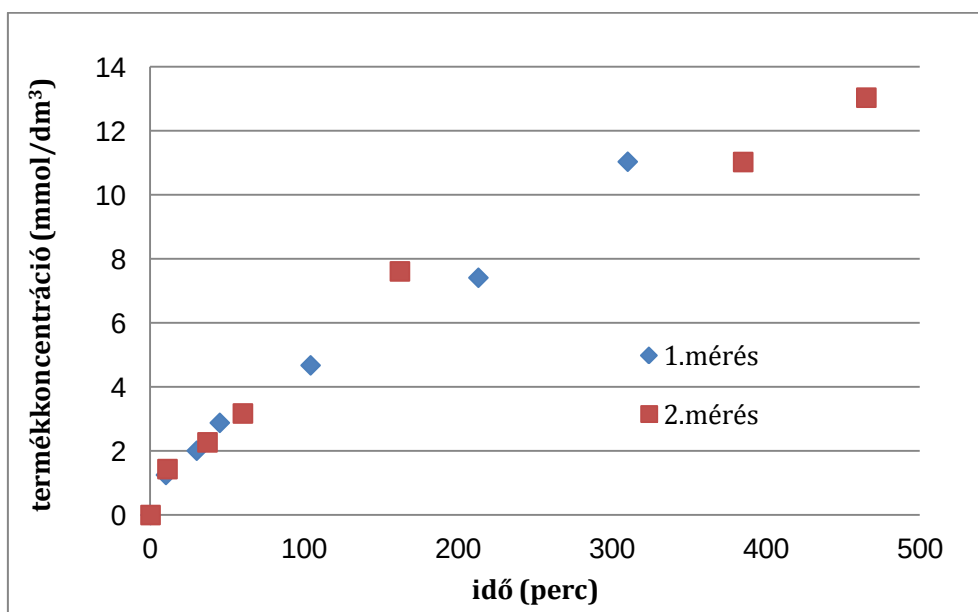
27. ábra: Ismételt nagy nyomású kísérletek termelési értékeinek időbeli alakulása (I, II és III az ismétlés sorszámát jelöli)

Ismétlés száma	E-érték (-)	termékkoncentráció ($\cdot 10^{-3} \text{mol/dm}^3$) (300. perc körül)	kezdeti reakciósebesség ($\cdot 10^{-6} \text{mol}/(\text{dm}^3 \cdot \text{perc} \cdot \text{mg enzimekszítmény))$	produktivitás ($\mu\text{mol}/(\text{perc} \cdot \text{g enzimekszítmény))$
I.	2164	6,73	2,08	77,2
II.	2436	6,53	2,09	78,1
III.	2392	6,88	2,02	71,8
Szórás	6%	3%	2%	4%

10. táblázat: Ismételhetőség vizsgálatához számolt értékek és azok szórása egymáshoz képest

IV.4.2. Enzimaktivitás csökkenésének vizsgálata

A nagynyomású reakciókhoz használt enzimmel újabb kísérletet végeztem annak megállapítására, hogy a szén-dioxidban végzett reakció hatására hogyan változott az enzimaktivitás. Az aktivitásváltozás vizsgálatához az adott kísérlethez felhasznált enzimet a reakciót követően izopropanollal és *n*-hexánnal mostam át, majd azonos bemérési és reakciókörülmények között újra felhasználtam. A két mérés termékkoncentráció - idő pontjai a 28. ábrán láthatók.



28. ábra: A termékkoncentráció időbeli alakulása az enzimmészítmény első és második felhasználása során

A második mérésnél a produktivitás értéke csökkent az első méréshez képest, míg a kezdeti reakciósebesség közel azonos (11. táblázat). A csökkent aktivitást okozhatja részleges hődenaturálódás, az izopropanolos és *n*-hexános mosás vagy a nagynyomású reakciót követő nyomáscsökkentés fehérjeszerkezet-romboló hatása. Az aktivitás csökkenés ellenben nem túl nagymértékű, azaz lehetőség van az enzim újrahasznosítására a nagynyomású reakciókat követően, mely gyakorlatilag is megoldható: az enzimet nyomásmentesítés után tisztán eltávolíthatjuk a reaktorból, az esetleges vegyszermaradványoktól pufferoldatos mosással, majd szárítással tisztíthatjuk meg.

Kísérlet	Produktivitás ($\mu\text{mol}/(\text{perc}\cdot\text{g})$)	Kezdeti reakciósebesség ($\cdot 10^{-6}\text{mol}/(\text{dm}^3\cdot\text{perc}\cdot\text{mg}$ enzimmészítmény))
1. mérés	413	5,45
2. mérés	369	5,39

11. táblázat: Összehasonlítás az enzim első és második felhasználása esetén
(látszólag az értékek ellentmondanak az ábrának, de érdemes figyelembe venni, hogy a felhasznált enzimmészítmény tömegek nem pontosan egyeznek meg)

V. Összefoglalás

Munkám során 1-feniletanol enzimkatalizált (immobilizált *Candida antractica* lipáz B enzim) kinetikus reszolválását vizsgáltam többféle észterező ágens alkalmazása mellett atmoszférikus körülmények között, valamint nagy nyomáson, szuperkritikus állapotú széndioxidban.

Az atmoszférikus körülmények között vizsgált észterező ágensek a glicerín-triacetát, a glicerín-tributirát, valamint szuperkritikus széndioxidos extrakcióval kinyert természetes olajok (kukoricacsíra-olaj, tökmagolaj és szójaolaj) voltak. Abból adódóan, hogy a reaktánsok a reakció hőmérsékletén folyékony halmazállapotúak, lehetőségem nyílt a reakcióelegyből elhagyni a szerves oldószert. A karbonsav-rész szénatomszáma befolyásolhatja a reakciót, így egyik célom az észterező ágensek összehasonlítása volt az enantiomerelválasztás eredményessége és a reakciók kinetikája alapján. Az oldószermentes reakciókban a glicerín-triacetátot, a glicerín-tributirátot és szuperkritikus széndioxidos extrakcióval kinyert természetes olajat nagy feleslegben alkalmaztam, ebből adódóan a reakciók során az egyetlen limitáló komponens a szekunder alkohol volt, így az észterezési reakciók kinetikai paramétereinek leírására a Michaelis-Menten modellt alkalmaztam. Az enantiomer-elválasztás eredményessége tekintetében a különböző észterezőszerek hatékonynak bizonyultak, egyes esetekben a 99%-os konverzió ((*R*)-alkoholra vonatkoztatott) mellett a 99%-ot megközelítő enantiomerfelesleget értem el. Ebből adódóan az észterező ágensek összehasonlítását a Michaelis-Menten kinetikai modell paramétereinek alapján végeztem el. Az összehasonlítás alapján a tributirinnal végzett reakciók maximális reakciósebessége 3,5-szer nagyobbnak bizonyult, mint a kukoricacsíra-olaj esetén. Ezzel szemben a triacetines reakciók maximális reakciósebessége mindössze 1,3-szor volt nagyobb, mint a kukoricacsíra-olaj esetén. Ezen eredmények alapján egyértelmű, hogy az észterező ágens karbonsav-része erőteljesen befolyásolja a kinetikus reszolválás hatékonyságát. Emellett az eredmények igazolták, hogy a jelentősen nagyobb szénatomszámú zsírsavészterek keverékét tartalmazó olajok is alkalmasak lehetnek 1-feniletanol reszolválására, mely lehetőséget adhat szintetikus reagensek helyett természetes olajok alkalmazásával történő enantiomertiszta szekunder alkoholok előállítására.

Az észterezőszerek mellett vizsgáltam a reakciót szuperkritikus széndioxidban megvalósítva. A szuperkritikus széndioxidban végzett reakciókhoz észterezőszerként triacetint és kukoricacsíra-olajat használtam, a reakciókat 100 bar nyomáson 40 °C hőmérsékleten végeztem. A triacetin észterezőszerrel végzett kísérlet esetén 24 óra reakcióidőt követően 100%-ot megközelítő (*R*)-alkoholra megadott termelés mellett 99,5% feletti enantiomertisztaság volt elérhető. A triacetines reakciók mellett kísérletet tettem az észterezésnek a kukoricacsíra-olajjal, szuperkritikus széndioxidban történő megvalósítására. Ebben az esetben azonos reakciókörülmények között alacsonyabb értékeknél állt be az egyensúly: 87% enantiomerfelesleg és 93% (*R*)-alkoholra vonatkoztatott konverzió.

A triacetin észterezőszerrel végzett kísérletek esetében az enantiomertisztaságban a léghőmérséklet illetve a nyomás alatti reakciókban nem volt különbség, így a reakciósebességeket hasonlítottam össze. A léghőmérséklet nyomáson, oldószermentes körülmények között vizsgált kísérletek reakciósebességei másfélszer nagyobbak bizonyultak, mint a nyomás alattiak. A különbség ellenben nem túl nagy, így esetleg a nyomás és a hőmérséklet megfelelő beállításával jobb eredményeket is elérhetünk majd, mint atmoszférikus reakciók esetén, valamint kapcsolt reakció és termékválasztási műveletek is kialakíthatóak.

Szuperkritikus szén-dioxid alkalmazása esetén az ismételt reakciók produktivitásának és kezdeti reakciósebességének szórása 10% alatt maradt. A reakciók jó ismételhetősége a rezolválási reakció és egyben az egész rendszer megbízhatóságát is jellemzi. A szuperkritikus szén-dioxidban, triacetinnel végzett kísérletek esetén enzimaktivitás visszamérést is végeztem: a produktivitás 413 $\mu\text{mol/perc}\cdot\text{g}$ értékről 369 $\mu\text{mol/perc}\cdot\text{g}$ értékre csökkent. Az enzim aktivitásának ilyen kismértékű csökkenése arra is lehetőséget ad, hogy az enzimműködést többször is felhasználjuk, bár hosszabb távon a folyamatos reaktorok alkalmazása a célszerűbb, amellyel elkerülhető az enzimműködés nyomásmentesítése.

Az eddigi eredményekre alapozva terveim között szerepel a szuperkritikus szén-dioxidban végzett kísérletek paramétereinek optimalizálása, valamint a természetes olajokkal végzett kinetikus rezolválás további vizsgálata, kiemelt figyelemmel a termékválasztás lehetőségeire.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Székely Editnek a kísérleti munka, illetve a dolgozat megírása folyamán nyújtott iránymutatást és segítséget, valamint Kmecz Ildikónak, a kísérleti eredmények kiértékelésénél és a dolgozat megírása során nyújtott szakmai segítségét.

Köszönet illeti a laborban dolgozó munkatársaimat, elsősorban Bánsághi Györgyöt, Kőrösi Mártont és Péter-Szabó Barbarát a készülékek használatához nyújtott segítségért, illetve Szécsényi Ágneszt az eredmények értékeléséhez adott hasznos tanácsaiért.

Irodalomjegyzék

- [1] L. Poppe, *Sztereoselektív szintézisek*. Typotex Kiadó, 2011.
- [2] B. Testa, "Chiral aspects of drug metabolism," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 7, pp. 60–64, Jan. 1986.
- [3] E. J. Ariëns, E. W. Wuis, and E. J. Veringa, "Stereoselectivity of bioactive xenobiotics," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 37, no. 1, pp. 9–18, Jan. 1988.
- [4] R. Siedlecka, "Recent developments in optical resolution," *Tetrahedron*, vol. 69, no. 31, pp. 6331–6363, Aug. 2013.
- [5] S. Kotha, "Opportunities in asymmetric synthesis: An industrial prospect," *Tetrahedron*, vol. 50, no. 12, pp. 3639–3662, Mar. 1994.
- [6] J. Crosby, "Synthesis of optically active compounds: A large scale perspective," *Tetrahedron*, vol. 47, no. 27, pp. 4789–4846, Jan. 1991.
- [7] H. Lorenz, A. Perlberg, D. Sapoundjiev, M. P. Elsner, and A. Seidel-Morgenstern, "Crystallization of enantiomers," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 45, no. 10, pp. 863–873, Oct. 2006.
- [8] S. H. Sih, C. J.; Wu, "Resolution of enantiomers via biocatalysis," in *Topics in Stereochemistry*, 1989, pp. 63–100.
- [9] E. Fogassy, M. Nógrádi, D. Kozma, G. Egri, E. Pálovics, and V. Kiss, "Optical resolution methods," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 4, no. 16, pp. 3011–30, Aug. 2006.
- [10] H. Pellissier, "Catalytic non-enzymatic kinetic resolution," *Adv. Synth. Catal.*, vol. 353, no. 10, pp. 1613–1666, Jul. 2011.
- [11] A. Ghanem and H. Y. Aboul-Enein, "Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents," *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 15, no. 21, pp. 3331–3351, Nov. 2004.
- [12] F. Toda, Ed., *Enantiomer Separation*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004.
- [13] M. T. El Gihani and J. M. Williams, "Dynamic kinetic resolution," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 11–15, Feb. 1999.
- [14] N. J. Turner, "Enzyme catalysed deracemisation and dynamic kinetic resolution reactions," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 2, pp. 114–9, Apr. 2004.
- [15] B. Sevilla, *Biomérnöki műveletek és folyamatok*. Typotex Kiadó, 2011.
- [16] A. Ghanem, "Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds," *Tetrahedron*, vol. 63, no. 8, pp. 1721–1754, Feb. 2007.
- [17] Ž. Knez, "Enzymatic reactions in dense gases," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 47, no. 3, pp. 357–372, Jan. 2009.
- [18] V. Ádám, *Orvosi Biokémia*. Medicina Kiadó, 2006.

- [19] S. Divakar, *Enzymatic Transformation*. India: Springer India, 2013.
- [20] K.-E. Jaeger and T. Eggert, "Lipases for biotechnology," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 13, no. 4, pp. 390–397, Aug. 2002.
- [21] M. Habulin and Ž. Knez, "Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 58, no. 1–4, pp. 24–28, Jun. 2009.
- [22] Y.-C. Cheng and S.-W. Tsai, "Carica papaya lipase: An effective biocatalyst for esterification resolution of (R,S)-2-(chlorophenoxy)propionic acid," *Biochem. Eng. J.*, vol. 35, no. 3, pp. 318–324, Aug. 2007.
- [23] A. A. Dos Santos, C. E. Da Costa, J. L. Princival, and J. V. Comasseto, "Lipase-catalyzed kinetic resolution of (R,S)-hydroxy tellurides," *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 17, no. 15, pp. 2252–2259, Sep. 2006.
- [24] C. Pilissão, P. de O. Carvalho, and M. da G. Nascimento, "Enantioselective acylation of (R,S)-phenylethylamine catalysed by lipases," *Process Biochem.*, vol. 44, no. 12, pp. 1352–1357, Dec. 2009.
- [25] C. E. Costa, G. C. Clososki, H. B. Barchesi, S. P. Zanotto, M. G. Nascimento, and J. V. Comasseto, "Enzymatic resolution of (R,S)- β -hydroxy selenides in organic media," *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 15, no. 24, pp. 3945–3954, Dec. 2004.
- [26] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, and R. Fernandez-Lafuente, "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, no. 6, pp. 1451–1463, May 2007.
- [27] R. Chênevert, N. Pelchat, and P. Morin, "Lipase-mediated enantioselective acylation of alcohols with functionalized vinyl esters: acyl donor tolerance and applications," *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 20, no. 10, pp. 1191–1196, Jun. 2009.
- [28] T. Dumont, D. Barth, C. Corbier, G. Branlant, and M. Perrut, "Enzymatic reaction kinetic: comparison in an organic solvent and in supercritical carbon dioxide," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 40, no. 2, pp. 329–33, Jun. 1992.
- [29] E. Cséfalvay, A. Deák, T. Farkas, L. Hanák, L. T. Mika, P. Mizsey, J. Sawinsky, B. Simándi, T. Szánya, E. Székely, *Vegyipari műveletek II. Anyagátadó műveletek és kémiai reaktorok*, Typotex Kiadó, 2011.
- [30] K. Rezaei, F. Temelli, and E. Jenab, "Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids," *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, no. 3, pp. 272–80, Jan. 2007.
- [31] K. Nakamura, "Biochemical reactions in supercritical fluids," *Trends Biotechnol.*, vol. 8, pp. 288–292, 1990.
- [32] C. Erkey, "Fundamental Aspects of Supercritical Fluids," *Supercrit. fluids Organomet. Compd.*, pp. 11–19, 2011.
- [33] S. Mayadevi, "Reactions in supercritical carbon dioxide," *Indian J. Chem.*, vol. 51A, pp. 1298–1305, 2012.

- [34] M. Utczás, "Enzimkatalizált resolválás szuperkritikus szén-dioxidban", Ph.D értekezés, 2012.
- [35] A. M. Klibanov, "Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents," *Acc. Chem. Res.*, vol. 23, no. 4, pp. 114–120, Apr. 1990.
- [36] J. S. Dordick, "Non-aqueous enzymology," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 2, no. 3, pp. 401–407, Jun. 1991.
- [37] T. W. Randolph, H. W. Blanch, J. M. Prausnitz, and C. R. Wilke, "Enzymatic catalysis in a supercritical fluid," *Biotechnol. Lett.*, vol. 7, no. 5, pp. 325–328, May 1985.
- [38] D. A. Hammond, M. Karel, A. M. Klibanov, and V. J. Krukonis, "Enzymatic reactions in supercritical gases," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 11, no. 5, pp. 393–400, Oct. 1985.
- [39] T. Matsuda, K. Watanabe, T. Harada, and K. Nakamura, "Enzymatic reactions in supercritical CO₂: carboxylation, asymmetric reduction and esterification," *Catal. Today*, vol. 96, no. 3, pp. 103–111, Oct. 2004.
- [40] E. J. Beckman, "Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 28, no. 2–3, pp. 121–191, Mar. 2004.
- [41] A. J. R. A.J. Mesiano, E.J. Beckman, "Supercritical biocatalysis," *Chem. Rev.*, vol. 99, 1999.
- [42] E. Cernia, C. Palocci, F. Gasparrini, D. Misiti, and N. Fagnano, "Enantioselectivity and reactivity of immobilized lipase in supercritical carbon dioxide," *J. Mol. Catal.*, vol. 89, no. 1–2, pp. L11–L18, Apr. 1994.
- [43] N. R. T. Helen R. Hobbs, "Biocatalysis in supercritical fluids, in fluoruous solvents, and under solvent-free conditions," *Chem. Rev.*, vol. 107, pp. 2786–2820, 2007.
- [44] M. Paljevac, Z. Knez, and M. Habulin, "Lipase-catalyzed transesterification of (R,S)-1-phenylethanol in SC CO₂ and in SC CO₂/Ionic Liquid Systems," *Acta Chim. Slov.*, vol. 56, no. 4, pp. 815–825.
- [45] T. Matsuda, R. Kanamaru, K. Watanabe, T. Harada, and K. Nakamura, "Control on enantioselectivity with pressure for lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide," *Tetrahedron Lett.*, vol. 42, no. 47, pp. 8319–8321, Nov. 2001.
- [46] T. Matsuda, R. Kanamaru, K. Watanabe, T. Kamitanaka, T. Harada, and K. Nakamura, "Control of enantioselectivity of lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide by tuning the pressure and temperature," *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 14, no. 14, pp. 2087–2091, 2003.
- [47] P. J. Halling, "What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media?," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 359, no. 1448, pp. 1287–96; discussion 1296–7, 1323–8, Aug. 2004.
- [48] Y. Fan, Z. Xie, H. Zhang, and J. Qian, "Kinetic resolution of both 1-phenylethanol enantiomers produced by hydrolysis of 1-phenylethyl acetate with *Candida antarctica* lipase B in different solvent systems," *Kinet. Catal.*, vol. 52, no. 5, pp. 686–690, Sep. 2011.

- [49] K. Frings, M. Koch, and W. Hartmeier, "Kinetic resolution of 1-phenyl ethanol with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 25, no. 3–5, pp. 303–309, Aug. 1999.
- [50] A. Paiva, P. Vidinha, M. Angelova, S. Rebocho, S. Barreiros, and G. Brunner, "Biocatalytic separation of (R,S)-1-phenylethanol enantiomers and fractionation of reaction products with supercritical carbon dioxide," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 55, no. 3, pp. 963–970, Jan. 2011.
- [51] H. Zhou, J. Chen, L. Ye, H. Lin, and Y. Yuan, "Enhanced performance of lipase-catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols in monoether-functionalized ionic liquids," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 10, pp. 5562–6, May 2011.
- [52] R. Irimescu, T. Saito, and K. Kato, "Enzymatic kinetic resolution of secondary alcohols by esterification with FA under vacuum," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 80, no. 7, pp. 659–663, Jul. 2003.
- [53] A. Overmeyer, S. Schrader-Lippelt, V. Kasche, and G. Brunner, "Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40 °C to 160 °C in supercritical CO₂," *Biotechnol. Lett.*, vol. 21, no. 1, pp. 65–69, Jan. 1999.
- [54] T. B.-S. Chua, Lee Suan, Cheng Kian-Kai, Lee Chew-Tin, Mohamad-Roji Sarmidi, Ramlan Abdul-Aziz, "Kinetic and reactor modelling of lipases catalyzed (R,S)-1-phenylethanol resolution," *Iran. J. Energy Environ. 1*, vol. 3, pp. 234–245, 2010.
- [55] L. S. Chua and M. R. Sarmidi, "Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 28, no. 2–3, pp. 111–119, May 2004.
- [56] L. S. Chua and M. R. Sarmidi, "Effect of solvent and initial water content on (R,S)-1-phenylethanol resolution," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 38, no. 3–4, pp. 551–556, Feb. 2006.
- [57] C. Dlugy and A. Wolfson, "Lipase catalyse glycerolysis for kinetic resolution of racemates," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 30, no. 5, pp. 327–330, Sep. 2007.
- [58] W. Lokotsch, K. Fritsche, and C. Syltatk, "Resolution of (D,L)-menthol by interesterification with triacetin using the free and immobilized lipase of *Candida cylindracea*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, no. 5–6, pp. 467–472, Oct. 1989.
- [59] P. A. Claon and C. C. Akoh, "Lipase-catalyzed synthesis of terpene esters by transesterification in n-hexane," *Biotechnol. Lett.*, vol. 16, no. 3, pp. 235–240, Mar. 1994.
- [60] P. A. Claon and C. C. Akoh, "Lipase-catalyzed synthesis of primary terpenyl acetates by transesterification: study of reaction parameters," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 42, no. 10, pp. 2349–2352, Oct. 1994.
- [61] J. L. Perez, A. Pulido, F. Pantozzi, and R. Martin, "Butyrate esterase (4-methylumbelliferyl butyrate) spot test, a simple method for immediate identification of *Moraxella* (Branhamella) catarrhalis [corrected]," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 28, no. 10, pp. 2347–2348, Oct. 1990.
- [62] K. Bagi, "Rögzített sertés hasnyálmirigy lipáz előállítás, jellemzése és alkalmazása," Ph.D értekezés, 2006.

- [63] J. Urban, F. Svec, and J. M. J. Fréchet, "A monolithic lipase reactor for biodiesel production by transesterification of triacylglycerides into fatty acid methyl esters.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 2, pp. 371–80, Feb. 2012.
- [64] A. Paiva, K. Gerasimov, and G. Brunner, "Phase equilibria of the ternary system vinyl acetate/(R,S)-1-phenylethanol/carbon dioxide at high pressure conditions," *Fluid Phase Equilib.*, vol. 267, no. 2, pp. 104–112, May 2008.
- [65] T. Gamse and R. Marr, "Phase equilibrium properties of the 1-phenylethanol–carbon dioxide and 2-octanol–carbon dioxide binary systems at 303.15 K, 313.15 K, and 323.15 K," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 46, no. 1, pp. 117–119, Jan. 2001.
- [66] C. Csajági, G. Szatzker, E. Rita Tőke, L. Üрге, F. Darvas, and L. Poppe, "Enantiomer selective acylation of racemic alcohols by lipases in continuous-flow bioreactors," *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 19, no. 2, pp. 237–246, Feb. 2008.
- [67] A. Tomin, G. Hornyánszky, K. Kupai, Z. Dorkó, L. Üрге, F. Darvas, and L. Poppe, "Lipase-catalyzed kinetic resolution of 2-methylene-substituted cycloalkanols in batch and continuous-flow modes," *Process Biochem.*, vol. 45, no. 6, pp. 859–865, Jun. 2010.