

# Előszó a Pannon Egyetem, Műszaki Informatikai Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet tevékenységét szemléltető cikksorozathoz

A Műszaki Kémiai Kutató Intézetet, amelyet 1960-ban a Magyar Tudományos Akadémia veszprémi székhellyel alapított, 1997-ig az Akadémia intézményhálózatának nemzetközileg is jól ismert kutatóintézeteként működött. Az akadémiai kutatóhálózat átszervezése következtében 1998-ban csatlakozott a Pannon Agrártudományi Egyetemhez, a 2000. január 1-jével megalakult önálló Kaposvári Egyetem jogelődjéhez. Az Intézet 2004. január 1-jétől a Pannon Egyetemhez (akkor Veszprémi Egyetem), az egyetem Műszaki Informatikai Karához csatlakozott. Munkáját ez utóbbi intézmény szervezeti keretein belül, önállóan, a Kar tudományos céljaival összehangolva, azt kiegészítve, folytatja. Különösen szoros együttműködésben tevékenykedik a Kar Nanotechnológia Tanszékével a funkcionális nanorészecskék, fehérjék és biokatalitikus reakciók kutatásában. A költségvetési támogatás változásával összhangban csökkent az Intézet létszáma, jelenleg a doktoráns hallgatókkal együtt az Intézetben dolgozó tudományos kutatók száma 28, amelyből 4 fő akadémiai doktor.

A műszaki kémia a művellet- és folyamattan, az eljárás- és berendezéstechnika, a kémiai technológiák megvalósításának tudománya. Az Intézet a vegyipar, a biotechnológiai ipar, az élelmiszer- és gyógyszeripar, a környezetvédelem, bioenergetika és az agrárium technológiáinak kutatását és fejlesztését szolgálja. Az Intézet küldetése a fenti tudományterületeket integráló műszaki kémia hatékony művelése a hazai, valamint a nemzetközi tudomány és technológia fejlődése érdekében. Az Intézet a jelenlegi technológiai trendekkel összhangban, elsősorban új tudományterületeken folytat kutatási tevékenységét. Fontos kutatási cél új, környezetbarát műveletek, gyakorlati eljárások kifejlesztése a membrántechnika, a biokémiai eljárások, az ionos folyadékok alkalmazásával. Vizsgálják a (bio)nanorészecskék előállítását, tulajdonságaikat, azok biokatalizátorként és szelektív elválasztó rétegeként való alkalmazási lehetőségeit, valamint a fehérjék előállítását és a biomassza energetikai és ipari hasznosítását. Az Intézetben művelt fő kutatási témakörök:

## 1. Műszaki biotechnológiai kutatások

- Genetikailag módosított mikrobák tenyésztése;
- Szilárd fázisú biokatalizátorok kialakítása nanorészecskék alkalmazásával;
- Biomassza hasznosítás, fehérje kinyerés, fehérje termelés, biokémiai reakciók hatékonyságának javítása;
  - Kemikáliák biokémiai előállítása;
  - Enzimkatalitikus reakciók kutatása nem konvencionális közegben;
  - Membránszeparációs eljárások (ultra- és nanoszűrés, elektro-dialízis, pervaporáció);
  - Optikailag aktív komponensek membrántechnikai elválasztása, reszolválás;

## 2. Szilárd részecsketechnológiai kutatások

- Kristályosítási műveletek és eljárások (kolloidkémiai és nanoszerkezeti kutatások);
- Részecskebevonási műveletek és eljárások;
- Funkciós csoportok, makromolekulák rögzítése nanorészecskékre, nanokompozitok, nanoszerkezetű részecskék előállítása;

## 3. Környezetbarát kémiai műveletek kutatása;

- Új tulajdonságú környezetkímélő anyagok (ionos oldószerek, környezetkímélő adalékanyagok) és szintézismódszerek kutatása;
- Környezetbarát eljárás-technikai kutatások (anyag - átalakítások mikrohullámú energiaközléssel)
- Környezetvédelmi analitikai kutatások.

Az Intézet a kutatási témák bővítése, eredményességének javítása céljából együttműködik, - elsősorban a nanokompozitok, speciális membránrétegek előállítása, a biokémiai reakciók, biokatalizátorok kutatása területén - az MTA kutatóintézeteivel, így az Anyag- és Környezetkémiai Intézettel, a Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézettel, az Enzimológiai Intézettel, egyetemekkel, mint Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, a Szegedi Tudományegyetem, valamint a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány szegedi Biotechnológiai Intézetével. Számos közös kutatást folytat, kétoldali szerződések keretében, külföldi kutatóhelyekkel is.

Az Intézet jelentős részt vállal a Gazdasági Versenyképesség Operatív Programban (GVOP), amelynek a keretében hét kutatási pályázat kidolgozásában vesz részt. Közös kutatási és fejlesztési témákban, szoros kapcsolatokat ápol a vállalatokkal, így többek között, MOL Rt- vel, a gyógyszergyárakkal (EGIS, RICHTER GEDEON, SANOFI-AVENTIS, TEVA) és más cégekkel. Az ipari kapcsolatok további erősítése, bővítése az Intézet elsőrangú célja és alapvető érdeke. Mindegyik kutatási területén törekszik az iparban hasznosítható eredmények elérésére. Az intézetben kidolgozott eljárások alapján utóbbi két évben öt szabadalmi bejelentés történt.

A következőkben hét közleménnyel mutatjuk be az Intézet legújabb eredményeit; Az itt bemutatott közlemények [Bacsik-Gyivicsán-Mink: Gázok FTIR spektrometriai analízisének fejlesztése és alkalmazásai, Gubicza: Enzimkatalitikus reakciók ionos folyadékban; Hadik-Nagy-Szabóné: Optikailag aktív komponensek elválasztása: membrán eljárás, mint alternatív technika; Nagy: Anizotrop membránon keresztüli, kémiai reakcióval kísért diffúziós és konvekciós anyagáram; Sisak: Szilárd-fázisú biokatalizátorok kialakítása és jellemzése glükóz oxidáció élelmiszeripari célú alkalmazásának előkészítése céljából; Vass-Pallai: Új, energiatakarékos, mikrohullámú technológia rövid főzési

idejű rizs előállítására;\* Tóth-Pallai : Mikroszemcsés bovin szérum albumin előállítása kéméletes szárítással] és az MKL-ben a közelmúltban publikált dolgozatok [Bélafi-Bakó: Membrán bioreaktorok, MKL, (2005), Gyenis-Szépvölgyi-Tóth.: Funkcionális kompozit-részecskék, MKL, (2006), Bélafi Bakó: Legújabb membrántechnikák és alkalmazásuk, MKL, (2006), Bélafi Bakó és mtrsi.: Ivóvíz előállítása membrán műveletek alkalmazásával, MKL (2007)] egy keresztmetszetét kívánják adni a jelenleg folyó kutatómunka eredményeinek. A munkatársaink tapasztalatai

és a rendelkezésre álló műszerek és berendezések lehetővé teszik a korszerű laboratóriumi műveletek, eljárások valamint technológiák kidolgozását a korábban felsorolt kutatási témákban. Az Intézetnek fontos feladata vezető szerepet betölteni a műszaki kémiai kutatásokban, és elsődleges célja új, hatékonyabb és „tisztá”, kémiai és biokémiai folyamatok kutatása, a kapott eredményekből új műveletek, eljárások és technológiák kidolgozása, és ezek hasznosítása ipari partnerek közreműködésével.

Dr. Nagy Endre  
igazgató

\*A szerkesztőség megjegyzése: A lektorált anyag nem készült el a szám nyomdába adásáig. Ezért a Vass-Pallai: Új, energiatakarékos, mikrohullámú technológia rövid főzési idejű rizs előállítására című közlemény a következő füzetek egyikébe kerül a nyilvánosság elé.

# Szilárd fázisú biokatalizátorok kialakítása és jellemzése glükóz oxidáció élelmiszeripari célú alkalmazásának előkészítése céljából

SISAK Csaba\*, CSANÁDI Zsófia és SZAJÁNI Béla

Pannon Egyetem, Műszaki Informatikai Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, 8200 Veszprém, Egyetem u. 10.

## 1. Bevezetés

A biokatalizátorok, azaz az enzimek, ill. a multienzim rendszerekként működtetett mikroorganizmusok, növényi és állati szövetek jelentősége napjainkban is fokozódik az ipari technológiákban, pl. az élelmiszeripar szinte valamennyi ágában, a gyógyszeriparban és a finomvegyszer-gyártásban. Előnyük a szerves katalizátorokkal szemben elsősorban kiemelkedő specifikus, és az, hogy mérsékelt hőfokon, semlegeshez közeli pH mellett képesek kifejteni hatásukat.

Több élelmiszeripari technológiában szükség van az induláskor jelenlévő vagy a folyamat során keletkező glükóz eltávolítására anélkül, hogy a termék egyéb összetevői károsodnának:

- A tojáspor előállítása során a tojásfehérje glükóztartalmát (kb. 4 g dm<sup>-3</sup>) a szárítás során bekövetkező karamellizáció (barnulás) elkerülése és a tartósabb termék előállítása érdekében kell eltávolítani.<sup>1</sup>
- Az ún. prebiotikumként<sup>2</sup> alkalmazott fruktooligoszacharidok (FOSZ) szacharózból történő biokatalitikus szintézisének a melléktermékként képződő glükóz erős kompetitív inhibitoraként működik, tehát a hozam és a termelékenység növelése érdekében célszerű a glükóznak a szintézissel szimultán eliminálása.<sup>3</sup>

A glükóz oxidáz (GOD) ( $\beta$ -D-glucose:oxygen 1-oxidoreductase; EC 1.1.3.4.) egyike azon enzimeknek, amelyekre nagyfokú fajlagosság jellemző,<sup>4</sup> és ezt a tulajdonságát hatékonyan ki lehet használni a glükóz szelektív eltávolítására. Az enzim a következő bruttó egyenlet szerint működik:



A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> melléktermék képződése miatt inaktíválódhat a glükóz oxidáz<sup>5</sup>, ezért szükséges, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t elbontsák, mégpedig célszerűen egy másik enzimmel, a katalázzal (hydrogen peroxide:hydrogen peroxide oxidoreductase; EC 1.11.1.6.):



A kereskedelmi GOD készítmények rendszerint elegendő mennyiségben tartalmaznak katalázt is, ill. emellett gyakran más enzimeket. A felhasználási céltól függ, hogy el kell-e távolítani ez utóbbiakat, vagy –, ha nem zavarják a célreakciót - benn maradhatnak a készítményben.

A glükózmentesítés ipari megvalósításánál fontos szempont, hogy a viszonylag drága enzim elválasztható legyen a terméktől. Élelmiszerek gyártásánál ez azért is lényeges, hogy idegen fehérje ne kerüljön a termékbe. Ezt a követelményt legegyszerűbben az enzim szilárd szemcsés hordozóra való rögzítésével, immobilizálásával<sup>6</sup> lehet teljesíteni. A rögzített vagy szilárd-fázisú kapcsolható biokatalizátorok legfontosabb további előnyei a következők:<sup>7,8</sup> Alkalmazásuk lehetővé teszi folyamatos üzemmód megvalósítását; nagy katalizátorsűrűség érhető el a reaktorban; és a rögzítés rendszerint megnöveli a biokatalizátor stabilitását.

A GOD immobilizálására számos módszert dolgoztak ki. Eredményesen rögzíthető többek között a kalcium-alginát gélgyöngybe zárással,<sup>9</sup> kovalens kötések kialakításával, nikkell oxidhoz,<sup>10</sup> alumínium vegyületekhez,<sup>11,12</sup> glioxil-agarózhoz,<sup>13</sup> poliakril-amidhoz,<sup>14</sup> kapcsolható továbbá polimer membránhoz is.<sup>15</sup>

A GOD koszubsztrátja az oxigén. Mivel vizes oldatokban rendszerint rosszul oldódik, az oxidációs folyamat sebességét gyakran a gázból a folyadékfázisba való oxigéntranszport sebessége határozza meg. Az átvitel javítható a fázisok intenzív érintkeztetésével, vagy levegő helyett tiszta oxigéngáz alkalmazásával. Olyan rendszerekben, amelyekben a közvetlen buborékoltatás zavart okozna (pl. a tojásfehérje felhabzik) buborékmentes levegőztetők, oxigenátorok használhatók.<sup>16,17</sup>

Jelen közleményünkben azokat az eredményeinket mutatjuk be, amelyek két, gyakorlatban fontos enzimkatalizált glükózoxidációs folyamatnak, az előbbieken említett tojásfehérje glükózmentesítésnek, ill. a fruktooligoszacharid szintézis során keletkező glükóz melléktermék *in situ* eliminálásának a megvalósítására alkalmas szilárd-fázisú biokatalizátorok előállítására, tesztelésére, ill. a reakció-körülmények optimalizálására vonatkoznak.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. Tojásfehérje glükózmentesítésére alkalmas biokatalizátor (Biokatalizátor "A") előállítása

A rögzítendő biokatalizátor kiválasztásánál olyan kereskedelmi glükóz oxidáz készítmények között válogattunk, amelyeknek elegendően nagy volt a kataláz aktivitása.

A Novo Nordisk (Dánia) által *élelmiszeripari célra* forgalmazott NOVOZYM 771-re<sup>18</sup> esett a választásunk,

\*Dr. Sisak Csaba. Tel.:06-88-624-036; fax: 06-88-624-036; e-mail: sisak@mukki.richem.hu

amelynek GOD aktivitása  $1,34 \text{ U mg}^{-1}$ . Egységnyi az az enzimtömeg, amely percenként  $1 \text{ } \mu\text{mol}$   $\beta$ -D-glükóz oxidációját katalizálja pH 5,1-n és  $35^\circ\text{C}$ -on.<sup>9</sup> A preparátum kataláz aktivitása  $1,44 \text{ U mg}^{-1}$  volt.  $1 \text{ U}$  annak az enzimtömegnek felel meg, amely percenként  $1 \text{ } \mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -t bont el pH 4,5-n és  $25^\circ\text{C}$ -on.<sup>19</sup> A megvalósítandó folyamat esetében nem volt jelentősége annak, hogy a preparátum glükozidáz szennyezést is tartalmaz.

Az enzimmegőrzéshez biokompatibilis hordozóanyagként Amberlite UP 900 típusú anioncserélő gyantát alkalmaztunk (Rohm and Haas, USA). A gyanta szemcsemérete  $560\text{-}700 \text{ } \mu\text{m}$ , pórusmérete  $40\text{-}75 \text{ nm}$ , fajlagos felülete pedig  $25\text{-}30 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .

Rögzítő ágens az élelmiszeriparban elfogadott glutaraldehyd volt, amelyet 25%-os vizes oldat formájában a REANAL-tól szereztünk be. A többi vegyszer is reagens minőségű volt.

A szűrt tojásfehérjét a SÁTO Tojásfeldolgozó és Kereskedelmi Kft. (Budapest) bocsátotta rendelkezésünkre.

A kombinált rögzítés<sup>20,21</sup> első lépése során az ioncserélő gyantán adszorbeáltattuk az enzimeket oly módon, hogy a szemcséket NOVOZYM 771 oldatban rázattuk 2 óra hosszat, pH 5,1-n és  $25^\circ\text{C}$ -on. Ezután a szuszpenziót leszűrtük és többször mostuk ionmentes vízzel. A második lépésben a gyanta-fehérje komplexet  $0,05$  mólos acetát pufferben (pH 5,1) oldott különböző koncentrációjú glutaraldehyd, különböző ideig rázattuk az adszorbeált fehérjemolekulák közötti keresztkötések kialakítása érdekében, majd a szemcséket szűrtük és aldehydmentesre mostuk (lásd részletesen Sisak és munkatársai).<sup>22</sup> A kísérletek alapján meghatározott paraméter optimumok mellett a kötött GOD aktivitás maximális értéket ért el. Azt is ellenőriztük, hogy az ezen körülmények között megkötődött kataláz aktivitás elegendő-e a  $\text{H}_2\text{O}_2$  megfelelően gyors elbontásához.

A fehérjetartalmat Lowry és munkatársai módszerével<sup>23</sup> határoztuk meg. A glükózkoncentrációt fotometriával, o-toluidin reagens (SIGMA, USA) felhasználásával mértük,<sup>24</sup>  $620 \text{ nm}$ -en, SPEKTROMOM 195D típusú (MOM) műszerrel. Az oldott és a rögzített preparátumok GOD aktivitásának meghatározása során a glükózkoncentráció csökkenését vizsgáltuk a fent említett o-toluidines módszerrel.<sup>22,25</sup> A kataláz aktivitás értékeket a  $\text{H}_2\text{O}_2$  titán-dioxiddal alkotott komplexe  $415 \text{ nm}$ -en mérhető abszorbanciájának változása alapján állapítottuk meg.<sup>19,22</sup>

## 2.2. Fruktooligoszacharid szintézis során képződő glükóz in situ eliminálására alkalmas biokatalizátor (Biokatalizátor "B") előállítás

A tojásfehérje glükózmentesítésére alkalmasnak talált NOVOZYM 771 nem bizonyult használhatónak a FOSZ szintézis során képződő glükóz eliminálására, mivel az oligoszacharid céltermékek glükozidkötéseit bontó enzimeket is tartalmaz. Ezért *finomvegyszerként forgalmazott* glükóz oxidáz (FLUKA; *Aspergillus niger*) és kataláz (SIGMA; marha májból izolált) keverékével dolgoztunk. A GOD aktivitás  $215 \text{ U mg}^{-1}$ , a kataláz aktivitás  $830 \text{ U mg}^{-1}$  volt.

Areakcióelegy összetevői a FOSZ szintézis reakcióegyével azonosak voltak: szacharóz (REANAL), kesztőz, nisztóz, fruktozil-nisztóz (Wako, Japán) és glükóz (REANAL). A szacharóz és az oligoszacharidok koncentrációit egy kétórás szintézisreakció elegyét modellezve állítottuk be<sup>26</sup>. A glükóz koncentrációját  $5\text{-}25 \text{ g dm}^{-3}$  között változtattuk, hogy kerüljük a túl intenzív  $\text{H}_2\text{O}_2$  képződést.

A kombinált rögzítés során a kiindulási glükóz oxidáz / kataláz tömegarányt 2:1-re állítottuk be annak érdekében, hogy a kötött GOD és kataláz aktivitás arányokra hasonló értékeket kapjunk, mint a NOVOZYM 771 rögzítésekor. A GOD-ot ( $50 \text{ mg}$ ) és a katalázt ( $25 \text{ mg}$ )  $10 \text{ cm}^3$  pH=5,1 ( $0,05 \text{ M}$ ) acetát pufferben oldottuk, majd az oldatot  $1 \text{ g}$  regenerált anioncserélő gyantához adtuk. Szobahőfokon való  $24$  órás rázatást ( $150 \text{ rpm}$ ) követően a szemcséket szűrtük és acetát pufferrel mostuk. Ezután  $1 \text{ h}$  rázatás ( $150 \text{ rpm}$ ) következett szobahőfokon,  $10 \text{ cm}^3$ -nyi 5,1-es pH-jú acetát pufferben oldott glutaraldehyddel, amelynek koncentrációját és a kontaktidőt változtattuk. Végül a szemcséket aldehydmentesre mostuk és levegőn kiszárítottuk.

Az enzimmegőrzéshez felhasznált egyéb anyagok, továbbá a GOD-, ill. a kataláz aktivitás meghatározási módjai azonosak voltak a 2.1. fejezetben leírtakkal. A glükózkoncentráció meghatározásakor ez esetben nem alkalmazhattuk az o-toluidines módszert, mivel a modellreakció-elegyben levő egyéb cukrok zavarták volna a meghatározást. Ezért egy, a glükózra szelektív enzimes módszerrel, a keletkező NADPH koncentrációját spektrofotometriásan mérve határoztuk meg a reakcióelegyben a glükózkoncentrációt.<sup>26</sup>

## 3. A kísérleti eredmények és értékelésük

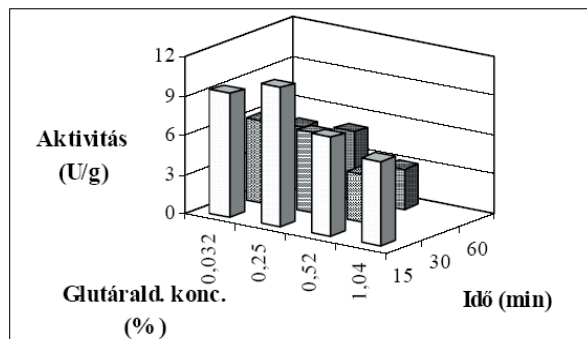
### 3.1. A GOD és a kataláz koimmobilizálása NOVOZYM 771-ből kiindulva

A NOVOZYM 771 típusú enzimoldat fehérjéinek adszorpciójára szolgáló kísérletek során a gyantán megkötött optimális fehérjetartalomra  $27,8 \text{ mg g}^{-1}$  érték adódott, amelyet akkor kaptunk, ha  $157 \text{ mg}$  fehérjét tartalmazó NOVOZYM 771 oldatban rázattunk  $1 \text{ g}$  hordozót.<sup>23</sup>

Az adszorbeált enzimmolekulák közötti keresztkötések kialakítása céljából végzett vizsgálataink folyamán a glutaraldehyd reagens koncentrációját és a kötési időt változtattuk. A legjobb fajlagos GOD aktivitást - a  $10,2 \text{ U g}^{-1}$  száraz gyanta értéket - a  $0,25\%$  glutaraldehyd oldatban végzett  $15$  perces kezelés esetén értük el (ld. 1. ábra). Ez aktivitásérték más, a szakirodalomban leírt rögzített GOD készítményekkel összehasonlítva közepesnél gyengébbnek számít, de az olcsó alapanyagok és az egyszerű rögzítési technika, továbbá a jó működési stabilitás (ld. a 3.2. fejezetben) figyelembevételével a *Biokatalizátor "A"* jelű preparátum az adott technológiai feladatra jól használhatónak ígérkezett.

Amint azt feltételeztük, az immobilizálási eljárás során nem csupán a GOD, hanem kataláz is jelentős részben megkötődött a hordozón. A vizsgált körülmények között a rögzített kataláz aktivitás értéke ( $2,51 \text{ U g}^{-1}$  száraz gyanta)

többszöröse volt a tojásfehérje glükóztartalmának oxidációja során felszabaduló  $H_2O_2$  kellő sebességű elbontásához szükséges aktivitásnak. A rögzítési eljárás nem volt érzékeny a léptéknövelésre: 1000-szeresére növelve a reakcióelegy tömegét a fajlagos aktivitás eltérése a laborléptékhez képest nem haladta meg a  $\pm 5\%$ -ot.<sup>23</sup>

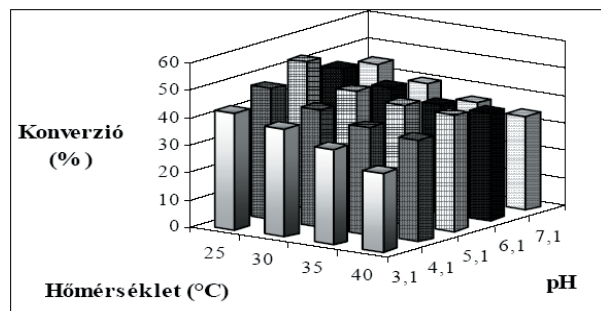


1. Ábra. A rögzítési optimumok meghatározása a NOVOZYM 771 alapú Biokatalizátor „A” előállításához

### 3.2. A Biokatalizátor „A” preparátum működési optimumainak és stabilitásának meghatározása

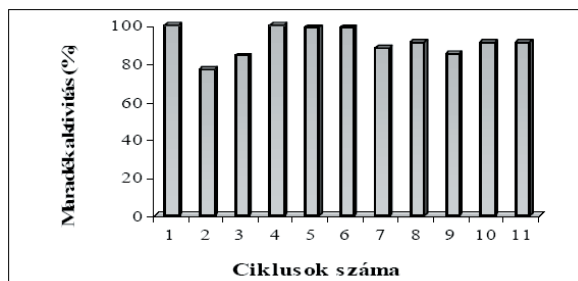
Az optimális működési körülmények meghatározása során 450 mg-nyi immobilizált enzimet adtunk  $10\text{ cm}^3$ , különböző pH-jú acetát pufferben oldott glükózhoz ( $4\text{ g cm}^{-3}$ ). A szuszpenziókat 1 órán át ráztuk különböző hőmérsékleteken. Ahogy a 2. ábra mutatja, az optimumokra a következő értékek adódtak: pH 5,1; hőmérséklet  $25^\circ\text{C}$ <sup>23</sup>. Ezek a paraméterek gyakorlatilag megegyeztek a gyártó által a NOVOZYM 771-re közölt adatokkal.<sup>18</sup>

A preparátum működési stabilitását szakaszos glükózmentesítési kísérletek sorozatával állapítottuk meg. Az előbbi bekezdésben leírt reakcióelegyet úgy módosítottuk, hogy a cukoroldatot tojásfehérjével cseréltük fel. Három órán keresztül végeztük a glükóz eliminálását. Ez alatt az idő alatt a cukor döntő hányada oxidálódott. Ezután a rögzített enzimet leszűrtük, majd friss tojásfehérjében újra szuszpendáltuk. Ezt a műveletsort 11-szer ismételtük. A produktivitás értékek változását a 3. ábrán mutatjuk be. Az eredmények extrapolálásával mintegy 6 hónapos felezési időt kaptunk, tehát a szilárd fázisú biokatalizátorunk kellően stabilnak bizonyult. Ezt támasztotta alá az a megfigyelésünk is, hogy két évig hűtőszekrényben puffer alatt tartva a preparátumot, az semmit sem veszített aktivitásából.



2. Ábra. A NOVOZYM 771 alapú Biokatalizátor „A” működési optimumának meghatározása.

A készítmény gyakorlati alkalmazhatóságát úgy igazoltuk, hogy egy folyamatos üzemű, nagylaboratóriumi léptékű, mechanikusan kevert, spirál csőmembránnal levegőztetett, háromlépcsős fluidizációs reaktorban üzemi körülmények között végeztünk kísérleteket. A reaktorban 4 órás tartózkodási idő esetén, 1,2 bar csőoldali oxigénnyomás mellett lényegében glükózmentes tojáslet állítottunk elő.<sup>23</sup>



3. Ábra. A NOVOZYM 771 rögzítésével nyert Biokatalizátor „A” működési stabilitása.

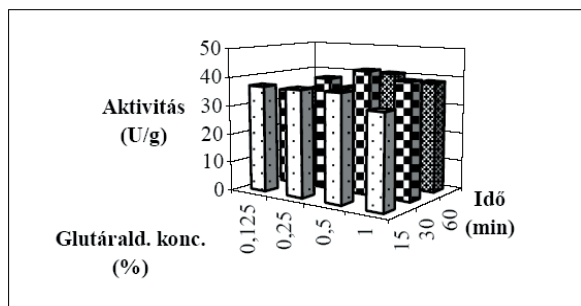
### 3.3. Finomvegyszer minőségű GOD és kataláz koimmobilizálása Biokatalizátor „B” előállításához

A 2.2. fejezetben leírtak szerint végrehajtott enzimadszorpciót követően vizsgáltuk a glutaraldehid keresztkötések optimális kialakításának körülményeit. Az eredményeket a 4. ábrával illusztráljuk. A diagramból a kötési időre 30 perces, a glutaraldehid koncentrációra 0,5%-os optimum értékek olvashatók le. A Biokatalizátor „B” két keresztkötési paraméterre feltehetően azért kaptunk a 1. ábrán láthatóknál nagyobb értékeket, mert itt a reakcióelegybe bemért összfehérje-koncentráció lényegesen nagyobb volt, mint a NOVOZYM 771 rögzítésekor. Az optimális rögzítési körülmények között a Biokatalizátor „B” jelű preparátumra  $40,4\text{ U g}^{-1}\text{ GOD}$ - és  $39,5\text{ U g}^{-1}$  katalázaktivitás értékeket kaptunk. Ezek az értékek természetesen lényegesen magasabbak, mint a Biokatalizátor „A” megfelelő jellemzői, hiszen az enzimidatok kiindulási aktivitásai is több mint két nagyságrenddel nagyobbak voltak.

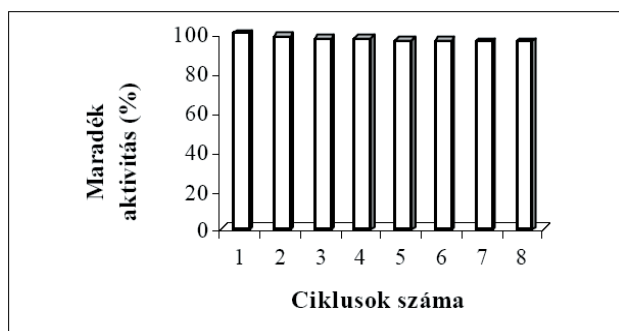
### 3.4. A Biokatalizátor „B” preparátum működési optimumainak és stabilitásának meghatározása

Mindkét kísérletsorozatot a 3.2. fejezetben leírtakkal csaknem azonos módon hajtottuk végre. A Biokatalizátor „B” működési optimumai jó közelítéssel megegyeztek a Biokatalizátor „A” megfelelő értékeivel. A glükózoxidáció számára a legkedvezőbb pH 5,1, a hőmérséklet pedig  $30^\circ\text{C}$  volt. A stabilitásvizsgálatok során 8-8 órás reakcióidővel 8 ciklust futtattunk le  $20\text{ g dm}^{-3}$  kiindulási koncentrációjú glükózoldattal,  $2\text{ mól}$  koncentrációjú szaharóz jelenlétében. A GOD produktivitás az 5. ábrán látható ütemű lassú csökkenést mutatott, de ez nem befolyásolta a használhatóságot.

A Biokatalizátor „B” típusú koimmobilizált GOD + kataláz preparátummal jelenleg folytatunk, az ugyancsak rögzített fruktozil-transzferázzal katalizált FOSZ szintézissel<sup>27</sup> szimultán, glükóz eliminációs kísérleteket. A kezdeti eredmények biztatóak.



4. Ábra. A rögzítési optimumok meghatározása a FLUKA GOD és SIGMA kataláz alapú Biokatalizátor „B” előállításához



5. Ábra. FLUKA GOD és SIGMA kataláz koimmobilizálásával kapott Biokatalizátor „B” működési stabilitása

#### 4. Összefoglalás

Élelmiszeriparban felhasználható, glükóz oxidáz és kataláz koimmobilizálásával nyerhető biokatalizátorok előállítási lehetőségeit és katalitikus sajátosságait vizsgáltuk. A kiindulási natív enzimkészítmények tisztasági fokát aszerint kellett megválasztanunk, hogy a rögzített preparátumot milyen reakcióban kívánjuk alkalmazni. A bemutatott eredményekkel igazoltuk, hogy glükóz oxidáz- és kataláz-tartalmú enzimelegyeket anioncserélő gyantán adszorbeáltatva, majd a megkötődött enzimmolekulák között glutáraldehiddel keresztkötéseket létrehozva olyan koimmobilizált biokatalizátorokat lehet létrehozni, amelyek kellően nagy GOD és kataláz aktivitással és működési stabilitással rendelkeznek. A stabilitást nem befolyásolta lényegesen, hogy az alapanyagként használt oldott enzimek technikai vagy finomvegyyszer minőségük.

A preparátumok egyikét sikeresen alkalmaztuk egy, az élelmiszeriparban, a termék értékének és eltarthatóságának növeléséhez szükséges glükózmentesítési folyamatban, nevezetesen tojásfehérje glükóztartalmának eliminálására. A másik készítménynek szacharózból kiinduló enzimkatalitikus fruktoooligoszacharid szintézis során várható hozamjavító hatását jelenleg vizsgáljuk.

#### Hivatkozások

- Baldwin, R. R.; Campbell, H. A.; Thiessen, R.; Lorant, G. J. *Food Technol.* **1953**, 7, 275.
- Bornet, F. R. J.; Brouns, F.; Tashiro, Y.; Duvillier, V. *Dig. Liv. Dis.* **2002**, 34, 111.
- Yun, J. W. *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, 19, 107.
- Wilson, R.; Turner, A. P. F. *Biosens. Bioelectron.* **1992**, 7, 165.

- Fernández-Lafuente, R.; Rodríguez, V.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, G.; Arminsen, P.; Sabuquillo, P.; Guisán, J. M. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **1999**, 7, 173.
- Chibata, I.; Tosa, T. *Applied Biochemistry and Bioengineering* (eds.: Wingard, L. B.; Katchalski-Katzir, E.; Goldstein, L.), Vol. 1., Academic Press: New York, **1976**.
- Cabral, J. M. S.; Best, D.; Boross, L.; Tramper J. (eds.) *Applied Biocatalysis*, Harwood Academic Publishers: GB.-Switzerland, **1994**.
- Hultin, H. O. *Food Technol.* **1983**, 37, 66.
- Blandino, A.; Macias, M.; Cantero, D. *Process Biochem.* **2001**, 36, 601.
- Wetall, H. H.; Hersh, L. S. *Biochem. Biophys. Acta* **1970**, 206, 54.
- Bautista, F. M.; Campelo, J. M.; Garcia, A.; Jurado, A.; Luna, D.; Marinas, J. M.; Romero, A. A. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **2001**, 11, 567.
- Alberti, B. M.; Klivanov, A. M. *Enzyme Microb. Technol.* **1982**, 4, 47.
- Betancor, L.; López-Gallego, F.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; Dellamora-Ortiz, G.; Guisán, G.; Fernández-Lafuente, R. *J. Biotechnol.* **2005**, 121, 284.
- Szajani, B.; Molnar, A.; Klamar, G.; Kalman, M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, 14, 37.
- Godjevargova, T.; Dayal, R.; Turmanova, S. *Macromol. Biosci.* **2004**, 4, 950.
- Martin, S.; Soucaille, P.; Condoret, J. S. *Bioprocess Eng.* **1995**, 13, 293.
- Link, T.; Backstrom, M.; Graham, R.; Essers, R.; Zorner, K.; Gatgens, J.; Burchell, J.; Taylor-Papadimitriou, J.; Hansson, G. C.; Noll, T. *J. Biotechnol.* **2004**, 110, 51.
- NOVOZYM 771. Product sheet B 427d-GB. Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark, **1997**
- Pifferi, P. G.; Bonora, V.; Spagna, G.; Tramontini, M. *Process Biochem.* **1993**, 28, 29.
- Dinella, C.; Lanzarini, G.; Stagni, A.; Palleschi, C. *J. Chem. Techn. Biotechnol.* **1994**, 59, 237.
- D'Annibale, A.; Stazi, S. R.; Vinciguerra, V.; Di Mattia, E.; Sermanni, G. G. *Process Biochem.* **1999**, 34, 697.
- Sisak, C.; Csanádi, Z.; Rónay, E.; Szajáni, B. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39, 1002.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Faer, L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265.
- Cooper, G. R.; McDaniel, V. *Clin. Chem.* **1970**, 6, 159.
- Hang, Y. D.; Woodams, E. E. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1996**, 29, 578.
- Kunst, A.; Draeger, B.; Ziegenhorn, J. *D-Glucose* (in Bergmeyer, H. U. (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., Vol. VI.), VCH Publishers (UK) Ltd.: Cambridge, UK, **1988**.
- Csanádi, Z.; Sisak, C. *Acta Aliment. Hung.* **2006**, 35, 205.

#### Formation and characterization of solid-phase biocatalysts in order to prepare food industrial application of glucose oxidase

Preparation of co-immobilized glucose oxidase (GOD) and catalase and application of two types of the solid-phase biocatalysts to glucose oxidation for food industrial purposes have been investigated.

A co-immobilization method on Amberlite UP 900 anion exchange resin using a combination of adsorption of enzymes and cross-linking of adsorbed enzyme molecules by glutaraldehyde treatment has been elaborated.

For elimination of glucose content of egg white liquor – to prevent the browning at egg white powder production -, an industrial biocatalyst (NOVOZYM 771) containing sufficient activity of

both GOD and catalase has been proved to be applicable for immobilization. At the optimal cross-linking parameters (15 min fixing time; 0.25% glutaraldehyde concentration), the GOD and catalase activities of the fixed biocatalyst were 10.2 and 2.51 units g<sup>-1</sup> dry solid, respectively. These values have been proved to be suitable for the practical purposes of desugaring of egg white. Optimal operational parameters (Fig. 2), such as temperature (25°C) and pH (5.1) for immobilized glucose oxidase have been found practically equal to the data published by the dealer for NOVOZYM 771. The preparation showed high storage and operational stability (Fig. 3), its half-life time was about 6 months.

The immobilized enzyme (*Biocatalyst "A"*) was used for the elimination of glucose from egg white in a pilot-scale three-stage fluidized-bed bioreactor with mechanical mixing, equipped with large porous surface for bubble-free transport of oxygen as co-substrate. The glucose content was fully oxidized using oxygen pressure of 1.2 bar and 4 h residence time at 25 °C.

In case of another potential application of glucose oxidase, the carry-out of elimination of glucose by-product (competitive

inhibitor) formed during the enzymatic fructooligosaccharide (FOS) synthesis, NOVOZYM 771 or similar industrial GOD preparations can not be used because of their glucosidase content.

Therefore, purified GOD and catalase of fine chemical quality were mixed in the appropriate ratio (2:1) then the particles of Amberlite UP 900 resin were suspended in the solution. Following the adsorption cross-linking step was carried out. Optima of the procedure – taking into consideration of the achievable maximum of immobilized GOD activity – were 30 min fixing time and 0.5 % glutaraldehyde concentration. It was supposed that the achieved enzyme activities (GOD: 40,4 units g<sup>-1</sup>; catalase: 39,5 units g<sup>-1</sup>) were sufficient for in situ elimination of glucose content of FOS synthesis. The optimal operational parameters as well as the stability of the second preparation (*Biocatalyst "B"*) were just the same as in case of *Biocatalyst "A"*.

Application tests of the latter biocatalyst are in progress. The first results in the system containing two solid-phase biocatalysts, fructosyl-transferase and co-immobilized GOD/catalase are promising.

# Anizotróp membránrétegben lejátszódó, kémiai reakcióval kísért diffúziós és konvekciós anyagáram leírása

NAGY Endre<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Pannon Egyetem, Műszaki Informatikai Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Pf. 158, H-8201 Veszprém

## 1. Bevezetés

A szilárd rétegen keresztüli anyagátadási műveletek esetében a diffúziós tényező, konvekció sebesség gyakran nem állandók, hanem folytonosan változnak, vagy rétegenként különböző értékűek, a helykoordináta (pl. anizotróp membránréteg), vagy a koncentráció függvényében. Ilyen folyamatok például a többrétegű membránon keresztüli anyagátadás, a gél elektroforézis, az enzimreakció rétegelt membránban, a heterogén katalitikus reakció membránrétegben. Koncentrációfüggő diffúzió leggyakrabban a Stefan-Maxwell,<sup>1</sup> a Froy-Huggins<sup>2</sup> elmélettel, vagy a módosított Vignes egyenlettel<sup>3</sup> írható le. Locke és munkatársai<sup>4,5</sup> tanulmányozták összetett membránon keresztüli elektroforetikus, instacionárius anyagtranszportot. A parciális differenciálegyenlet-rendszer – minden, infinitézimálisan vékony membrán rétegre felírt, állandó együtthatójú differenciálegyenletek összessége – megoldásához az operator elméletet alkalmazták,<sup>6</sup> míg a stacionárius állapotra analitikus megoldást adtak meg. Ez utóbbi esetben a membránon kívüli anyagátadási ellenállást nem veszik figyelembe, ami lényegesen korlátozza a kapott összefüggések alkalmazhatóságát, különösen a vékony membránrétegen keresztüli anyagátadási folyamat leírására.

A megoldáshoz membránt, folytonosan változó diffúziós tényező és/vagy konvekció sebesség esetében, infinitezimálisan vékony rétegekre bontjuk konstans diffúziós tényezővel és konvekciós sebességgel. Az így kapott, állandó együtthatós differenciálegyenlet-rendszert megfelelő határfeltételekkel, analitikusan megoldhatjuk. Nagy, a kétkomponensű elegy, stacionárius pervaporációja,<sup>7,8</sup> valamint a membrán reaktorban fellépő diffúziós anyagáram<sup>9</sup> leírására alkalmazza a fenti módszert. A stacionárius, többrétegű vagy anizotróp membránon keresztüli diffúziós és konvekciós, elsőrendű reakcióval kísért anyagátadást, a külső anyagátadási ellenállás figyelembevételével vizsgáljuk. A bemutatott módszer és megoldás előnye, hogy egyszerű összefüggésekkel megadja, bármely, nem állandó együtthatós, közönséges, másodrendű differenciálegyenlet megoldását, amivel könnyen és pontosan számolhatók az összetett közegben lejátszódó, stacionárius anyagátadási folyamatok. Másrészt, a megoldás alkalmazható tetszőleges vastagságú többrétegű membránok esetében is.

## 2. Elméleti rész

A megoldandó differenciálegyenlet:

$$\frac{d}{dx} \left( D \frac{dc}{dx} \right) - \frac{d(uc)}{dx} - kc = 0 \quad (1)$$

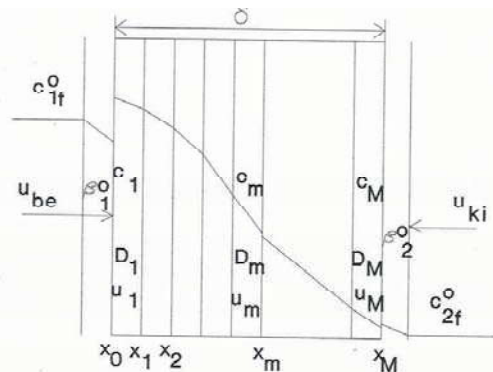
Az (1) összefüggés értelmében az anyagtranszport csak x irányban, a felületre merőlegesen történik.

A peremfeltételei:

$$u_{be} c_{1f}^* + \beta_1^o (c_1^o - c_{1f}^*) = -D_1 \frac{\partial c_1}{\partial x} \Big|_{x=0^+} + u_1 c_1 \Big|_{x=0^+} \quad (2)$$

$$u_{ki} c_{Mf}^* + \beta_2^o (c_{Mf}^* - c_2^o) = -D_M \frac{\partial c_M}{\partial x} \Big|_{x=\delta^-} + u_M c_M \Big|_{x=\delta^-} \quad (3)$$

A gyakorlatban gyakrabban használják a membránban a koncentráció leírására a súlyhányadot ( $w$ ) vagy térfogathányadot. Pl. a súlyhányad és e közleményben alkalmazott  $c$  koncentráció, mol/m<sup>3</sup>, könnyen átszámolható egymásba a  $c = w\rho/M$  összefüggéssel, ahol  $\rho$  a membrán átlagos sűrűsége, kg/m<sup>3</sup>, míg  $M$  itt a molekulásúly, kg/kmol.



1. Ábra. Egy anizotróp membrán felosztása konstans paraméterű, infinitezimális vékonyságú rétegekre

Egy anizotróp membrán  $\Delta x$  vastagságú rétegekre való felosztását szemlélteti az 1. ábra, konstans paraméterekkel. Többrétegű membrán ettől csak abban különbözik, hogy a rétegek vastagsága eltérő, és nagyobb érték, valamint, hogy az egyes rétegekben az oldhatósági tényező,  $H$ , értéke (az ábra ezt nem jelöli) különböző lehet. Az egyes rétegekre felírandó differenciálegyenlet és a peremfeltételek:

$$D_m \frac{d^2 c_m}{dx^2} - u_m \frac{dc_m}{dx} - kc_m = 0 \quad x_{m-1} < x < x_m \quad (4)$$

Dimenziómentes formában ( $X = x/\delta$ ;  $Pe_m = \delta u_m / D_m$ ,

$$C_m = c_m / c_1^o, \quad Ha_m = \sqrt{\delta^2 k_m / D_m}, \quad c_{1f}^* H_o = H_1 c_1^*, \quad c_{Mf}^* H \delta = H M c_M^*):$$

$$\frac{d^2 C_m}{dX^2} - Pe_m \frac{dC_m}{dX} - Ha_m^2 C_m = 0 \quad X_{m-1} < X < X_m \quad (5)$$

Bevezetve a következő változót:

$$\tilde{C} = C \exp\left(-\frac{PeX}{2}\right) \quad (6)$$

\*Nagy Endre, Tel.: +3688-624 040; fax: +3688 624 038; e-mail: nagy@mik.vein.hu; honlap: www.richem.hu/rice/new/staff/Nagy.htm



a következő összefüggést kapjuk:

$$\frac{d^2 \tilde{C}_m}{dX^2} - \Theta_m^2 \tilde{C}_m = 0 \quad (7)$$

ahol

$$\Theta_m = \sqrt{\frac{Pe_m^2}{4} + Ha_m^2}$$

A (7) egyenlet általános megoldása a szakirodalomban ismert:

$$C_m = T_m e^{(\tilde{\lambda}_m X)} + P_m e^{(\lambda_m X)} \quad (8)$$

A  $T_m$  és  $P_m$  ( $m=1,2, \dots, M$ ) paraméterek értékeit a felosztással kapott rétegek felületére (1. ábra) felírandó belső peremfeltételek alkalmazásával határozhatjuk meg az  $X=X_m$  ( $m=1,2, \dots, M-1$ ) helyen:

$$-\frac{dC_m}{dX} + Pe_m C_m = \frac{D_{m+1}}{D_m} \left( -\frac{dC_{m+1}}{dX} + Pe_{m+1} C_{m+1} \right) \quad (9a)$$

$$H_m C_m = H_{m+1} C_{m+1} \quad \text{ha } X=X_m \quad (9b)$$

A fenti belső peremeket kiegészítjük a membrán külső felületére megadható peremfeltételekkel, amelyek a (2) és (3) egyenletek alapján a következők:

ha  $X=0$ , akkor

$$Sh_1 = \frac{dC_1}{dX} \Big|_{X=0^+} + (Pe_1 + \tau_o) C_1 \Big|_{X=0^+} \quad (10a)$$

ha  $X=1$ , akkor

$$-Sh_2 C_2^o = -\frac{dC_M}{dX} \Big|_{X=1^-} + (Pe_M - \tau_M) C_M \Big|_{X=1^-} \quad (10b)$$

ahol  $Pe_{be} = \frac{u_{be} \delta}{D_1}$ ;  $Pe_{ki} = \frac{u_{ki} \delta}{D_M}$ ;  $Sh_1 = \frac{\beta_1^o \delta}{D_1}$ ;  $Sh_2 = \frac{\beta_2^o \delta}{D_M}$ .

A peremfeltételekkel kapott algebrai egyenletrendszer megoldásával kapjuk a  $T_i$  paraméter értékét (a megoldást máshol ismertetjük):

$$T_1 = \frac{Sh_o \left( \tilde{\lambda}_1 - \frac{\Psi_{M-1}}{\xi_{M-1}} \right) e^{(-\Theta_1 \Delta X)} - B_1}{2(\tau_o \xi_M + \Psi_M) \cosh(\Theta_1 \Delta X)} \quad (11)$$

ahol

$$B_1 = \tilde{\lambda}_o \Omega_{M-1} Sh_M C_2^o e^{(-Pe_M / 2)}$$

A (11) szereplő  $\psi_{M-1}$ ,  $\xi_{M-1}$  és  $\Omega_M$  értékei az 1. táblázat, összefüggéseivel számolható ki. Mindkét esetben az  $i$  futóparaméterrel  $i=1$ -től  $M-1$  értékig kiszámolandók valamennyi  $\psi_i$ ,  $\xi_i$  és a  $\Omega_i$  valamint  $M$  értékig az  $E_i$  és az  $\tilde{E}_i$  értékei. A  $P_i$  paraméter értékét a (10a) peremfeltételből kapjuk:

$$P_1 = \frac{Sh_1 - \lambda_o T_1}{\tilde{\lambda}_o} \quad (12)$$

A  $T_i$  és a  $P_i$  paraméterek ismeretében számolható a membrán betáplálási oldalán fellépő teljes anyagátadási áram ( $J$ ):

$$J = \frac{D_1 C_1^o}{\delta} \left( -\frac{dC}{dX} \Big|_{X=0} + Pe_1 C \Big|_{X=0} \right) = \frac{D_1 C_1^o}{\delta} (\lambda_1 T_1 + \tilde{\lambda}_1 P_1) \quad (13)$$

Az anyagáram növekedését  $E$ -vel jelöltük, amit a kémiai reakció nélküli teljes anyagáram,  $J^o$  és a kémiai reakcióval kísért anyagáram,  $J$  hányadosa adja,  $\lim J=J^o$ , ha  $Ha \rightarrow 0$ .

**1. Táblázat.** Az együtthatók ( $i=1, 2, \dots, M$  vagy  $M-1$ ) számolásához felhasználandó összefüggések

|   |
|---|
| $\tau_o = (H_1 / H_o)(Sh_1 - Pe_{be}); \quad \tilde{\lambda}_o = \tau_o + \tilde{\lambda}_1;$   |
| $\tau_M = (H_\delta / H_M)(Sh_2 - Pe_{ki}); \quad \lambda_o = \tau_o + \lambda_1$   |
| $\xi_1 = Hr_{M-1}(\tanh(\Theta_1 \Delta X)[\tau_M - Pe_M / 2] + \Theta_M);$   |
| $\Psi_1 = Dr_{M-1}[E_M \Theta_1 + \tilde{E}_M(\tau_M - Pe_M / 2)];$   |
| $\Omega_1 = \frac{-Dr_{M-1} \tilde{E}_M \cosh(\Theta_M \Delta X) + \Psi_1 Hr_{M-1} \sinh(\Theta_M \Delta X)}{\Theta_M \xi_1 \Theta_M}$                  |
| paraméterek $i=1,2, \dots, M-1$ :   |
| $\lambda_i = \frac{Pe_i}{2} - \Theta_i; \quad \tilde{\lambda}_i = \frac{Pe_i}{2} + \Theta_i;$   |
| $Dr_i = \frac{D_{i+1}}{D_i} e^{\frac{(Pe_{i+1} - Pe_i) i \Delta X}{2}}; \quad Hr_i = \frac{H_{i+1}}{H_i} e^{\frac{(Pe_{i+1} - Pe_i) i \Delta X}{2}};$   |
| paraméterek $i=2, \dots, M-1$ :   |
| $\Psi_i = Dr_{M-i} \left( E_{M+1-i} \Theta_{M+1-i} - \tilde{E}_{M+1-i} \left[ \frac{Pe_{M+1-i}}{2} - \frac{\Psi_{i-1}}{\xi_{i-1}} \right] \right)$      |
| $\xi_i = Hr_{M-i} \left( \Theta_{M+1-i} - \left[ \frac{Pe_{M+1-i}}{2} - \frac{\Psi_{i-1}}{\xi_{i-1}} \right] \tanh(\Theta_{M+1-i} \Delta X) \right)$    |
| $\Omega_i = \Omega_{i-1} \left( \frac{Dr_{M-i} \tilde{E}_{M+1-i} \cosh(\Theta_{M+1-i} \Delta X)}{\Theta_{M+1-i}} - \frac{\Psi_i}{\xi_i} \Xi_i \right);$ |
| $\Xi_i = \frac{Hr_{M-i} \sinh(\Theta_{M+1-i} \Delta X)}{\Theta_{M+1-i}}$  |
| paraméterek $i=1,2, \dots, M$ :   |
| $E_i = \frac{Pe_i}{2} + \Theta_i \tanh(\Theta_i \Delta X); \quad \tilde{E}_i = \Theta_i + \frac{Pe_i}{2} \tanh(\Theta_i \Delta X)$                      |

Amennyiben ismerni akarjuk a membránból kilépő anyagáramot, meg kell határozni a  $T_m$  és  $P_m$  ( $m=2, \dots, M$ ) értékeit. A (9a) és (9b) belső peremfeltételek alkalmazásával könnyen kiszámolhatjuk a fenti paraméterek értékeit:

$$T_m = \frac{(s_{m-1} Dr_{m-1} \tilde{\lambda}_m - \tilde{s}_{m-1} Hr_{m-1}) e^{-\Theta_m (m-1) \Delta X}}{Dr_{m-1} Hr_{m-1} (\tilde{\lambda}_m - \lambda_m)} \quad (13)$$

és

$$P_m = \frac{(\tilde{s}_{m-1} Hr_{m-1} - s_{m-1} Dr_{m-1} \lambda_m) e^{\Theta_m (m-1) \Delta X}}{Dr_{m-1} Hr_{m-1} (\tilde{\lambda}_m - \lambda_m)} \quad (14)$$

ahol

$$s_m = T_m e^{\Theta_m m \Delta X} + P_m e^{-\Theta_m m \Delta X}$$

és

$$\tilde{s}_m = T_m \lambda_m e^{\Theta_m m \Delta X} + P_m \tilde{\lambda}_m e^{-\Theta_m m \Delta X}$$

### 3. Eredmények és értékelésük

A következőkben néhány, tipikus ábrával szemléltetjük a változó paraméterek, Peclet-szám ( $Pe=u\delta/D$ ), Hatta-szám  $Ha = \sqrt{k\delta^2/D}$ , valamint a Sherwood-szám ( $Sh=\beta^o\delta/D$ ) hatását a membránon keresztüli anyagátadásra. A kapott anyagátadási összefüggések invariánsok a  $D(x)$  (helykoordináta függő diffúziós tényező),  $D(c)$  (koncentrációfüggő diffúziós tényező) vagy az  $u(x)$ ,  $k(x)$ ,  $k(c)$  függvény alakjára.



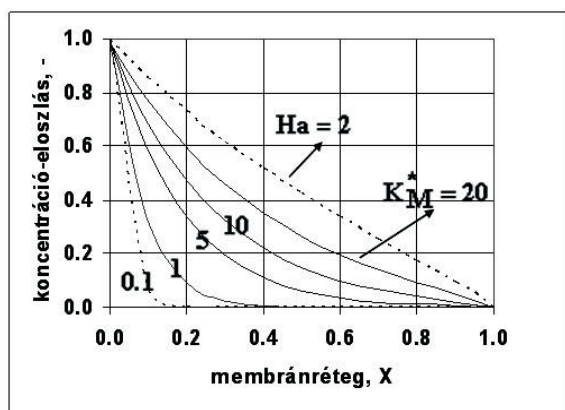
lehesen tekinteni. Emiatt a módszer alkalmazható a fenti módszerrel linearizálható egyéb differenciálegyenletek, így pl. a biokémiában gyakran előforduló Michaelis-Menten egyenlet megoldására is. A Michaelis-Menten egyenletet a  $k_m C$  alakban helyettesíthetjük, forrástagként a (4) differenciálegyenletbe, ahol értelemszerűen a  $k_m$  értéke a következő lesz ( $K_M^* = K_M / c_I^0$ ,  $\bar{c}_m$  a  $C_m$  átlagértéke a rétegben):

$$k_m = \frac{v_{max}}{K_M^* + \bar{c}_m} \quad (15)$$

Amennyiben a  $\bar{c}_m \ll K_M^*$ , akkor elsőrendű reakciósebességet kapunk, ellenkező esetben,  $\bar{c}_m \gg K_M^*$ , nulladrendű lesz a reakció. A számoláshoz a Long et al.<sup>10</sup> ibuprofén észter, membránreaktorban megvalósított, enzimátikus reszolválása során kapott adatokat használtuk fel. A különböző  $K_M^*$  értékek mellett kapott koncentráció-eloszlást a 6. ábrán mutatjuk be. A felső szaggatott görbe elsőrendű ( $Ha=2$ ) reakcióhoz tartozik. Az alsó szaggatott görbe közelítően a nulladrendű reakció koncentráció-eloszlása. A (15) egyenletnek megfelelően a  $Ha$  értéke erősen változik a  $K_M^*$  értékével, elsősorban ennek a következménye a koncentrációk, egymástól lényegesen eltérő lefutása.

#### 4. Összefoglalás

Változó együtthatós, másodrendű differenciálegyenlet egy közelítő analitikai megoldását mutatjuk be a konvekció, a diffúzió és a kémiai reakció együttes figyelembevételével. Tipikus ábrákkal szemléltetjük a membránon fellépő koncentráció-eloszlást. A módszerrel egyszerűen és egzaktul számolható a membránrétegen fellépő anyagtranszport, figyelembe véve a külső anyagátadási ellenállást is. A kapott koncentráció-értékek, infinitezimálisan vékony rétegek esetén a numerikus megoldással megegyezőek.



6. Ábra. A Michaelis-Menten konstans hatása a koncentráció eloszlásra a membrán rétegben ( $v_{max}=10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3\text{h}$ ;  $K_m=50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ;  $D_m=5,4 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ;  $\delta=100 \mu\text{m}$ ,  $Pe_m=1$ ,  $Sh_1=Sh_2=187$ ,  $H_m=1$ ;  $=0$ ,  $M=100$ )

#### Jelölésjegyzék

- $c$  koncentráció,  $\text{mol}/\text{m}^3$   
 $C$  dimenziómentes koncentráció ( $=c/c_I^0$ )  
 $D$  diffúziós koeficiens,  $\text{m}^2/\text{s}$   
 $Ha$  Hatta-szám vagy módosított Thiele modulus  
 $Ha_m = \sqrt{\delta^2 k_m / D_m}$   
 $H$  oldhatósági tényező,-

- $J$  a membrán betáplálási oldalán fellépő anyagáram,  $\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$   
 $J^0$  anyagáram kémiai reakció nélkül,  $\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$   
 $k$  reakció-sebességi állandó,  $1/\text{s}$   
 $K_M$  Michaelis-Menten konstans,  $\text{mol}/\text{m}^3$   
 $M$  a membrán-alréteg maximális száma  
 $Pe$  Peclet-szám,  $Pe = u\delta / D$   
 $Sh$  Sherwood-szám,  $Sh = \beta^0 \delta / D$   
 $u$  konvekciós sebesség,  $\text{m}/\text{s}$   
 $x$  térkoordináta,  $\text{m}$   
 $\beta$  anyagátadási tényező,  $\text{m}/\text{s}$   
 $\delta$  membránréteg vastagsága,  $\text{m}$

#### Alsó indexek

$f$  folyadék

1,2 fázisok

#### Felső indexek

\* membrán felülete

o főtömeg

#### Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki az Országos Tudományos Kutatási Alapnak (No. 063615/06) a kutatási téma pénzügyi támogatásáért

#### Hivatkozások

1. Krishna, R.; Wesselingh, J.A. *Chem. Engng. Sci.* **1997**, *52*, 862-906
2. Mulder, M. *Basic principle of membrane technology*, Kluwer, Dordrecht, **1996**
3. Bitter, J.G.A. *Transport mechanisms in membrane separation processes*, Shell-laboratorium, Amsterdam, **1991**
4. Locke B.R.; Arce P. *Chem. Engng. Sci.* **1993**, *48*, 1675-1686
5. Locke B.R.; Arce P.; Park Y. *Chem. Engng. Sci.* **1993**, *48*, 4007-4022
6. Ramkrishna D; Amundson N.R. *Chem. Engng. Sci.* **1974**, *29*, 1457-1464
7. Nagy E. J. *Membrane Sci.* **2006**, *274*, 159-168
8. Nagy E. *Desalination* **2004**, *163*, 345-354
9. Nagy E. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 2295-2306
10. Long, W.S., Bhatia, S., Kamaruddin, A. *J. Membrane Sci.* **2003**, *219*, 69-88

#### Convective-diffusive mass transport, accompanied by chemical reaction, through anisotropic membrane layer

The mass transport of solutes in multiphase layered systems such as membranes and gels or in medium with discontinuous variation in physical properties has important application to a wide range of separation and purification processes. Such kind of separation methods are e.g. the purification of macromolecules in biotechnology using gel electrophoreses, membrane electrophoreses, gel-particle electro-chromatography and separation of components in anisotropic solid layer or in composite medium, etc. During the mass transport through anisotropic membrane the mass transport parameters, namely diffusion coefficient, convective velocity, the reaction rate constant, varies continuously as a function of the space co-ordinate. Similarly, the concentration dependent diffusion coefficient can also cause its continuous variation in the diffusion path. The solution of the above problems means practically the same task. A number of theoretical, empirical approaches have been made in order to model the mass transport in gels and membranes. Most of this work considers the transport across single layers of medium with unvarying properties. Locke and Arce<sup>4</sup> as well as Locke et al.<sup>5</sup> developed solution to the general problem using operator-theoretic methods in both cases, namely for steady-state and unsteady-state conditions and for zero-

order and first-order source system. Their model does not involve the external mass transfer coefficient. The role of the external mass transfer resistance could be important, especially in the case of the mass transport through thin membrane layer and/or mass transport accompanied by chemical reaction. On the other hand, the solution developed gives essentially simpler equations for the calculation of the mass transfer rate or the concentration distribution. The general solution of a second-order, ordinary differential equation with varying parameters will be given elsewhere.

This work is focused on the mass transport through anisotropic or multi-layered membrane layer with continuously varying or piecewise constant physical properties, and consequently, with varying diffusion coefficient, convective velocity and reaction rate constant. The effect of a chemical reaction should also be taken into account at enzyme catalyzed or by other catalyst catalyzed chemical reactions.

Role of the external mass transfer coefficients on the both sides of the membrane could be very important, especially, in presence of chemical reaction in the membrane matrix. This paper gives a

quasi-analytical solution for this problem. Essential of this solution methodology is that the membrane is divided to  $M$  sub-layer with constant diffusivity and convection velocity. Thus, the thickness of these sub-layers should be very thin (in the case of continuously varying parameters as in an anisotropic membrane or e.g. concentration dependent diffusion coefficient) or the thickness is determined by the thicknesses of the membrane layers (multilayered membrane). The algebraic equation system obtained with applying the boundary conditions was solved by means of the well known Cramer rules applying them to determinants obtained from the equations. The function of the variation of the parameters can be occasional; the model developed can be applied at any function of the variable parameters. The convective velocity strongly alters the concentration distribution, and consequently, the mass transfer rate. Its change as a function of space co-ordinate could cause significant increase of the concentration in the membrane layer. The concentration distribution and the mass transfer rate are given in explicit, closed mathematical forms. It is shown the effect of the external mass transfer coefficient, the reaction rate and the convective velocity on the concentration distribution and the mass transfer rate.

# Gázok FTIR spektrometriai analízisének fejlesztése és alkalmazásai

BACSIK Zoltán<sup>a\*</sup>, GYIVICSÁN András<sup>b</sup> és MINK János<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Magyar Tudományos Akadémia, Kémiai Kutatóközpont, Szerkezeti Kémiai Intézet, H-1025 Budapest, Pusztaszeri út 59-67.

<sup>b</sup>Pannon Egyetem, Fizikai, Gépészeti és Mechatronikai Intézet, Fizika Tanszék, H-8200 Veszprém, Egyetem u. 10.

<sup>c</sup>Pannon Egyetem, Műszaki Informatikai Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, H-8200 Veszprém, Egyetem u. 10.

## 1. Bevezetés

A gázanalízisben régóta számos jól bevált technikát alkalmaznak a kemilumineszcenciától a gázkromatográfiáig, ám az utóbbi évtizedben a spektroszkópiás technikák is nagyobb figyelmet érdemeltek ki, mivel alkalmazásuk lehetővé teszi a gázok viszonylag olcsó, gyors és megbízható mérését. A Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) technika<sup>1-6</sup> legfőbb előnye, hogy – az infravörös fényt el nem nyelő homonukleáris kétatomos molekulákon kívül – a szinképen a vizsgált levegőmintában megtalálható összes gázmolekula infravörös sávja megjelenik, így kiváló szelektivitás mellett egyidejűleg többféle anyag azonosítására nyújt lehetőséget; roncsolásmentes, nincs szükség bonyolult mintaelőkészítésre.

A FTIR gázspektroszkópia a fejlettebb technikával rendelkező országokban körülbelül 15 éves múltra tekint már vissza, és néhány speciális mérésre már szabványok is léteznek.<sup>7-9</sup> Mindezek ellenére a módszer még mindig nem nevezhető teljesen kiforrottnak, a mennyiségi analízis, a mérések automatizálása, módszerek további fejlesztése és újszerű analitikai alkalmazások a napjainkban megjelenő publikációk gyakori témái.

Magyarországon a korszerű FTIR gázanalízis első berendezései (hosszú fényutas gázcellák) hozzávetőleg egy évtizede érkeztek a Pannon Egyetemre. Az összetett környezetvédelmi analitika követelményeihez még jobban igazodó nyílt fényutas FTIR mérőrendszer pedig valamivel később került a laboratórium felszerelése közé. (Ezt a rendszert egyébként ésszerű takarékosági okokból a Nyugat-Magyarországi Egyetem Kémiai Intézetével használjuk közösen.) Az így megteremtett modern laboratóriumban folyó munkáról, módszerek fejlesztéséről, speciális analitikai feladatok megoldásáról ad rövid áttekintést e közlemény.

## 2. Az alkalmazott műszerek

### 2.1. Extraktív technika

A laboratóriumban egy dinamikus tükröbeállításal (dynamic alignment) működő, MCT (merkuro-kadmium-tellurid) detektorral felszerelt Bio-Rad FTS-185 típusú Fourier-transzformációs spektrométer üzemel. Intenzív fényforrásként a közép-infravörös (MIR) tartományban egy szilícium-karbid alapú izzó kerámia szolgál.

A spektrométerhez a zárható mintatérbe helyezhető 10 cm-es, egyszerű átfolyó vagy a speciálisabb célokra használható

fűthető, nyomásálló gázküvetkén kívül két multireflexiós, hosszú fényutas cella csatlakoztatható: egy 25,7 m fényutas, a spektrométer mintatérébe helyezhető, fotolízisre alkalmas (PAPA-32 - Infrared Analysis Inc.), és egy 360 m fényutas ún. "Super Cell" gázküvetta.

### 2.2. Nyílt fényutas technika

Az extraktív technikától csak egy – bár igen jelentős – fő tulajdonságban tér el a nyílt fényutas (*open path*) módszer. A minta tulajdonképpen a fényforrás és a detektor közötti légréteg, tehát a mérés során a fény a nyílt térben halad, így külön mintavételezésre nincs szükség: a mérések *in situ* végezhetők. Ebből adódóan a pontszerű mintavételezésen alapuló analitikai módszerekhez képest merőben új lehetőségeket kínál ez a technika.

Az általunk alkalmazott MIDAC gyártmányú nyílt fényutas rendszer egy fényforrásból (20,3 cm átmérőjű parabolatükörrel), egy a fény összegyűjtésére alkalmas Newton-teleszkópból, és annak a tetejére helyezhető egységből áll, amely az MCT detektort és az interferométert tartalmazza.

## 3. Újjonnan kidolgozott módszerek

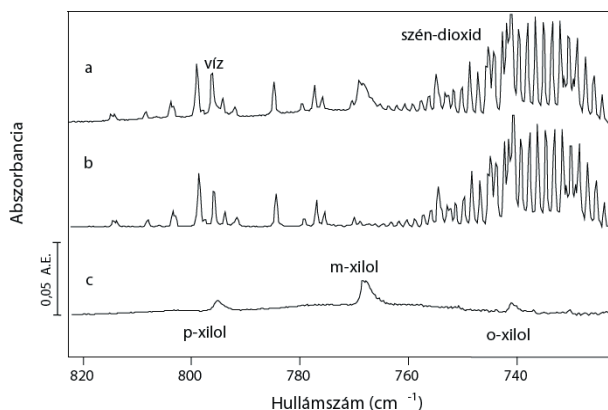
### 3.1. Új háttértechnika: az „árnyékspektroszkópia”

Az IR gázspektrometriában – különösen hosszú fényút alkalmazása mellett – az egyik legfőbb nehézséget a légköri mintákban mindig jelenlévő CO<sub>2</sub> és vízgőz sávjainak az abszorbanancia spektrumból való színképi eliminálása, tehát gyakorlatilag a jó háttérspektrum kiválasztása okozza. Egy ilyen módszert alapozott meg Hanst,<sup>10</sup> amelyet részleteiben kidolgoztunk és a technika jellege miatt árnyékspektroszkópiának neveztünk el.<sup>11</sup>

A módszer minden olyan anyag esetén alkalmazható, amely UV-fény hatására levegőn oxidálódik. Ide tartozik a szerves légszennyezők nagy része, valamint néhány nitrogén tartalmú vegyület és ezek oxidációs termékei, stb. Alkalmazása során a mintában az oxidálható szerves anyagokat UV-fény besugárással közvetve vagy közvetlenül oxidáljuk, így ezek elnyelési sávjai a spektrumból eltűnnek, ugyanakkor a vízgőz és szén-dioxid mennyisége nem, ill. csak kis mértékben, az oxidált anyagok mennyiségével összevethetően változik, mivel a teljes oxidáció során végtermékként H<sub>2</sub>O és CO<sub>2</sub> keletkezik.

\*Főszerző. Tel.: (1) 4381100/516; fax: (1) 4381159; e-mail: bacsik@chemres.hu.

Ha a minta UV-fénnyel történő besugárzása előtt és után felvett egysugaras színekéből egy közös evakuált gázcella színekével abszorbancia spektrumokat állítunk elő, majd azokat egymásból kivonjuk, végeredményként az ún. „árnyékspektrumot” kapjuk, amelyen csak az elreagált gázok sávjai, és kis mennyiségű vízgőz és szén-dioxid színeje található (1. ábra). Az utóbbiak azonban színeként kivonással viszonylag könnyen eltávolíthatók a spektrumból, mert olyan abszorbancia-tartományban vannak, ahol az abszorbancia-koncentráció összefüggés linearitása érvényben van.



1. Ábra. Az árnyékspektrum előállítása xilolok példáján<sup>11</sup>

a) a minta spektruma, b) a minta spektruma 3 perc UV-besugárzás után, c) az árnyékspektrum

A hagyományos módszerekkel (evakuált gázküvetta vagy „tisza levegő” háttér majd könyvtári víz és szén-dioxid referencia színek kivonás) elérhető kimutatási határokhoz képest az árnyékspektroszkópia alkalmazásával lényegesen csökkentettük néhány illékony szerves vegyület (benzol, toluol, *p*-, *o*- és *m*-xilol, aceton) kimutatási határát. Az árnyékspektroszkópiát sikeresen alkalmaztuk konkrét analitikai feladatok megoldása során is.

### 3.2. A nyomás meghatározása infravörös színek alapján

Amennyiben a minta egy olyan zárt térben van, amelyben a nyomást műszerrel nem tudjuk mérni, akkor használhatjuk az általunk kidolgozott új módszert,<sup>12</sup> amely alkalmazása során a gáztérrel felvett infravörös színek alapján határozzuk meg a gáztérben uralkodó össznyomást. Az elvégzett kalibráció mellett megvizsgáltuk a módszer hibáját. Az 1. táblázatban összehasonlítottuk az ún. félérték-módszerrel meghatározott, illetve a nyomásmérő műszerrel beállított nyomásértékeket. Szembetűnő, hogy a módszer relatív hibája meglehetősen kicsi, a vizsgálható tartomány pedig valószínűleg még tovább bővíthető.

Méréseink alapján elmondható, hogy a módszer alkalmas zárt terekben (pl. gázárányokban) uralkodó össznyomás roncsolásmentes meghatározására akkor, ha a minta a szükséges infravörös tartományban átereszt és egy megfelelő koncentrációjú, a színekben (az alkalmazott spektrális felbontás mellett) forgási finomszerkezettel rendelkező komponens jelen van a térben.

1. Táblázat. A félérték-módszerrel meghatározott, illetve a nyomásmérő műszerrel beállított nyomásértékek összehasonlítása<sup>12</sup>

| Nyomás           |            | Különbség      |             |
|------------------|------------|----------------|-------------|
| Beállított [atm] | Mért [atm] | Abszolút [atm] | Relatív [%] |
| 0,5              | 0,492      | -0,008         | -1,60       |
| 0,6              | 0,613      | 0,013          | 2,17        |
| 0,7              | 0,705      | 0,005          | 0,71        |
| 0,8              | 0,797      | -0,003         | -0,38       |
| 0,9              | 0,894      | -0,006         | -0,67       |
| 1,0              | 0,995      | -0,005         | -0,50       |
| 1,1              | 1,095      | -0,005         | -0,45       |
| 1,2              | 1,213      | 0,013          | 1,08        |
| 1,3              | 1,295      | -0,005         | -0,38       |
| 1,4              | 1,386      | -0,014         | -1,00       |
| 1,5              | 1,514      | 0,014          | 0,93        |

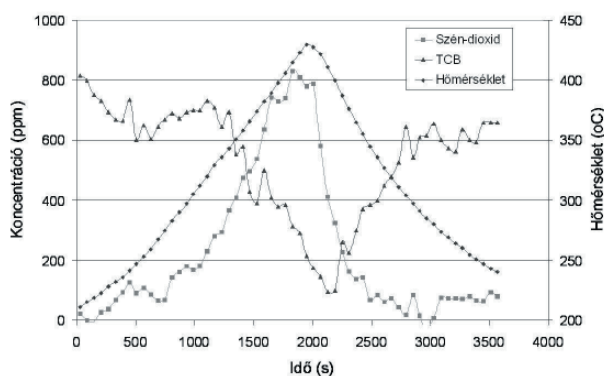
## 4. Gyakorlati alkalmazások

Miután laboratóriumunkban megteremtettük a korszerű gázanalítika feltételeit, lehetőségünk nyílt számos gázanalitikai feladat megoldására. Az alábbiakban ezekből mutatunk be néhány fontosabbat, illetve azokat, amelyekben a kidolgozott módszereinket sikeresen alkalmaztuk.

### 4.1. Gázanalízis technológiai folyamatokban

#### 4.1.1. Gáztisztításban használt katalizátorok vizsgálata

Egy speciális rendszert állítottunk össze a környezetvédelemben használatos palládium-alapú katalizátorok működésének optimalizálására, a reaktorba be- és kilépő gázáram összetételének folyamatos monitorozásával különböző üzemelési paraméterek (hőmérséklet, gázáram, összetétel, stb.) változtatása mellett.



2. Ábra. Triklór-benzol katalitikus bontása közben a TCB és CO<sub>2</sub> koncentrációjának változása a vizsgálat idejének és a hőmérséklet függvényében

Példaként a triklór-benzol (TCB) oxidációs folyamatát vizsgáltuk a 2. ábrán. A felfűtési szakaszban a katalizátor körülbelül 350 °C-on kezd működni. A triklór-benzol koncentrációja csökken, az oxidáció végtermékeként keletkező szén-dioxid koncentrációja pedig növekszik. A katalizátor visszahűtésével a reakció lelassul és végül a TCB átalakulás nélkül áramlik át a reaktoron.

Ebben az alkalmazásban az FTIR gázanalízis alkalmazásának nagy előnye, hogy egyidejűleg több komponens koncentrációjának a változását követhetjük folyamatosan nyomon.

#### 4.1.2. Gázok meghatározása lámpákban

Halogén lámpák belső terében lévő gázok koncentrációját már korábban is roncsolásmentesen mértük. A lámpaburában lévő gázok kis koncentrációja rossz jel/zaj viszonyú színeképeket eredményezett, ám egy speciális kemometriai módszerrel jelentősen javítottuk a gázok kimutatási határát.<sup>13</sup>

Gázkisülő lámpák gyártása során az alapanyagok szennyezettsége miatt CO keletkezhet, ami kis méretű (1 mm átmérő alatt) gázzárványokban a kvarc lámpatestben marad, rontva annak élettartamát. Mivel a kvarc kb. 2080 cm<sup>-1</sup> felett az infravörös fényt átterszi (1 mm falvastagság esetén), az FTIR spektrometria alkalmas a zárványokban lévő gázok mérésére. Az általunk kidolgozott új módszert (3.2. szakasz) sikeresen alkalmaztuk a káros CO koncentrációjának, sőt a zárványokban lévő össznyomás meghatározására.<sup>12</sup>

Ezekben a mérésekben az FTIR technika alkalmazásának jelentős előnye, hogy a lámpa összetörése nélkül tudjuk a gázokat mérni: ez a tény a jövőben folyamatos minőségvizsgálatra is lehetőséget teremt.

### 4.2. Környezetvédelmi mérések

A környezeti mérésekben nagyon jól alkalmazható a nyílt fényutas módszer, hiszen nincs szükség mintavételre, ami által a reaktív komponensek (pl. HCl, NH<sub>3</sub>) is jól mérhetők. Ráadásul ún. területi (nem pontszerű) légszennyező források is mérhetők, ami a hagyományos, nem optikai módszerekkel gyakorlatilag megvalósíthatatlan.

#### 4.2.1. Ipari környezet

Fűzfőgyártelepen, vegyipari üzemek két különböző szennyvíz előüleptető medencéjét vizsgáltuk. Mind az extraktív, mind a nyílt fényutas módszert alkalmaztuk, és a rendelkezésünkre álló irodalmat is felhasználva összehasonlítottuk az alkalmazás során tapasztalható előnyöket, illetve a mérések során felmerülő nehézségeket. Ez az összevetés<sup>14</sup> az FTIR technikák gyakorlói, vagy egy adott légszennyezés mérési feladat előtt álló szakember számára hasznos információkat tartalmaz, magyarázatot adhat az eredmények hibájára, illetve megmutathatja annak forrását. Mindezen túl az üzemen alkalmazott technológia során a szennyvízből elpárolgó – a technológia során elméletileg visszanyert – szerves komponensek (*p*-xilol, *m*-xilol, izopropanol, metanol) jelenlétét is kimutattuk az üleptető medencék fölötti légtérben.

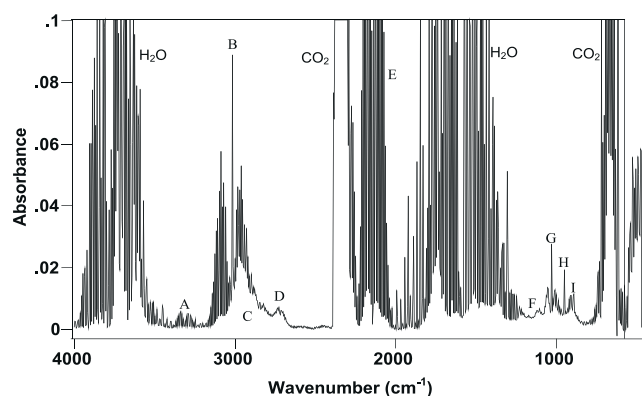
A nyílt fényutas mérőrendszerrel méréseket végeztünk egy vegyipari üzemben. A mérési helyek praktikus kijelölésével az üzemen lévő technológiák levegőszennyező hatásáról kaptunk képet. Az üzemen kívül kijelölt mérőhelyeken az infravörös fényúttal gyakorlatilag egy optikai kerítést hoztunk létre, amely az üzemből kijövő szennyezők koncentrációjának mérésére adott lehetőséget. Az üzemen belül detektáltunk ammóniát, hangyasavat, formaldehidet, metanolt és fenolt, de megállapítottuk, hogy a legfőbb szennyező és szagkeltő vegyület a 2,4-diklór-fenol. Az üzemen belül rámutattunk a kibocsátás szempontjából kritikus helyekre, illetve a 2,4-diklór-fenol környezetbe kerülésének okára.<sup>6</sup>

Amennyiben a légszennyezők forrása pontszerű, akkor mintavételezéssel az extraktív technika is eredményesen alkalmazható. Olajfinomító szennyező gázait határoztuk meg hosszú fényutas gázküvetta alkalmazásával.<sup>15</sup>

#### 4.2.2. Beltéri levegő

A beltéri levegő talán legjelentősebb szennyezője a dohányfüst. Gázkromatográfiával, különböző detektálási módszerekkel és tömegspektrométerrel gyakorlatilag több ezer komponens detektáltak már a dohányfüstben. Az infravörös spektrometria is jelentős módszer az elemzés területén, hiszen a komponensek koncentrációja egyidejűleg és folyamatosan nyomon követhető.

Munkánk során egy egyszerű mintavételi technikával azt vizsgáltuk, hogy a különböző erősségű (különböző névleges nikotin és kátránytartalmú) cigaretták füstjében mérhető gázok (3. ábra) koncentrációjában van-e jelentős különbség.



3. Ábra. Egy tipikus dohányfüst (főfűst) spektrum. Jelölések: A – HCN, B – metán, C – a nem metán szénhidrogének (NMHC), D – acetaldehid, E – CO, F – acetaldehid, G – metanol, H – etilén, I – izoprén.

Méréseinkkel<sup>16</sup> igazoltuk, hogy a vizsgált gázok (metán, etán, acetaldehid, CO, metanol, etén, izoprén, propén, HCN, NO) inhalációjának szempontjából nem számít, hogy a dohányzó személy milyen erősségű cigarettát szív, azaz a főfűst toxikus gáztartalmában nincs lényeges (statisztikai módszerekkel igazolható) különbség. Nyílt fényutas dohányfüstös szoba modellünkkel pedig bemutattuk, hogy a toxikus gázok többsége a szervezetben marad vagy visszatartódik, azaz a „legtisztább” dohányfüst a dohányzó által kifúj füst.

E munkában bemutatott módszerek és analitikai alkalmazások

részletesebb leírása megtalálható Bacsik Zoltán doktori (PhD) értekezésében<sup>17</sup> és az idézett cikkeinkben.

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki a Nyugat-Magyarországi Egyetem Kémiai Intézetének a nyílt fényutas rendszer közös beszerzéséért és használatért, a Balaton Projektnek és az Oktatási Minisztériumnak (FKFP 0170/2000, OMFB 00320/2004) az anyagi támogatásért. Kiemelt köszönettel tartozunk Törösváryné Kovács Zsuzsának, Horváth Krisztiánnak és Dr. Keresztury Gábornak. Munkánk eredményességéhez nagyban hozzájárultak: Welther Károly, Kajdacsi Ágnes, Dr. Morvay György, Gyulai Gyöngyi – mérések; Dr. Albert Levente, Dr. Németh Zsolt, Dr. Rétfalvi Tamás, Hofmann Tamás – közös műszerhasználat; Görög Annamária, Komlósi Viktória, Farnady Eszter, Ollár Tamás, Horváth Bálint, Kaszab Veronika, Biri Bernadett, Balogh Nóra, Kovács Krisztián – diplomamunkák; Jancsó Gábor, (Thanks to) Ian Butler, Peter Griffiths, Yngvar Thomassen, Michael Heise, Philip Hanst – szakmai segítség.

### Hivatkozások

- Hanst, P. L.; Hanst, S. T. *In Air Monitoring by Spectroscopic Techniques*; Sigrist, M. W., Ed.; Wiley-Interscience: New York, **1994**; pp 335-466.
- Russwurm, G. M.; Childers, J. W. *In Handbook of Vibrational Spectroscopy*; Chalmers, J. M.; Griffiths, P. R., Eds.; Wiley: New York, **2002**; Vol. 2, pp 1750-1773.
- Spellicy, R. L.; Webb, J. D. *In Handbook of Vibrational Spectroscopy*; Chalmers, J. M.; Griffiths, P. R., Eds.; Wiley:

### Developments and applications of FTIR gas spectrometry

A complete laboratory of FTIR gas spectrometry has been successfully developed including both extractive and open path FTIR techniques. In this paper a short review is given about this work. The method of so-called 'shadow spectroscopy' has been developed, which can be used for fast and reliable compensation of the disturbing absorption of atmospheric water vapour and carbon dioxide. The method was applied to detection of some volatile organic compounds (*o*-, *m*- and *p*-xylene, benzene, toluene and acetone) and the detection limits have been considerably improved. New method has been developed to determine the total pressure by means of FTIR spectrometry. The method is applicable to the determination of total pressure in enclosed spaces (e.g. gas cavities) within any kind of infrared transparent material where a gaseous compound is present and shows resolvable rotational fine structure. The gas spectrometry has been successfully applied to solve several analytical problems. To optimise the operation (ideal temperature and flow rate, etc.) of catalysts used for degradation of air pollutants, an experimental set-up has been built to investigate the

- New York, **2002**; Vol. 2, pp 1721-1749.
- Griffith, D. W. T.; Jamie, I. M. *In Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R. A., Ed.; Wiley: Chichester, **2000**; pp 1979-2007.
  - Bacsik, Z.; Mink, J.; Keresztury, G. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2004**, *39*, 295-363.
  - Bacsik, Z.; Mink, J.; Keresztury, G. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2005**, *40*, 327-390.
  - US EPA. *Compendium Method TO-16, Long-Path Open Path Fourier Transform Infrared Monitoring of Atmospheric Gases*, EPA/625/R-96/010b. EPA: Cincinnati, **1999**, 2<sup>nd</sup> edn.
  - US EPA. *Measurement of Vapor Phase Organic and Inorganic Emissions by Extractive Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*. US EPA Test Method 320, *Federal Register* **1999**, *64*, 31937-31962.
  - VDI-Guideline 4211 *VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Part 1. Remote Sensing, Atmospheric Measurements Near Ground with FTIR Spectroscopy, Measurement of Gaseous Emissions and Immissions Fundamentals*, VDI: Berlin, Beuth, 2000.
  - Hanst, P. L. In *Measurement of Toxic and Related Air Pollutants*, Proceedings of the 1994 US EPA/AWMA International Symposium, Durham, North Carolina, May 2-6, 1994; pp 576-582.
  - Bacsik, Z.; Mink, J., *Talanta* **2007**, *71*, 149-154.
  - Bacsik, Z.; Gyivicsán A.; Horváth, K., Mink, J. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2382-2387.
  - Hren, B.; Mink, J.; Balázs, L. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6402-6407.
  - Bacsik, Z.; Komlósi, V.; Ollár, T.; Mink, J. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2006**, *41*, 77-97.
  - Hren, B.; Katona, K.; Mink, J.; Kohán, J.; Isaák, Gy. *Analyst* **2000**, *125*, 1655-1659.
  - Bacsik, Z.; McGregor, J.; Mink, J. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 266-271.
  - Bacsik, Z. PhD értekezés, Pannon Egyetem, 2006.

efficiency of the catalyst by continuous analysis of the reactor inlet and outlet gas streams. A new method was applied to determine of carbon monoxide concentration and the total pressure in gas cavities obtained in the silica glass body of modern light bulbs. The open-path FTIR field technique was applied to measure the concentration of gases (or vapours) originated from diffuse sources of pollution. The critical technological processes and the places of distribution of 2,4-dichlorophenol (as the main air pollutant) in a chemical factory have been established. A comprehensive comparison of long path extractive and open path FTIR techniques on the bases of the available literature and on our own experience at a waste water treatment plant of a chemical factory has been made and the presence of the theoretically banned organic phase in waste water was demonstrated by detection of xylenes, isopropanol and methanol in the air above the basins. It was proved by the FTIR analysis of cigarette smoke for 11 toxic gaseous compounds that the composition of mainstream cigarette smoke inhaled by the smoker shows no correlation with the strength of the cigarette i.e. with its nominal content of nicotine and tar.



# Optikailag aktív komponensek elválasztása: membrán eljárás, mint ígéretes technika

HADIK Péter<sup>a</sup>, NAGY Endre<sup>a,\*</sup>, SZABÓ Péterné<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Pannon Egyetem, Műszaki Informatikai Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Pf. 158, H-8201 Veszprém

## 1. Bevezetés

Az optikailag aktív izomer-párok elválasztásának módszerei ugrásszerű fejlődést hoztak az elmúlt két évtizedben. Az új elválasztási technikák lehetővé teszik az optikai izomerek ipari méretű elválasztását és forgalmazását. A biológiai rendszerek metabolikus és szabályozó folyamatai igen érzékenyek a sztereokémiára és különböző választ figyelhetünk meg, ha összehasonlítjuk az enantiomer-párok aktivitását.<sup>1,2</sup> Jelenleg a szigorúbb hatósági előírások megkövetelik az egyedi enantiomerek farmakológiai tulajdonságainak teljes dokumentációját.

Elsősorban az új, sztereoselektív szintézis módszerek, preparatív elválasztási eljárások és a pontosabb analitikai technikák tették lehetővé az enantiomerek elválasztását. A biotechnológia és a biokatalízis, a tiszta enantiomerek előállításának gyorsan fejlődő területei.<sup>1</sup> Az optikailag aktív komponensek elválasztásának legfontosabb technikái<sup>1</sup> a következők: preparatív technológiák: kristályosítás, kromatográfia (folyadék-, mozgó ágyas-, szuperkritikus folyadék-, vékonyréteg-, ellenáramú kromatográfia), kristályosítás,<sup>3-5</sup> sztereoselektív átalakítás<sup>6</sup> és a membrán eljárások (ez utóbbi technika alkalmazása az utóbbi időben került előtérbe); analitikai eljárások: kapilláris elektroforézis, kromatográfias technikák (vékonyréteg-, gáz-folyadék-, nagynyomású folyadék kromatográfia) folyadék-folyadék extrakció, sztereoselektív biokatalízis.

## 2. A membrán elválasztási eljárások optikailag aktív komponensek elválasztására

Az enantiomerek elválasztására alkalmazott membrán eljárásoknak két általános típusa van: optikailag aktív membrán, amelyet optikailag aktív monomer alkalmazásával állítanak elő és a nem enantioszelektív membrán, amely tartó réteggént szolgál az elválasztáshoz.<sup>2</sup>

## 3. Enantiomer szeparáció szilárd membrán alkalmazásával

A membrán optikailag aktívvá tételéhez két módszert alkalmaznak:

1) optikailag aktív membránnal (enantioszelektív monomerrel állítják elő a polimert) valósítják meg az elválasztást,

2) a membrán mátrixszerkezetébe, vagy a membrán pórusainak felületére optikailag aktív vegyületet, reagenst, hordozót rögzítenek adszorpcióval vagy kémiai kötéssel.

A fenti membránok szelektivitását az elválasztandó izomerek, valamint a membrán anyagába rögzített optikailag aktív reagens közötti enantioszelektív, kémiai kölcsönhatás határozza meg.<sup>7,8</sup> Az enantioszelektivitást ( $\alpha$ ) a két enantiomer permeabilitásának ( $P$ ) hányadosaként definiálhatjuk:<sup>1</sup>

$$\alpha = \frac{P_L}{P_D}$$

Az optikai tisztaságot (%ee) a két enantiomer koncentrációjából ( $C$ ) kapjuk:

$$\%ee = 100 \frac{C_D - C_L}{C_D + C_L}$$

### 3.1. Elválasztás optikailag aktív polimer membránnal

Ebben az esetben optikailag aktív monomerekből építik fel a membrán polimereket.<sup>8,9</sup> A leggyakoribb polimerek a kromatográfiai elválasztás során, álló fázisként alkalmazott vegyületek, mint pl. poliszacharidok (különösen a cellulóz származékok), az akril polimerek, a poli- $\alpha$ -aminosavak és a poli-acetilén származékok.<sup>2</sup>

Az anyagtranszport és az elválasztás egy sematikus rajzát az 1. ábra szemlélteti.<sup>10</sup> A membrán optikailag aktív funkció csoportja kémiai reakcióval megköti valamelyik enantiomert és visszatartja a membránban. Az elválasztás hatékonysága a kémiai reakció sebességétől és a kémiai komplexképző reakció szelektivitásától függ. Thoelen és munkatársai<sup>10</sup> 20 %-os optikai tisztaságot értek el D,L-triptofán enantiomer elválasztási kísérleteik során, míg Aoki és munkatársai<sup>11</sup> 8-16 %-os optikai tisztaságot értek el. Kim és munkatársai<sup>12</sup> 70 %-os optikai tisztaságot kaptak poliszacharid polimer alkalmazásával.

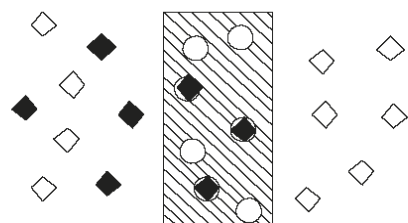
### 3.2. Elválasztás a membrán mátrixban rögzített optikailag aktív reagenssel

E folyamat során a pórusos, polimer-, vagy kerámia-, stb. membránt támasztó réteggént alkalmazzák, és a membránréteg pórusainak belső felületére, (vagy a membrán külső felületére) optikailag aktív reagenst rögzítenek. Bármely szerves- vagy szervetlen membránba rögzíthető optikailag aktív reagens.

Számos membránnal és optikailag aktív reagenssel végeztek kísérleteket. Higuchi és munkatársai. DNA vegyületet<sup>13,14</sup> vagy marha serum albumin-t<sup>15</sup> rögzítettek citozin vagy platinával impregnált cellulóz<sup>15</sup> membrán pórusaiba, a fenilalanin izomerek elválasztására. Megállapították, hogy az L-fenilalanin [(S)-fenilalanin] erősebben megkötődik a

\*Nagy Endre, Tel.: +3688-624 040, Fax.: +3688 624 038, e-mail: nagy@mik.vein.hu, honlap: <http://www.richem.hu/rice/new/staff/Nagy.htm>

rögzített optikailag aktív reagensekkel, mint a D-fenilalanin [(R)-fenilalanin] és reakció egyensúlyi állandója az L-enantiomer esetében magasabb, mint a D-enantiomernél. A híg betáplálási racém fenilalanin oldat alkalmazásával ( $0,006 \text{ mol/m}^3$ ) elért enantioszelektivitás értéke,  $\alpha = 1,4\text{-}2$  között változott.<sup>13</sup>



Betáplálási oldal

Permeátum oldal

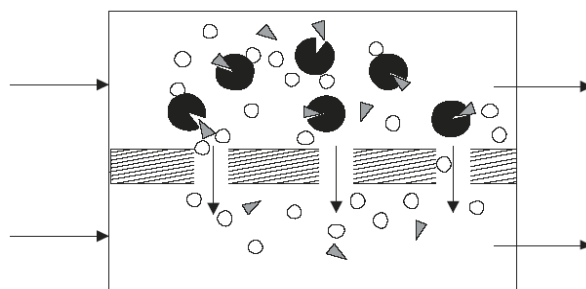
1. **Ábra.** A membránon keresztüli elválasztás optikailag aktív kötőagens alkalmazásával.

Krieg és munkatársai<sup>16</sup>  $\beta$ -ciklodextrin polimert impregnáltak pórusos kerámia csőmembrán pórusaiba a klórtalidon enantiomerjeinek elválasztása céljából. Az elért enantioszelektivitás viszonylag kis érték,  $\alpha = 1,24$ , volt, amely mintegy 11 %-os optikai tisztaságot biztosított. Japán kutatóknak glutáraldehid segítségével sikerült optikailag aktív aminosavakat poliszulfon membránra kötni. Ezzel a módszerrel fenilalanin<sup>17</sup> és L-fenilglicin<sup>18</sup> is rögzíthető. Híg D,L-fenilglicin oldatokkal ( $1 \text{ mol/m}^3$ )  $\alpha = 9$ -es enantioszelektivitási értéket értek el. Pórusos polipropilén csőmembrán és kerámia lapmembrán belső felületére rögzítettek adszorpcióval, különböző optikailag aktív szelektorokat és vizsgálták az enantioszelektivitást Hadik és munkatársai.<sup>19-21</sup> Eredményeiket a 6. szekcióban röviden bemutatjuk.

Fontos módszer az optikailag aktív izomerek elválasztására az ún. affinitás ultraszűrés<sup>22-24</sup>. Ekkor nagy molekulájú optikailag aktív kötőagenst alkalmaznak, amely reagál valamelyik izomerrel és azt visszatartja az oldatban mivel a membrán pórusaihoz képest nagy a mérete. Az elválasztást sematikusán a 2. ábra szemlélteti. A szerzők<sup>22-23</sup> marha szérum albumint (BSA) alkalmaztak optikailag aktív kötőanyagként. Triptofán racém elegy elválasztása során, egy lépcsőben, mintegy 91 %<sup>22</sup> illetve 98 %-os<sup>23</sup> optikai tisztaságú D-triptofánt nyertek, 81 ill. 50 % kihazattal. Ugyanezt a membrán-fehérje elrendezést valósították meg Randon és munkatársai,<sup>24</sup> akik glutáraldehid segítségével szintén BSA-t rögzítettek nylon membrán felületére.

### 3.3. Elválasztás látszólagosan optikailag aktív polimerrel („imprinted membrane”)

E módszernél az optikailag inaktív polimerek szerkezetébe optikailag aktív anyagokat építenek be, majd pedig a végleges szerkezet kialakulása után a beépített anyagokat eltávolítják a polimer mátrixból.<sup>25</sup> Ekkor az optikailag aktív anyag lenyomata az optikailag inaktív membrán szerkezetében marad, látszólagosan optikailag aktívává téve azt. Az ilyen típusú membránokkal Yoshikawa és munkatársai<sup>25</sup> 66 %-os optikai tisztaságú anyagot tudtak előállítani.



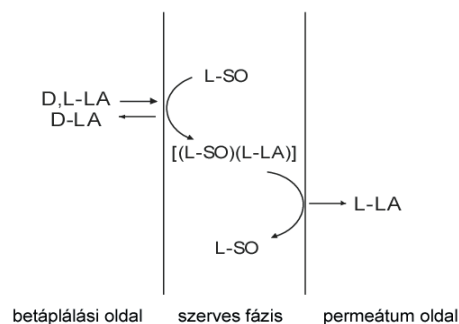
2. **Ábra.** Elválasztás nagyméretű reagens segítségével.

## 4. Enantioszeparáció folyadékmembránokkal

Alapvetően két típusa van ennek az eljárásnak:<sup>26-32</sup>

- támasztó rétegű folyadékmembrán,
- emulzió típusú folyadékmembrán.

Az első esetben a membránként működő, optikailag aktív reagenst tartalmazó folyadékfázist egy szilárd membrán pórusaiba rögzítjük és e rétegen keresztül játszódik le az optikai izomerek transzportja. A második esetben a membránfázis emulzióként van jelen a betáplált folyadékban és elválasztja a komponenset leadó- és felvevő fázisokat.



3. **Ábra.** A D,L-tejsav enantioszeparációjának mechanizmusa.

A rezolválás egy (optikailag aktív hordozót nem tartalmazó) optikailag aktív folyadék, (pl. optikailag aktív alkohol) segítségével is megvalósítható<sup>28</sup> de gyakoribb az a megoldás, amikor egy akirális folyadékban oldanak fel egy királis szelektort (L-SO). Ez a molekula biztosítja a királis környezetet az elválasztani kívánt enantiomerek számára. Fontos elvárás a szelektorról szemben, hogy reverzibilis reakcióba lépjen az egyik enantiomerrel és a létrejövő másodlagos kémiai kötés elég erős legyen a megfelelő szelektivitás biztosításához. A transzport mechanizmusát a 3. ábrán szemléltetjük példaként tejsav racém oldatával.

### 4.1. Támasztott rétegű folyadékmembránok

A támasztó membránréteg pórusaiba rögzített folyadékmembrán<sup>26,27</sup> lehet szerves (hidrofób támasztó réteggel) vagy vizes fázis (hidrofil membránnal). Dzygiel és munkatársai<sup>29</sup> politetrafluoretilén membránlapot alkalmaztak hordozónak, amit a királis reagenst (L-SO) tartalmazó szerves oldószerben duzzasztottak. Armstrong és munkatársai<sup>30</sup>

pedig vízoldható optikailag aktív reagenst ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, vagy  $\gamma$ -ciklodextrint) alkalmaztak hordozó komponensnek. Ehhez hidrofil cellulózlapot használtak a vizes membránfázis támasztó rétegének. E módszerrel a maximálisan elért enantioszelektivitás mértéke  $\alpha = 7$  volt. Pirkle és Doherty<sup>31</sup> szilikon csőmembrán alkalmaztak támasztó rétegnek. Az *N*-3,5-dinitrobenzoil-D,L-leucin- (metil-, -butil-, és -oktil) aminosav észterszármazékainak enantioszelektív permeációját vizsgálták szilikon membránon keresztül és mintegy 77 %-os optikai tisztaságot értek el, amely gyakorlatilag  $\alpha = 8$  enantioszelektivitásnak felel meg. Keurentjes and Voermans<sup>2</sup> szerint kis enantioszelektivitású vegyületekkel is elérhetjük a 99 %-os optikai tisztaságot, csak ehhez, megfelelő hosszúságú kapilláris membrán modul kell készíteni a modulok sorba kötésével. Ehhez méréseik szerint mintegy 2,5 m hosszúságú modulra van szükség.

## 5. Egyéb membrán eljárások

A membrán-bioreaktorban<sup>35,36</sup> megvalósított enantiomerszeparáció során egy, a membránban rögzített enzim által katalizált sztereoselektív hidrolízis hozza létre az elválasztást.<sup>33</sup> Ezzel a módszerrel 99%-os optikai tisztaság is elérhető.<sup>34</sup> Bélafiné Bakó részletes áttekintést ad a membránreaktorok<sup>35</sup> és a membránbioreaktorok<sup>36</sup> alkalmazásáról.

Enantioszeparáció membrános extrakcióval: az enantioszeparáció megvalósítható membrános extrakció segítségével is. Ebben az esetben a megfelelő enantioszeparáció elérése érdekében két vagy több kapilláris membrán modul kötnék sorba. A kapillárisok belsejében vizes oldatban áramlik a racém aminosav, a köpenyoldalon pedig ellenáramban a rezolválószer tartalmazó oktanol fázis.<sup>37</sup> A membránon keresztül a rezolválószer komplexet képez a racém aminosav egyik enantiomerével, majd a másik modulban a megkötött enantiomert leadja a vizes fázisba. Ilyen módon mindkét modul vizes fázisában az aminosav egy-egy enantiomere dúsul fel. Híg oldatokkal dolgoznak ( $4,9 \text{ mol/m}^3$ ), ennek köszönhető az, hogy a kísérlet végére sikerült 99 %-os optikai tisztaságú D-, és L-leucint előállítaniuk.

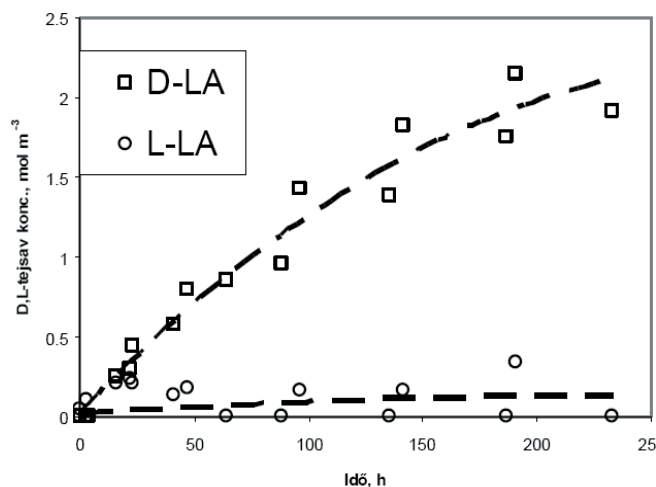
Enantiomerszeparáció pervaporációval, elektrodialízissel: linalol racém elegyhez  $\beta$ -ciklodextrin, optikailag aktív reagenst tettek és pervaporálták az oldatot.<sup>38</sup> A permeátum vizet és a reagenssel komplexet nem képező linalolt tartalmazott. A módszerrel 14 %-os optikai tisztaságú terméket kaptak.

Ionos folyadékot alkalmaztak Miyako és munkatársai<sup>39</sup> ibuprofén racém elegyének elválasztására enantioszelektív enzimikus reakciókkal kombinálva a membrán mindkét oldalán. Az egy lépésben elért optikai tisztaság 25 % volt.

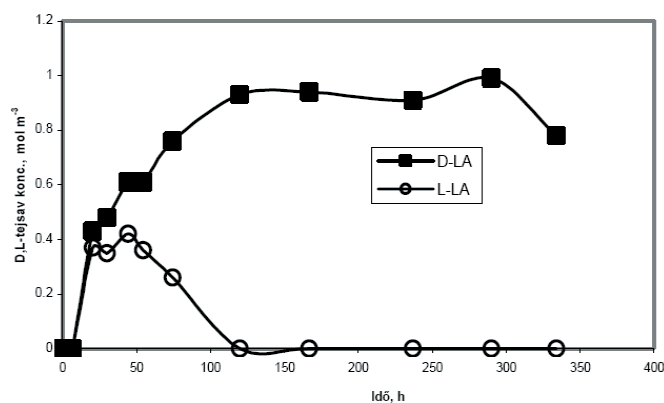
## 6. A tejsav optikailag aktív izomerjeinek elválasztása

A D- és L-tejsav optikai izomerek elválasztását támasztott rétegű folyadékmembránnal, valamint szilárd, optikailag aktív membránnal (pórusos polipropilén kapilláris membránnal és kerámia membránlappal) vizsgálták a

szerzők a PE, Műszaki Kémiai Kutató Intézetben.<sup>19-21,40</sup> Optikailag aktív szelektorként mindkét esetben az *N*-3,5-dinitrobenzoil-L-alanin-oktilésztert választották.



4a. Ábra.



4b. Ábra.

4. Ábra. A tejsav racém elegyének elválasztása membrán technikával

Elválasztás folyadékmembránnal: A szelektort toluolban (néhány esetben 1-oktanolban) oldották, amelyet ultraszűrővel rögzítettek, membránfázisként<sup>21,40</sup> a tartó réteg pórusaiba. Microdyn modul (0,2  $\mu\text{m}$  pórusméretű, 0,04  $\text{m}^2$  felületű, 0,75 m hosszúságú, polipropilén csőmembrán), egy lépésben mintegy 33 %-os optikai tisztaságot kaptak tejsav esetében.<sup>19</sup> Hasonló elválasztást értek el alanin izomerjei elválasztásában. Celgard kapilláris (0,03  $\mu\text{m}$  pórusméretű, 1,4  $\text{m}^2$  felületű és 0,15 m hosszúságú) modul szintén 30-34 % optikai tisztaságot mértek.<sup>20</sup> Ugyanakkor Microdyn kapilláris membrán (0,1  $\mu\text{m}$  pórusméretű, 0,2  $\text{m}^2$  felületű, 0,5 m hosszú membránmodul) nem mutatott mérhető szelektivitást a tejsav optikai izomerjeinek elválasztásában.<sup>21</sup>

Elválasztás királis membránnal: A királis reagens rögzítése mind a Microdyn kapilláris, mind a kerámia membránlap esetében adszorpcióval történt a pórusokba vitt, a szelektort tartalmazó oldatból, a toluol oldószer lassú elpárolgatásával. (A mintegy 3 cm átmérőjű, pórusos kerámia korongot a Pannon Egyetemen készítették<sup>20,21,40</sup>). A kísérletek során még a teljes optikai tisztaság is elérhető volt. A 4a. ábra a kerámia koronggal, míg a 4b. ábra a kapilláris modulal, a permeátum oldalra átjutott optikai

izomerek koncentrációját mutatják be az idő függvényében. Az optikai tisztaság az előbbi esetben elérte a 88 %-ot, míg a polipropilén modul esetében a 100 %-ot. Az ismételt mérések is hasonló eredményeket adtak. Különösen meglepő a 4b. ábrán az L-tejsav koncentrációjának lefutása, nevezetesen, hogy kezdeti növekvő értékről fokozatosan lecsökken az értéke. Az anyagátadás mechanizmusának megállapításához további vizsgálatok szükségesek. Az igen kedvező szelektivitás mellett, a membránon keresztüli anyagtranszport sebessége alacsony,  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  mol/(m<sup>2</sup>h) és az idővel fokozatosan csökken az értéke.<sup>21</sup> A transzport sebesség mintegy egy nagyságrenddel kisebb az optikailag aktív, szilárd membrán esetében a támasztott rétegű folyadékmembránhoz viszonyítva.

## 7. Következtetés

A membrán eljárások ígéretes, technológiai lehetőséget nyújtanak az optikailag aktív enantiomerek hatékony és gazdaságos elválasztására. Számos eljárást vizsgálnak és kapnak a kutatók biztató eredményeket kapnak, de az alkalmazható ipari eljárások kidolgozása még a jövő feladata. A kereskedelemben ma kapható membránmodulok lényegében egy „elméleti tényérszámú” műveleti egységek, amelyek nem biztosítanak egy lépésben megfelelő optikai tisztaságú terméket. Nagyon hosszú kapilláris modullal, az ellenáramot kihasználva, jelentősen növelhető az optikai tisztaság. Valójában a kapható membránmodulok szelektivitásának a növelése a cél, amely kulcsa egyrészt olyan optikailag aktív szelektor(ok) előállítására, amely igen nagy szelektivitást mutat az egyik enantiomerrel szemben, másrészt e szelektor megfelelő rögzítése a porózus membrán belső felületére a szilárd, optikailag aktív membrán kialakítása céljából. Az eddigi eredményekből következik, hogy áttörésre van szükség a racém elegy optikai izomerjeinek elválasztásában a membrán-eljárások technológiai alkalmazásához.

## Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki az Országos Tudományos Kutatási Alapnak (No. 029272 és a No. 063615/06) a kutatási téma pénzügyi támogatásáért

## Hivatkozások

- Maier, N.M.; Franco, P.; Lindner, W. *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 3-33.
- Keurentjes, J. T. F.; Voermans, F. J. M. *In Chirality in Industry*; Collins, A. N.; Sheldrake, G. N.; Crosby, J., Eds.; John Wiley & Sons Ltd., **1997**, pp 157-179.
- Gupta, M.; Mattiason, B. *In Highly Selective in Biotechnology*, Blackie: London, **1994**, pp 7-33.
- Molnar M.; Székely E.; Simandi B; *J. Supercritical Fluids*, **2006**, *37*, 384-389
- Szekely E.; Simandi B.; Fogassy E.; Kemény S.; Kmetz I., *Chirality*, **2003**, *15*, 783-786
- Jacques, J.; Collet, A.; Willen, S. *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*, Wiley-Interscience: New York, **1981**.
- Mulder, M. *Basic principle of membrane technology*, Kluwer: Dordrecht, **1996**.
- Shinohara, K.; Aoki, T.; Oikawa, E. *Polymer* **1995**, *36(12)*, 2403-2405.
- Shinohara, K.; Aoki, T.; Kaneko, T.; Oikawa, E. *Polymer* **2001**, *42*, 351-355.
- Thoelen, C.; De Bruyn, M.; Theunissen, E.; Kondo, Y.; Vankelecom, I. F. J.; Grobet, P.; Yoshikawa, M.; Jacobs, P.A. *Journal of Membrane Science*, **2001**, *186*, 153-163.
- Aoki, T.; Tomizawa, S.; Oikawa, S-E. *J. Membrane Sci.* **1995**, *99*, 117-125.
- Kim, J. H.; Kim, J. H.; Jega, I. J.; Lee, K.H. *J. Membrane Sci.* **2003**, *213*, 273-283.
- Higuchi, A.; Higuchi, Y.; Furuta, K.; Yoon, B. O.; Hara, M.; Maniwa S.; Saitoh M.; Sanui K. *J. Membrane Sci.*, **2003**, *221*, 207-218.
- Higuchi, A.; Hayashi, A.; Kanda, N.; Sanui, K.; Kitamura, H. *J. Mol. Struct.* **2005**, *739*, 145-152.
- Higuchi, A.; Hashimoto, T.; Yonehara, M.; Kubota, N.; Watanabe, K.; Uemiyama, S.; Kojima, T.; Hara, M. *J. Membrane Sci.* **1997**, *130*, 31-39.
- Krieg, H. M.; Breytenbach, J. C.; Keizer, K. *J. Membrane Sci.* **2000**, *164*, 177-185.
- Masawaki, T.; Sasai, M.; Tone, S. *Journal of Chemical Engineering of Japan* **1992**, *25 (1)*, 33-38.
- Masawaki, T.; Matsumoto, S.; Tone, S. *J. Chem. Eng. Jpn.* **1994**, *27 (4)*, 517-522.
- Hadik, P.; Szabó, L. P.; Nagy, E. *Desalination* **2002**, *148*, 193-198.
- Hadik, P.; Kocsis, L.; Eniszné-Bódogh, L.; Szabó, L.P.; Nagy E. *Sep. Purif. Technol.* **2005**, *41*, 299-304.
- Hadik, P.; Szabó, L. P.; Nagy, E.; Farkas, Zs. *J. Membrane Sci.* **2005**, *251*, 223-232.
- Poncet, S.; Randon, J.; Rocca, J. *Sep. Sci. Technol.* **1997**, *32*, 2029-2038.
- Romero, J.; Zydney, A. L. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *77*, 256-265.
- Randon, J.; Garnier, F.; Rocca, J. L.; Maisterrena, B. *J. Membrane Sci.* **2000**, *175*, 111-117.
- Yoshikawa, M.; Yonetani, K. *Desalination*, **2002**, *149*, 287-292.
- Noble, R. D.; Way, J. D. *Liquid membranes: theory and applications*, ACS Symposium Series, ACS, Washington DC, Maple Press Co.: New York, **1987**
- Noble, R. D.; Stern, S. A., *Membrane Separation Technology, Principles and Application*, Elsevier, **1995**
- Keurentjes, J. T. F.; Nabuurs, L.J.W.M., Vegter, E.A., *J. Membrane Sci.*, **1996**, *113*, 351-360
- Dzygiel, P.; Wiczorek, P.; Jonsson, J. A.; Milewska, M.; Kafarski, P. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 9923-9932.
- Armstrong, D.W.; Jin, H. L. *Anal. Chem.* **1987**, *59 (18)*, 2237-2241.
- Pirkle, W. H.; Doherty, E. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4114-4116.
- Nagy, E.; Stelmaszek, J.; Gorska, L.; Ujhidy, A. *MKL* **1991**, *XLVI (9-10)*, 386-389.
- Krieg, H. M.; Botes, A. L.; Smit, M. S.; Breytenbach, J. C.; Keizer K. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *13*, 37-47.
- Westgate, S.; Vaidya, A. M.; Bell, G.; Halling, P. J. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 575-577.
- Bélafiné Bakó, K. *MKL* **2002**, *57 (11)*, 420-442.
- Bélafiné Bakó, K. *MKL* **2005**, *60 (12)*, 425-429.
- Ding, H.B.; Carr, P.W.; Cussler, E.L., *AIChE Journal*, **1992**, *38*, 1493-1498
- Paris, J.; Jouve, C. M.; Nuel, D.; Moulin, P.; Charbit, F. *J. Membrane Sci.* **2004**, *237*, 9-14.
- Miyako, E.; Marnyama, T.; Kamiya, N.; Gato, M., *Chem. Commun.* **2003**, 2926-2927.
- Hadik, P., *Tejsav és optikai izomerjeinek elválasztása membrántechnika segítségével*, PhD disszertáció, PE Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Veszprém, **2007**.

**Separation of optically active compounds: membrane process as promising techniques**

The increasing need for single enantiomers as key intermediates in chemical and pharmaceutical industry has induced a significant demand for efficient processes to resolve racemic mixtures. Apart from other promising concepts, e.g. different chromatographic methods, considerably efforts have been made also on the development of enantioseparation procedures based on membrane processes. Membrane separations often provide opportunities as cost-efficient alternatives to separations of components with similar physical-chemical properties. Technically, membrane separation processes are particularly suited for industrial application as they offer several attractive features as continuous operation mode convenient scale-up, ambient temperature processing, etc. There are two main types of membrane processes for enantioseparations, namely, direct separation on an "intrinsic" enantioselective polymer, or on a non-selective membrane as support porous matrix containing an enantioselective liquid phase. This paper gives a brief overview on different application methods of enantioseparations. Both methods mentioned above are promising processes for enantioseparation, but they are not industrial processes yet. The membrane methods could not provide high enough enantioselectivity in one step. To this purpose more efficient membrane processes and membranes as well as optically

active selectors are needed. There are also several separation processes combined with membrane layer, which might also serve effective industrial process.

The enantioseparation of racemic lactic acid was investigated using *N*-3,5-dinitrobenzoyl-L-alanine as a chiral selector, immobilized into the internal solid membrane interface or dissolved it into the liquid membrane placed into the membrane pores. In the former case, the liquid membrane containing the chiral selector was evaporated from the membrane pores, thus, the selector was deposited as an amorphous, solid layer on the internal membrane interphase. As a support material, among others, polypropylene hollow fiber module with effective membrane area of 0.2 m<sup>2</sup> and standard pore size of 0.1 μm (Microdyn Modulbau GMBH, Wuppertal, Germany) as well as porous ceramic disc with diameter of 3 x 10<sup>-2</sup> m, produced by University of Pannonia (Veszprém, Hungary) were applied adsorbing the selector onto the internal membrane interface. Figures 4a and 4b show that significant enantioseparation could be achieved by both membranes, though the mass transfer rates are rather low. According to the results obtained under batch operation conditions, the enantioseparation process should also work under continuous operational conditions. Taking into account the results obtained by membrane separation of the above racemic mixture, there is a great hope to achieve a breakthrough in its industrial application in the future.

# Enzimkatalitikus reakciók ionos folyadékokban

GUBICZA László\*

Pannon Egyetem, Műszaki Kémiai Kutatóintézet, 8200 Veszprém, Egyetem u. 10.

## 1. Bevezetés

Az 1980-as évek közepének fontos felismerése volt, hogy az enzimek nemcsak vizes oldatokban, hanem szerves oldószerekben is képesek kifejteni hatásukat. Ez az időszak tekinthető a nem hagyományos közegű enzimkatalitikus reakciók vizsgálata kezdetének. Az 1991-ben megjelent „Szerves oldószerekben lejátszódó enzimkatalitikus reakciók” című közleményünkben magyar nyelven elsőként foglaltuk össze az ilyen körülmények között lejátszódó reakciók legfontosabb jellemzőit, s azok a megállapítások a mai napig helytállóak.<sup>1</sup> A tématerület azóta elért jelentős eredményeit több összefoglaló közlemény is taglalja.<sup>2-5</sup>

Az 1. táblázatban az előnyök mellett (egyébként nem minden közleményre jellemző módon) a kétségkívül meglevő hátrányokat is ismertetjük. A felsorolt hátrányok több esetben olyan korlátozó tényezők lehetnek, amelyek gátolhatják az adott területen a továbblépést. A szerves oldószerben kisebb reakciósebesség esetleg növelhető lenne a reakcióhőmérséklet növelésével, ennek viszont gátat szab számos szerves oldószer alacsony forráspontja. A kezdetben „solvent”, később „medium engineering”-nek nevezett kutatási terület képviselőinek így olyan oldószerre volt szükségük, amelyek megtartják a szerves oldószerrel elért kedvező hatásokat, ugyanakkor kiküszöbölik azok hátrányait. Ez az ígéretes új oldószer az az ionos folyadék.

Táblázat. A szerves oldószerekben lejátszódó enzimkatalitikus reakciók előnyei és hátrányai

| Előnyök  | Hátrányok  |
|--|--|
| A szerves szubsztrátumok jobban oldódnak szerves oldószerben, mint vízben. | Csökkenhet a reakciósebesség a szerves oldószerben         |
| Megváltozhat az enzim specifikussága.                                      | A víz aktivitás szabályozására lehet szükség.              |
| A kémiai egyensúly befolyásolható, kedvező irányba tolható el.             | Kétfázisú rendszerekben felületi inaktiválódás léphet fel. |
| Megnőhet az enzimek termikus stabilitása.                                  | A szerves oldószer gyúlékonyak, alacsony a forráspontjuk.  |
| Csökken a mikrobiális elszennyeződés veszélye.                             | A szerves oldószer denaturálhatják az enzimeket.           |

Alkalmazásukkal egyrészt kiküszöbölhető a nagy mennyiségű vegyipari szennyvíz keletkezése, kezelése, tisztítása, másrészt elkerülhető a hagyományos szerves oldószer használatakor keletkező oldószerkeverégek regenerálása, jelentős mennyiségű hőenergiát igénylő desztillálása. Az ionos folyadékok tehát a „zöld kémiának”, a fenntartható fejlődés megvalósításának ígéretes eszközei lehetnek.

## 2. Az ionos folyadékok tulajdonságai

Az ionos folyadékok olyan szerves sók, amelyek szobahőmérsékleten folyékony halmazállapotúak. A hagyományos oldószerektől eltérően, amelyek molekuláris folyadékként jellemezhetők, az ionos folyadékok ionokból állnak. Jóllehet számos ionos folyadék már évtizedek óta ismert, csak az elmúlt néhány évben kerültek a figyelem középpontjába mint a jövőben alkalmazandó, korszerű, környezetbarát reakcióközegek. Ennek a legfőbb oka igen kicsi gőznyomásuk, hőmérsékleti stabilitásuk, valamint az, hogy a kation és az anion megfelelő módosításával széles körben változtathatók bizonyos tulajdonságaik, mint a polaritás, hidrofób jelleg valamint más oldószerrel való elegyedés. Ezen utóbbi tulajdonságuk alapján az ionos folyadékok „tervezhető oldószer”, amelyek sok helyen kiszoríthatják a „hagyományos” szerves oldószerket.

Ilyen területek lehetnek a szerves szintézis, katalízis, biokatalízis, elektrokémiai és szeparációs alkalmazások. Ezekről a lehetőségekről több összefoglaló közlemény is megjelent,<sup>6-8</sup> több hazai kutatócsoport is foglalkozik ionos folyadékok alkalmazási lehetőségeinek, tulajdonságainak megismerésével.<sup>9-11</sup> E tulajdonságok közül a polaritás, a vízzel illetve szerves anyagokkal történő elegyedés a legfontosabb az enzimkatalitikus reakciók szempontjából.

Az ionos folyadékokat általában erősen poláros oldószernek tartják. Az oldószer polaritása (hajlam egy töltés szolvatálására) nehezen megfogható fogalom, melyet nem szabad összetéveszteni a hidrofób jelleggel, ami egy teljesen más tulajdonság. Az oldószer polaritását általában egy festék (olyan anyag, melynek látható tartományban mért elnyelési maximuma az oldószer polaritásától függ) abszorpciós maximuma alapján definiálják, vagy fluoreszcencia vizsgálatot végeznek.<sup>12-13</sup> Az érdeklődési körünkbe tartozó ionos folyadékok, mint a [Bmim]BF<sub>4</sub> (1-butil-3-metil-imidazolium-tetrafluoroborát) polaritása kb. 0,6-0,7 azon a normál polaritás skálán, melyen a tetrametil-szilán polaritása 0, a vízé 1,0.<sup>12</sup> Így az ionos folyadékok polaritása a kis móltömegű alkoholok, illetve a formamid tartományába esik.

Az ionos folyadékok vízzel való elegyedésének mértéke széles skálán mozog és csak nehezen jósolható meg. A [Bmim]BF<sub>4</sub> és a [Bmim]MeSO<sub>4</sub> (1-butil-3-metil-imidazolium-metil-szulfát) elegyednek vízzel, azonban a [Bmim]PF<sub>6</sub> (1-butil-3-metil-imidazolium-hexafluorofoszfát) és a [Bmim]Tf<sub>2</sub>N (1-butil-3-metil-imidazolium-bisz(trifluorometán-szulfonil)imid), melyek polaritása a tetrafluoroborátéval azonos, nem. A víz még a metanollal sem elegyedik molekuláris szinten, hanem inkább fonalakat, fürtöket alkotnak a molekulák. Feltételezik, hogy hasonló eset áll fenn az ionos folyadékok és a víz esetében is.<sup>6, 13, 14</sup>

\* Főszerző. Tel.: +36 88 624 044; fax: +36 88 624 038; e-mail: gubicza@mukki.richem.hu

Az ionos folyadékok szerves oldószerekkel való elegyedési tulajdonságai még nem teljesen ismertek. A szuperkritikus szén-dioxid nem elegyedik [Bmim]PF<sub>6</sub> és [Omim]BF<sub>4</sub> (1-metil-3-nonil-imidazolium-hexafluorofoszfát) ionos folyadékokkal, de igen nagy mennyiségben elnyelődik az ionos folyadék fázisban (akár 0,7 móltörtig is), így kiváló lehetőség nyílik együttes alkalmazásukra, mindkét nem konvencionális közeg előnyeinek együttes kihasználására.<sup>14, 15</sup>

Az ionos folyadékok sokkal viszkózusabbak, mint a hagyományos szerves oldószerek. A [Bmim]BF<sub>4</sub> viszkozitása (19.6 cP 25 °C-on) például hasonló az etilén-glikoléhoz (16 cP 25 °C-on). Ez a viszkozitás sokkal nagyobb, mint a vízé ((0.9 cP), metanolé (0.5 cP) vagy a toluolé (0.6 cP) ugyanezen a hőmérsékleten, és ez az alkalmazás során (pl. oldás, szűrés) komoly nehézséget okozhat, nem is szólva az anyagátadási problémákról. A rövid alkiláncot tartalmazó ionos folyadékok kevésbé viszkózusak, mint a hosszú láncúak.<sup>13, 16, 17</sup>

### 3. Aroma észterek előállítása ionos folyadékokban

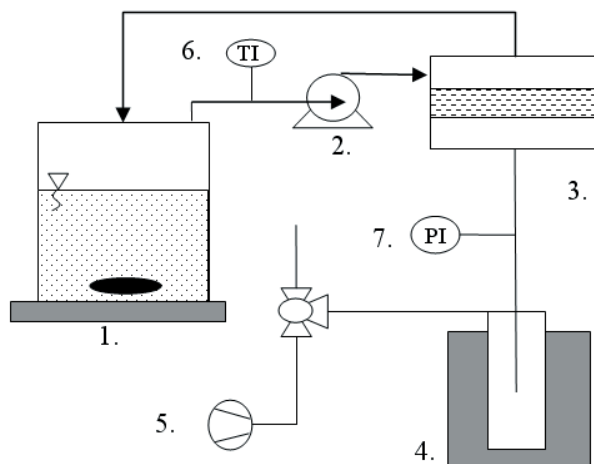
A kis molekulású aroma észterek enzimekatalitikus előállításának alakulása az elmúlt 10-15 évben jól reprezentálja az alkalmazott oldószerek tekintetében végbement változásokat. A legtöbb természetes aroma néhány száz egyedi komponensből tevődik össze, de ez a komplexitás csökkenthető, ha csak a 70-100 „kulcs” komponens, főképp a savakat, alkoholokat és különösen az észtereket vesszük figyelembe.<sup>18, 19</sup> Ezen komponensek szintézise két biotechnológiai módszerre: mikrobiológiai és enzimikus módszerekre választható szét.<sup>20-23</sup>

Szerves közegben végzett enzimikus aromaészter előállításáról beszámoló kísérleti eredményeket az irodalomban találhatunk.<sup>24, 28</sup> A 2-6 szénatomszámú savak és alkoholok nagylaboratóriumi berendezésben történő észterezése NOVOZYM 435 (Novozymes, Dánia) lipáz enzim jelenlétében már jól kidolgozott folyamat.<sup>29</sup> Az észterezési reakció során képződő vizet hetero-azeotróp desztillációval távolítottuk el, n-pentán használva oldószerként. A víztávolítás sebességét úgy szabályoztuk, hogy a reakcióelegy víztartalma állandó, 0.4% maradjon. A reakciósebesség növelésének határt szabott az alkalmazott oldószert, a n-pentán alacsony, 36 °C-os forráspontja. A következő n-alkán homológ, a n-hexán forráspontja viszont 33 °C-al magasabb, 69 °C, ami már meghaladta az enzim optimális működési hőmérsékletét.

Az aroma észterek előállítása területén a következő lépés az oldószertmentes szintézis volt, amikor a reakciót az egyébként reagensként alkalmazott alkohol feleslegében végeztük.<sup>30</sup> Az oldószert hiánya viszont új víztávolítási módszer alkalmazását kényszerítette ki: a víz eltávolítására és a reakcióelegy víztartalmának állandó értéken tartására egy membrános eljárást, pervaporációt alkalmaztunk. Az erre a célra használt berendezés sémája az 1. ábrán látható.

Az oldószertmentes közegben tapasztalt lényegesen kisebb reakciósebesség miatt tértünk át az ionos folyadékok alkalmazására. Ennek eredményeképpen összehasonlítottuk

tudtunk végezni a három különböző rendszer között. Ebben az esetben próbaként az etil-acetát előállítását választottuk etanolból és ecetsavból kiindulva. Ismeretes, hogy ezek a kiindulási anyagok, de különösen az ecetsav, erős enzim inhibitorok, így vizsgálatuk e tekintetben is külön nehézséget jelentett. Valamennyi esetben a legfontosabb paraméter a reakcióelegy vízkiválasztásának állandó értéken tartása, az észterezési reakcióban képződő víz eltávolítása volt, amire különböző megoldásokat alkalmaztunk.



**1. Ábra.** A folyamatos víztávolításra használt pervaporációs berendezés vázlata. 1- Reakcióedény, 2- Szivattyú, 3- Membrán modul, 4- Szárzajeges csapda, 5- Vákuum szivattyú, 6- Termosztát 7- Nyomás ellenőrzés

A három különböző közegben végzett észterezés eredményeit összehasonlítva megállapítható, hogy a reakció valamennyiben végrehajtható. Az értékeléshez nem számszerű adatot használtunk, inkább csak kvalitatív összehasonlításokat végeztük. Kivétel az aktiválási energia, ezek összevetéséből megállapítható, hogy az ionos folyadékokban és a szerves oldószerekben értékük közel azonos (31.4 illetve 31.1. kJ/mol). Az oldószertmentes közegben mért nagy aktiválási energia (52.8 kJ/mol) a magyarázata annak, hogy itt a reakció csak kisebb reakciósebességgel játszódik le.

Az enzim stabilitását illetően szintén az ionos folyadék kapta a legkedvezőbb besorolást, itt a szerves oldószert megelőzi az oldószertmentes közeget. Hasonló a helyzet az enzim visszanyerésénél, a produktivitás vizsgálatok viszont kiemelkedő az ionos folyadékot alkalmazó rendszer előnye. A szabályozhatóság megítélésénél a víz elvétel lehetőségét vettük alapul, s ebben a heteroazeotróp desztilláció illetve az oldószertmentes közegből végzett víztávolítás könnyebben megvalósítható, mint ionos folyadék esetében. Hozzá kell tenni azonban, hogy az ionos folyadék rendkívül drága, ezért az integrált rendszerben egy mindössze 50 cm<sup>3</sup>-es reaktorban dolgoztunk. Léptéknövelés esetében ez a besorolás változhat. Legutoljára hagytuk a toxicitás kérdését. Itt egyértelmű, hogy az alkalmas szerves oldószerek toxikusabbak, mint a feleslegként alkalmazott alkoholok. Az ionos folyadékoknál még nem lehet e kérdésben állást foglalni, ugyanis toxicitásuk vizsgálata most folyik. Néhány anyagra ugyan már ismertek az adatok, ezek kedvezőek (nem toxikusabbak, mint az etanol), de egy általános megfogalmazás még korai lenne.<sup>31, 32</sup>

#### 4. Enzimmkatalitikus enantioszelektív észterezés

Enzimmkatalitikus reakciókhoz feltétlenül célszerű garantáltan állandó minőségű anyagot használni. Kísérleteinkben az IOLITEC GmbH,<sup>33</sup> egy nagy tisztaságú ionos folyadékok előállítására specializálódott vállalkozás termékeit használtuk, ahonnan 99 %-nál nagyobb tisztaságú termékeket bocsátottak rendelkezésünkre.

Az ionos folyadékokban lejátszódó enzimmkatalitikus reakciók közül az enantioszelektív észterezések a leggyakrabban vizsgált típusba tartoznak. Az első megjelent közlemények<sup>34, 35</sup> eredményeit később többen vitatták.<sup>36</sup> Az eltérő megállapítások az ionos folyadékok eltérő előállítási módjára vezethetők vissza. A későbbiekben az eltérések okai tisztázódtak, és különösen az ibuprofén (2-(4-izobutilfenil)propionsav) rezolválása során értek el jelentős eredményeket.<sup>37</sup> Az ionos folyadékokból történő vízelávolítást pervaporációval először csak modell oldatokkal tesztelték,<sup>38</sup> később sav katalizálta észterezéseknél is alkalmazták.<sup>39</sup>

Saját munkáinkban próbaként a racém 2-klór-propionsav enantioszelektív észterezését választottuk, ami *Candida rugosa* (Sigma-Aldrich) lipáz enzim jelenlétében játszódik le. A reakciót korábban már vizsgáltuk szerves oldószerekben, így számos összehasonlítási lehetőségre nyílt módunk.

A reakciót szerves oldószerekben végrehajtva a minták közvetlenül elemezhetők gázkromatográffal 25-m FS-LIPODEX E királis oszlopot alkalmazva (Macherey-Nagel, Aachen, Németország). Az oszlop kiváló elválasztást ad az (R)- és az (S)-észterekre. Az ionos folyadék oldószerek ugyanakkor nem kerülhetnek a GC oszlopra, ezért a reakcióelegyből a komponenseket extrakcióval távolítottuk el.

Munkánk során ionos folyadékokban ([Bmim]PF<sub>6</sub>, [Onim]PF<sub>6</sub>, [Bmim]BF<sub>4</sub>) és összehasonlításként szerves oldószerekben (n-hexán, toluol, tetrahydro-furán) vizsgáltuk a reakciót.<sup>40</sup>

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

| Oldószer              | Log P,-                   | Hozam, % |
|-----------------------|---------------------------|----------|
| [Bmim]BF <sub>4</sub> | -2.44 ± 0.23 <sup>a</sup> | 4.6      |
| [Bmim]PF <sub>6</sub> | -2.38 ± 0.25 <sup>a</sup> | 29.0     |
| [Omim]PF <sub>6</sub> | -2.19 ± 0.24 <sup>a</sup> | 13.4     |
| Tetrahydro-furán      | 0.5 <sup>b</sup>          | 4.3      |
| Toluol                | 2.5 <sup>b</sup>          | 13.9     |
| n-Hexán               | 3.5 <sup>b</sup>          | 36.1     |

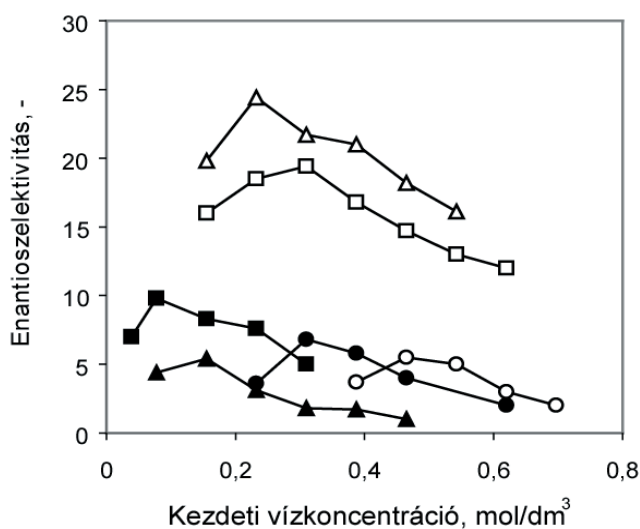
<sup>a</sup> A „rázatott lombikos” módszerrel, általunk meghatározott értékek

<sup>b</sup> Irodalmi adatok

Célunk ezeknek a szerves oldószereknek a kiválasztásával az volt, hogy átfogjuk azt a log P tartományt, amelyben eddigi ismereteink szerint a lipáz enzimek alkalmazhatók voltak. (A log P érték az oldószerhidrofóbicitását jellemzi, az adott oldószer megoszlási hányadosának logaritmusánál n-

oktanol-víz kétfázisú rendszerben). Azt tapasztaltuk, hogy a tetrafluoro-borát aniont tartalmazó, vízzel elegyedő ionos folyadékban csak igen kis sebességgel játszódott le a reakció. Itt is érvényesülni látszott az a jelenség, hogy összefüggés van az enzim aktivitás és az oldószer log P értéke között. Amint a 2. táblázat adataiból látható, az ionos folyadékok log P értéke lényegesen kisebb, mint a szerves oldószereké. Megállapítható az is, hogy ionos folyadékoknál olyan log P értékek mellett is lejátszódik a reakció, amelyeknél szerves oldószerek esetében egyáltalán nem megy végbe, tehát az eddig ismert log P – enzim aktivitás összefüggés ionos folyadékok esetében nem alkalmazható.<sup>41</sup>

A kezdeti víztartalom függvényében mind a reakciósebesség, mindpedig az enantioszelektivitás görbéjén optimum mutatkozott. A 2. ábrán az enantioszelektivitás változását mutatjuk be. Az egyes oldószerekhez tartozó optimális értékek eltérőek, és különbözik egy adott oldószer optimuma a reakciósebesség illetve az enantioszelektivitás tekintetében is.



2. Ábra. A vízkoncentráció hatása az enantioszelektivitásra. (10 % konverzió, 30 °C) ▲ -toluol, ■ -n-hexán, ● -tetrahydro-furán, □-[Bmim]PF<sub>6</sub>, Δ-[Onim]PF<sub>6</sub>, ○-[Bmim]BF<sub>4</sub>

Ez azt jelenti, hogy a legkedvezőbb paraméterek meghatározásánál el kell döntenünk, hogy az aktivitást vagy az enantioszelektivitást szeretnénk optimalni.

Az állandó víztartalmat a reakció során a víz folyamatos, pervaporációval történő eltávolításával kívántuk biztosítani. Az 1. ábrán bemutatott berendezésben a korábban ismertetett ionos folyadék-víz elegyekkel modellkísérleteket végeztünk és meghatároztuk azokat a paramétereket (hőmérséklet, cirkulálási sebesség, vákuum), amely mellett éppen a reakcióban keletkező mennyiségű víz távolítható el. A vizsgált membrántípusok közül a CMC-VP-43 és a PERVAP 1005 bizonyult mind anyagátadási, mind szelektivitási, mind pedig a vegyszerekkel szembeni stabilitás szempontjából alkalmasnak. Az alkalmazott vákuum értékének változtatásával tudtuk szabályozni a vízelvételt és tudtuk elérni, hogy a reakció az optimális víztartalom mellett játszódjon le. Ezzel a módszerrel hatékonyan tudtuk növelni a *Candida rugosa* lipáz termikus stabilitását is.<sup>42</sup>



## 5. Következtetések

Az ionos folyadékok olyan kedvező tulajdonságokkal rendelkező oldószerek, amelyek számos helyen környezetbarát alternatívái lehetnek a jelenleg használt hagyományos szerves oldószereknek. A növekvő felhasználás következtében áruk folyamatosan csökken, és a legújabb generációs termékek már minden környezetvédelmi előírásnak megfelelnek. Az enzimatis reakciók során is alkalmas oldószerek bizonyultak, mert helyettesíthetik a toxikus, alacsony forráspontú gyúlékony szerves oldószereket. Mivel gőznyomásuk elhanyagolható, a reakciót magasabb hőmérsékleten lehet végezni. Számos enzim, elsősorban lipázok magasabb aktivitást és nagyobb szelektivitást mutattak ionos folyadékokban, mint szerves oldószerekben. Az ionos folyadékokat felépítő anionok és kationok összetételének változtatásával az oldószert tulajdonságai tervezhetően változtathatók, ezzel az enzimek szelektivitása is kedvezően befolyásolható. Két, lipáz katalizálta észterezési reakció példáján bemutattuk, hogyan változott az elmúlt évtizedben a nem konvencionális közegben, a víz helyett más, elsősorban szerves oldószert vagy oldószertmentes közeget alkalmazó enzimkatalitikus reakciók végrehajtásának lehetősége az új „zöld” oldószerek, az ionos folyadékok megjelenése és elterjedése következtében a gyakorlati munkáknál. A legújabb vizsgálatok szerint számos olyan ionos folyadék van, amelynek toxicitása nem nagyobb vagy kisebb, mint a leggyakrabban elterjedt szerves oldószereké, így ez az akadály is elhárulni látszik az alkalmazás elől.

## Hivatkozások

- Gubicza, L.; Bodnár, J. *Magy. Kém. Lapja*, **1991**, *46*, 2-6.
- Krishna, S. H. *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 239-267.
- Gupta, M. N.; Roy, I. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2575-2583.
- Torres, S.; Castro, G. R. *Food. Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 271-277.
- Hudson, E. P.; Eppler, R. K.; Clark, D. S. *Curr. Opin. Biotechn.* **2005**, *16*, 1-7.
- Gordon, C. M. *Appl. Catal. A: General*, **2001**, *222*, 101-117.
- Welton, T. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2071-2077.
- Wasserscheid, P.; Keim, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3773-3789.
- Rangits, G.; Kollár, L.; *J. Mol. Cat. A: Chemical*, **2005**, *242*, 156-160.
- Skoda-Földes, R.; Takács, E.; Horváth, J.; Tuba, Z.; Kollár, L. *Green. Chem.* **2003**, *5*, 643-645.
- Fráter, T.; Gubicza, L.; Szöllősy, A.; Bakos, J. *Inorg. Chim. Acta*, **2006**, *359*, 2756-2759.
- Reichardt, C. *Green Chem.* **2005**, *7*, 339-351.
- Park, S.; Kazlauskas, R. J. *Curr. Opin. Biotechn.* **2003**, *14*, 432-437.
- Sheldon, R. A. *Green Chem.* **2005**, *7*, 267-278.
- Gao, L.; Jiang, T.; Guoying Zhao, G.; Mu, T.; Wu, W.; Hou, Z.; Han, B. *J. Supercrit. Fluids*, **2004**, *29*, 107-111.
- Okoturo, O. O.; Vander-Noot, T. J. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *568*, 167-181.
- Pfrender, H.; Jones, R.; Weuster-Botz, D. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 182-190.
- Berger, R.G. *Aroma Biotechnology*, 1st edn. Springer Verlag, Heidelberg, Germany, **1995**.
- Wels, F. W.; Murray, W. D.; Williams, R. S. *Crit. Rev. Biotechn.* **1989**, *9*, 105-169.
- Molinari, F.; Marianelli, G.; Aragozzini, F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 967-973.
- Medeiros, A.B.P.; Pandey, A.; Freits, R.J.S.; Christen, P.; Soccol, C.R. *Biochem. Eng. J.* **2000**, *6*, 33-39.
- Leblanc, D.; Morin, A.; Gu, D.; Zhang, X.M.; Bisailon, J.-G.; Paquet, M.; Dubeau, H. *Biotechnol. Lett.* **1988**, *20*, 1127-1131.
- Rodríguez-Nogales, J. M.; Roura, E.; Contreras, E. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 63-68.
- Dordick, J. S.; Morin, A. *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, *41*, 566-571.
- Wels, F.W.; Williams, R.E.; Dawson, K.H. *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 1679-1682.
- Mestri S.D.; Pai, J.S. *Biotechn. Lett.* **1995**, *17*, 459-461.
- Krisna, H.; Divakar, S.; Prapulla, S. G. *J. Biotechnol.* **2001**, *87*, 193-201.
- Romero, M. D.; Calvo, L.; Alba, C.; Daneshfar, A.; Ghaziasker, H. S. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *37*, 42-48.
- Gubicza, L.; Kabiri-Badr, A.; Keoves, E.; Bélafi-Bakó, K. *J. Biotechnol.* **2000**, *84*, 193-196.
- Ehrenstein, U.; Kabasci, S.; Kümmel, R.; Dörmö, N.; Bélafi-Bakó, K.; Gubicza, L. *Chem-Ing. Techn.* **2003**, *75*, 291-294.
- Garcia, M. T.; Gathergood, N.; Scammels, P. J. *Green Chem.* **2005**, *7*, 9-14.
- Pretti, C.; Chiappe, C.; Pierracini, D.; Gregori, M.; Abramo, F.; Monni, G.; Intorre, L. *Green Chem.* **2006**, *8*, 238-239.
- http://www.iolitec.de.
- Eckstein, M.; Wasserscheid, P.; Kragl, U. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 763-767.
- Schöfer, S. H.; Kaftzik, N.; Wasserscheid, P.; Kragl, U. *Chem. Commun.* **2001**, 425-426.
- Hudson, E. P.; Eppler, R. K.; Clark, D. S. *Current Op. Biotechnol.* **2005**, *16*, 637-643.
- Won, K.; Hong, J.-K.; Kim, K.-J.; Moon, S.-J.: *Proc. Biochem.* **2006**, *41*, 264-269.
- Schäfer, T.; Rodrigues, C. M.; Afonso, C. A. M.; Crespo, J. *Chem. Commun.* **2001**, 1622-1623.
- Izak, P.; Mateus, N. M. M.; Afonso, C. A. M.; Crespo, J. *Sep. Pur. Techn.* **2005**, *41*, 141-145.
- Gubicza, L.; Nemesóthy, N.; Fráter, T.; Bélafi-Bakó, K. *Green Chem.* **2003**, *5*, 236-239.
- Ulbert, O.; Fráter, T.; Bélafi-Bakó, K.; Gubicza, L. *J. Mol. Catal. B. Enzymatic*, **2004**, *31*, 39-45.
- Ulbert, O.; Bélafi-Bakó, K.; Tonova, K.; Gubicza, L.: *Biocatal. Biotrans.* **2005**, *23*, 177-184.

## Enzyme catalytic reactions in ionic liquids

Room temperature ionic liquids are non-volatile, thermally stable and highly polar, moderately hydrophilic solvents. They offer new possibilities for the application of solvent engineering to biocatalytic reactions. Enzymes of widely different types are catalytically active in ionic liquids. Lipases, in particular, maintain their activity in anhydrous ionic liquid media; the enantioselectivity and operational stability are often better than in traditional solvents. The unconventional solvent properties of ionic liquids have been used in biocatalyst recycling and product recovery systems that are not feasible with traditional solvents.

It was found that esterification of short-chain alcohols and acids can be realised not only in common organic solvents and in solvent-free media (in excess of alcohol) but in ionic liquids, too; using Novozyme 435® lipase high yields was achieved under optimal conditions. Water produced during the reaction was successfully removed by a pervaporation unit and the water content of the reaction mixture was kept constant.

*Candida rugosa* lipase has shown to retain catalytic activity in ionic liquids. In our work, the activity of this enzyme in the esterification of 2-substituted-propanoic acids and 1-butanol was compared in ionic liquids and organic solvents. The role of

solvent hydrophobicity ( $\log P$ ), water content and the effect of substituents were evaluated. Optimal water concentration in the reaction media was determined, where the enzyme shows maximal activity. Contrary to reactions in common organic solvents, there was no need for purification steps following the reaction in ionic liquids in order to recycle the enzyme. In 1-butyl-3-methylimidazolium-hexafluoro-phosphate ([Bmim]PF<sub>6</sub>) and 1-methyl-3-nonyl-imidazolium-hexafluoro-foszfát ([Omim]PF<sub>6</sub>) ionic liquids, *Candida rugosa* lipase could be recycled five times without appreciable activity loss.

This work has shown that a variety of enzymes, particularly those that tolerate conventional organic solvents, are eminently capable

of performing in ionic liquids. Activities are generally comparable with or higher than those observed in conventional organic solvents. Furthermore, enhanced thermal and operational stabilities have been observed. Ionic liquids may be a key technology to enable such reactions to work efficiently. Improvements in product isolation are essential, especially for polar non-volatile materials. The efficient reuse and purification of ionic liquids, the possibility of using other ionic liquids bearing 'greener' anions and a reduction in the cost factor of the ionic liquids are further important issues to be considered for their industrial applications in the future. The results reported here clearly demonstrate that enzyme catalysis in ionic liquids containing systems is an exciting and burgeoning research area, which holds tremendous potential of opening up a new field of nonaqueous enzymology.

# Mikroszemcsés bovin szérum albumin előállítása kéméletes szárítással

TÓTH Judit<sup>a\*</sup> és PALLAI-VARSÁNYI Erzsébet<sup>b</sup>

<sup>a</sup> MTA Kémiai Kutató Központ, Anyag- és Környezetkémiai Intézet, Pusztaszeri út 59-67., H-1025 Budapest, Magyarország

<sup>b</sup> Pannon Egyetem Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Egyetem utca 2., H-8200 Veszprém, Magyarország

## 1. Bevezetés

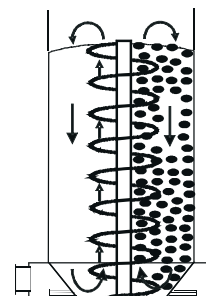
A peptid és fehérje hatóanyagot tartalmazó gyógyszerek jelentősége növekvő tendenciát mutat a biotechnológia gyors fejlődésének köszönhetően.<sup>1</sup> Ezen a területen fontos feladatot jelent a megfelelő tulajdonságokkal rendelkező fehérje porok előállítása, mint például a hatóanyagok inhalációs, tüdőn keresztüli bevitelére alkalmas szerformátumok kifejlesztésénél.<sup>2</sup> Az ilyen típusú hatóanyagok előállítása során különös figyelmet kell fordítani a biológiai hatékonyságot meghatározó kémiai és fizikai jellemzők, a biológiai hatékonyság megőrzésére. A biológiai hatékonyság szempontjából meghatározó lehet a kinyert fehérje porok szemcsemérete is: gyakori követelmény a 10 µm alatti átlagos szemcseméret biztosítása.<sup>3</sup> Megfelelő minőségű finomszemcsés termék nyerése érdekében, különösen hőérzékeny anyag esetében, döntő fontosságú az alkalmas szárítási eljárás megválasztása. Fehérjék szárítására általában a fagyasztva szárítást, a liofilizálást alkalmazzák.<sup>4</sup> A hosszú száradási idő, a jelentős költségigény, továbbá a szárítás folyamán előálló fehérje instabilitási problémák miatt egyéb szárítási módok, mint például a porlasztva<sup>5</sup> - ill. porlasztva-fagyasztva szárítás<sup>6</sup> kerültek előtérbe, de a szigorú követelményeket kielégítő, megfelelő minőségű és szemcseméretű fehérje porok előállítása még továbbra sem tekinthető megoldottnak. A fluidizált rétegű, intenzív gáz-szilárd érintkezést biztosító eljárások előnyösen alkalmazhatóak ugyan hőérzékeny anyagok kéméletes szárítására, azonban a 10 µm körüli szemcseméret tartományban (Geldart C csoport)<sup>7</sup> nem tartható fenn a finomszemcsés termék állandósult fluidizációs mozgásállapota. A probléma megoldását jelentheti az inert töltet szemcsék felületén megvalósított szárítás, például, gejzír-rétegű szárítóban.

### 1.1. Szárítás inert töltet szemcsék felületén

Hőérzékeny anyagokat tartalmazó oldatok vagy nagy nedvességtartalmú szuszpenziók nedvességének elvonása meglehetősen nehéz feladat. Nagy hő- és anyagátadási felületek biztosítása szükséges a rövid száradási idő, valamint a megengedett, viszonylag alacsony szárítási hőmérséklet eléréséhez. Ilyen jól szabályozható szárítási körülmények biztosíthatók a belső szállítócsigával ellátott mechanikus gejzír-száritóban, az ún. MGSZ-berendezésben. Eltérően a hagyományos gejzír elven működő szárítóktól, ahol a szemcsemozgást a megfelelő levegőáram biztosítja, az MGSZ-száritóban a szemcseréteg cirkulációját a szárító függőleges tengelye mentén beépített, ház nélküli szállítócsiga tartja fenn, ezáltal a szárítólevegő térfogati sebessége a szárítás igényének megfelelően választható. A felmelegített levegő a szárító kúpos alján, réseken keresztül,

tangenciális irányítottsággal lép be jelentős sebességgel. E térrészben intenzív a gáz-szilárd fázisok érintkezése, ennek következtében a száradás lényegében a kúpos szárítóaljban megy végbe. Inert töltetet alkalmazva nagy nedvességtartalmú, hőérzékeny anyagok kéméletes szárítása valósítható meg.<sup>8</sup>

A szárítóban cirkuláló réteg három jellegzetes zónából áll: az említett, intenzív szemcsemozgással jellemezhető ún. „szárítási zónából”, a tömörebb „csúszó rétegű körgyűrűt alkotó térrészből”, amelybe beporlasztva a nedves anyagot, a cirkuláló inert szemcsék felületén kialakul egy filmszerű bevonat, valamint a „koptatási zónából” a szállítócsiga forgási terében (1. Ábra).



1.Ábra Az inert töltetes mechanikus gejzír-száritó berendezés vázlata.

Ez utóbbi térrészben megy végbe a megszáradt bevonat lekopása az inert szemcsék felületéről, majd a száraz, porszerű termék a távozó levegővel együtt hagyja el a szárítót. A száradási idő a szárítólevegő sebességén és hőmérsékletén kívül jelentős mértékben az inert szemcsék felületén kialakult bevonat vastagságával<sup>9</sup> befolyásolható. Feltételezve, hogy a filmszerű bevonat száradása során a diffúziós ellenállás lényegében elhanyagolható, a száradás mintegy állandó sebességgel, viszonylag alacsony hőmérsékleten (a nedves hőmérő hőmérsékletén) valósulhat meg. Figyelembe véve ezen eljárás előnyeit, beleértve a széleskörűen és egyszerűen megvalósítható szabályzási lehetőségeket is, a szárítási kísérleteknél az inert töltetes gejzír eljárást alkalmaztuk.

Munkánk célja volt hőérzékeny, bovin szérum albumin (BSA) fehérje száradási folyamatának vizsgálata laboratóriumi méretű inert töltetes mechanikus gejzír-száritóban. Aközelebbi cél mikroszemcsés ( $d_v < 10 \mu\text{m}$  átlagos szemcseméretű) fehérje-por előállítása kizárólag BSA-t, valamint poli(etilén-glikol) adalékanyagot ( $M_w = 6000$ , PEG 6000) is tartalmazó oldatokból, az oldható fehérjetartalom megőrzésével. Aszáradást megelőző műveletekben alkalmazott

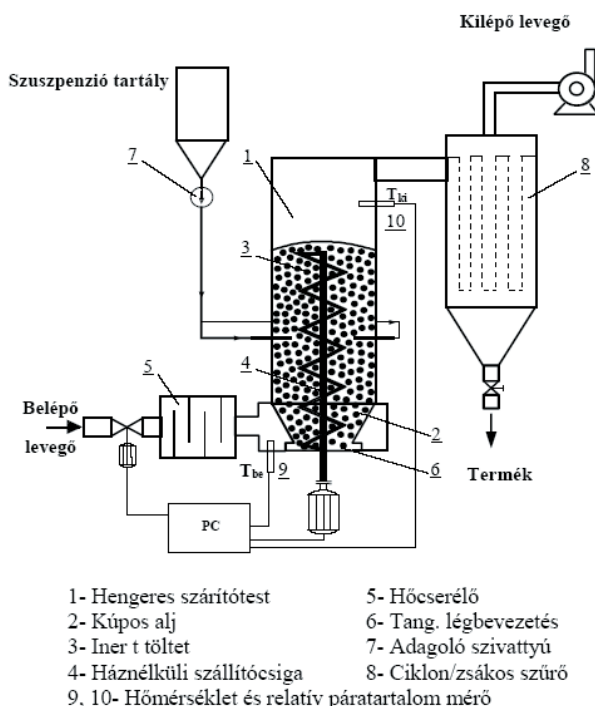
\*Tóth Judit. Tel.: +36 (88) 62-4032; fax: +36 (88) 62-4038; e-mail: toth@mukki.rchem.hu

segéd- és adalékanyagok hatással lehetnek a szárított termék minőségére. A fehérjék tisztítására, elválasztására használt PEG, például, szennyezőként jelenhet meg a szárítandó fehérjeoldatokban, szuszpenziókban.<sup>10</sup> Másrészt irodalmi adatok alapján fizikai adszorpcióval, vagy kovalens kötéssel a fehérjékhez kapcsolódó poli(etilén-glikolok) visszatartó hatást gyakorolhatnak a fehérjék felszabadulására kompozitjaikból.<sup>11</sup> A vizsgálatok kiterjedtek a meghatározó műveleti paraméterek, valamint a PEG adalékanyag által a szemcseméretre, a fehérjetartalomra, illetve a szárítmány nedvességére gyakorolt hatás tanulmányozására.

## 2. Kísérleti rész

### 2.1. Szárítási kísérletek

A saját fejlesztésű laboratóriumi méretű inert töltetes mechanikus gejszárító két fő részből áll, egy 90 mm belső átmérőjű, 500 mm hosszúságú hengeres elemből, és egy 55 mm-re szűkülő, 75 mm hosszú kúpos készülékalkaljból. A belső szállítócsiga átmérője (35 mm) megfelelt a hagyományos szárítóban a légbevezető fűvókán keresztül nagy sebességgel belépő levegősugár által kialakított ún. „gejszárító gázcsatorna” méretével. A szárítási kísérletek során a készülékalkaljból réseken keresztül, tangenciális irányítottággal bevezetett szárítólevegő áramlási sebességét mérőperemmel, a felmelegített levegő hőmérsékletét belépéskor, valamint a kilépésnél NiCr-Ni termoellemmel mértük. A gejszárítórendszer vázlata a 2. Ábrán látható. Inert töltetként egyenként 7,6 mm átmérőjű, 2300 g össztömegű paraformaldehid anyagú szemcsét használtunk. A BSA-oldatot a szárító két oldalán porlasztottuk be a csúszo rétegű tömörebb rétegzónába perisztaltikus szivattyú segítségével. A szárítóból a levegőárammal kilépő száraz, mikroszemcsés BSA porterméket ciklonon, majd sűrűszövésű porzsákon átvezetve nyertük ki. A hőmérséklet és a levegőáram szabályozása számítógéppel történt.



2. Ábra. Az inert töltetes, mechanikus gejszárítórendszer vázlata.

A szárítási kísérletekhez felhasznált bovin szérum albumint (98%) a Sorachim, a PEG 6000-t pedig a Fluka cégtől szereztük be. A szárítási kísérletekhez a  $c_{BSA} = 40$  g/l koncentrációjú BSA-oldatok kétszer desztillált vízzel készültek. A PEG tartalmú BSA-oldatok előállítására céljából számított mennyiségű szilárd PEG 6000-t adtunk a 40 g/l koncentrációjú BSA oldatokhoz. A szárítási kísérletek során minden alkalommal 240 ml oldatot porlasztottunk a cirkuláló inert szemcsék felületére  $q = 3$ , illetve 4 ml/perc adagolási sebességgel. A szemcsék cirkulációs idejét ( $\tau_c$ , a szárítóban egyszeri teljes cirkuláció megtételéhez szükséges időt), valamint a szárítási időt ( $\tau_{sz}$ ) is meghatározó szállítócsiga kerületi sebességét  $N_{cs} = 0,39 - 0,96$  m/s tartományon belül változtattuk. A különböző hőmérsékleteken belépő szárítólevegő hatásának vizsgálata céljából a kísérleteket  $T_{be} = 40, 60, 80$  és  $100$  °C hőmérsékleteken végeztük.

### 2.2. Mérési és értékelési módszerek

A szárítmány átlagos szemcseméretét Malvern-2600 típusú, lézerfény diffrakció elvén működő analizátorral határoztuk meg. A porszerű szárítmányt az analízist megelőzően diklórometánban diszpergáltuk, a szemcseméret jellemzésére a térfogati átlagméretet,  $d_v$  adtuk meg. A szárítmány nedvességét ( $M_{szn}$ , m/m%) vákuumszárítóban,  $30$  °C hőmérsékleten, 6 órányi szárítás után tömegméréssel határoztuk meg. Az oldható fehérjetartalom meghatározásához adott mennyiségű szárítmányt oldottunk kétszer desztillált vízben. Az oldhatatlan maradékot (20 perc, 6000 ford./perc) Janetzky T-30 típusú centrifugában választottuk el. A visszaoldható fehérje tartalmat a felülúszóból spektrofotometriás módszerrel, Biochrom 4060 típusú készüléken  $280$  nm-nél mért abszorbancia érték alapján határoztuk meg. A szárítás során megőrzött fehérje tartalmat a szárítmány mért m/m%-os oldható fehérje tartalmával ( $c_{BSA,sz}$ ) fejeztük ki.

### 2.3. Kísérleti eredmények

Az inert töltet szemcsék felületén kialakult bevonat száradási ideje nagymértékben függ a bevonat vastagságától,<sup>12</sup> mely optimális esetben kisebb, mint  $20$   $\mu\text{m}$ . A bevonat vastagság megfelelő értéken tartásával a száradási időn kívül a szárítmány szemcsemérete, valamint nedvessége is befolyásolható. Fontos szempont továbbá, hogy az inert tölteten megvalósított szárítási részfolyamatok, vagyis a bevonási, szárítási és a kopatási részfolyamatok egyetlen cirkulációs periódus alatt teljes mértékben végbemenjenek. Ennek érdekében a műveleti paramétereket, elsősorban az adagolási sebességet, a szemcsék cirkulációs idejét, valamint a kopatást össze kell hangolni. A műveleti paraméterek hatását a szárítvány szemcseméretére ( $d_v$ ), a nedvességére ( $M_{szn}$ ) és az oldható fehérjetartalomra ( $c_{BSA,sz}$ ) vonatkozóan az 1. Táblázatban mutatjuk be.

Az a, b, és c mérésekben a belépő levegő hőmérséklete  $40$  °C volt, míg a szállítócsiga forgásebességét  $0,39 - 0,96$  m/s kerületi sebességek tartományában változtattuk. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a szállítócsiga forgásebességének csökkentésével (a cirkulációs, valamint a szárítási idők növelésével) jól látható mértékben csökken a szemcseméret. A száradási idő növelésével ugyanis a bevonat egyre jobban kiszárad, ami pedig a kopás hatékonyságát segíti elő, így az inert szemcséket beborító megszáradt bevonat teljes mértékben lekopik, egyre finomabb szemcséjű

1. Táblázat. Szárítási kísérletek és eredmények.

| No             | $T_{br}$<br>°C | $T_{ki}$<br>°C | $N_{cs}$<br>m/s | $\tau_c$<br>s | $\tau_{sz}$<br>s | $d_v$<br>µm | $M_{szn}$<br>m/m% | $c_{BSA,sz}$<br>m/m% |
|----------------|----------------|----------------|-----------------|---------------|------------------|-------------|-------------------|----------------------|
| a <sup>1</sup> | 40             | 22.2           | 0.96            | 44.1          | 8.8              | 77.85       | 5.07              | 87                   |
| b <sup>1</sup> | 40             | 20.3           | 0.52            | 49.0          | 9.8              | 32.80       | 5.15              | 84                   |
| c <sup>1</sup> | 40             | 24.2           | 0.39            | 55.1          | 11.0             | 21.92       | 5.20              | 86                   |
| d <sup>2</sup> | 40             | 25.2           | 0.52            | 49.0          | 9.8              | 18.45       | 5.15              | 84                   |
| e <sup>2</sup> | 60             | 38.3           | 0.52            | 49.0          | 9.8              | 15.40       | 4.46              | 93                   |
| f <sup>2</sup> | 80             | 50.7           | 0.52            | 49.0          | 9.8              | 16.99       | 4.37              | 91                   |
| g <sup>2</sup> | 100            | 70.0           | 0.52            | 49.0          | 9.8              | 8.55        | 2.37              | 97                   |

<sup>1</sup> q = 4,5 ml/perc, <sup>2</sup> q = 3 ml/perc

termék keletkezése közben. A legnagyobb szállítócsiga forgássebesség (0,96 m/s) mellett a cirkulációs, illetve a száradási idő olyan mértékben csökken, hogy a bevonatnak csak a felületi rétege szárad le a kopáshoz szükséges nedvességtartalomra, vagyis a bevonat nem kopik le teljesen. Ennek megfelelően a következő periódusban a szemcsére rávitt újabb nedves bevonattal a vastagság tovább növekszik. Az egyre növekvő szemcseméret, valamint a rétegmagasság folyamatos növekedése jelzi, hogy az ismertetett részfolyamatok összehangolása utóbbi esetben nem valósult meg.

Az inert szemcsék felületén kialakult bevonat vastagság ellenőrzésére az 1. Táblázatban megadott kísérleti körülmények figyelembevételével számítást végeztünk. A szárító jellemző méretadatain kívül két jellegzetes paraméter értékkel, azaz a szállítócsiga forgássebességének  $n_{cs} = 4,7 \text{ s}^{-1}$  adatával, valamint az adagolási sebesség  $q = 4,5 \text{ ml/perc}$  (azaz  $7,5 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) értékével számoltunk. A nedves filmszerű bevonat vastagságának átlagos értéke,  $\delta$  a következő összefüggéssel számítható:

$$\delta = q / Q_{cs} \omega$$

ahol  $q$  a fehérje oldat adagolási sebessége,  $Q_{cs}$  a belső szállítócsiga szállítási sebessége,  $\omega = 6/d_i$  az inert szemcsék fajlagos felülete,  $d_i = 7,6 \cdot 10^3 \text{ µm}$  pedig az inert szemcsék átlagos átmérője. A szállítócsiga kísérleti úton meghatározott szállítási sebessége  $Q_{cs} = 1,66 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ . Az ismertetett adatokkal a számított bevonat vastagság 5,94 µm-nek adódott.

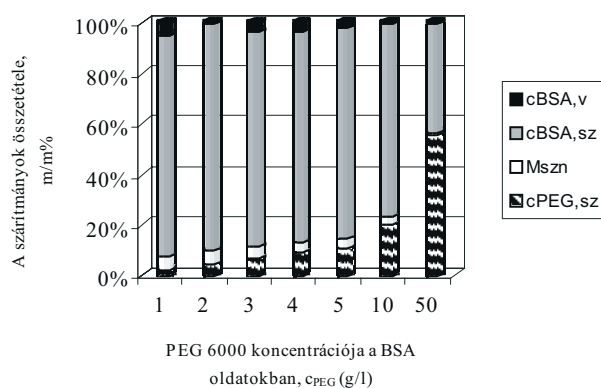
A d, e, f és g kísérleteket állandó szállítócsiga forgássebesség és fehérje-oldat adagolási sebesség mellett, de változó levegő hőmérsékletek (40, 60, 80 és 100 °C) alkalmazásával végeztük. Az adatokból látható, hogy a szárítvány nedvessége döntően a szárítólevegő hőmérsékletétől függ. Az eredmények azt mutatják, hogy a hőmérséklet növekedésével csökken a szemcseméret és a fehérje portermék nedvességtartalma is. A megfelelően megválasztott műveleti körülmények eredményeképpen a szárított termék szemcsemérete a g mérés esetében 10 µm alá csökkent.

Hőérzékeny fehérjék szárítását követően igen fontos a szárított termék kémiai stabilitásának vizsgálata. Ennek jellemzésére szolgálhat a szárítvány oldható fehérje tartalmának meghatározása ( $c_{BSA,sz}$  adatok az 1. Táblázatban).

A kapott eredmények, miszerint az alacsony szárítási hőmérséklet mellett előállított fehérje szárítványokban a megőrzött, oldható fehérjetartalom kisebb (< 90 %), mint a magasabb hőmérsékleten szárított termékek esetén (> 90 %), bizonyos fokig meglepőek. Figyelembe véve azonban, hogy a stabilitást a hőmérsékleten kívül a termék nedvességtartalma is befolyásolhatja (100 °C alatt végzett szárítás esetén 3 % alatti érték), az eredmények magyarázhatóak. Az oldható fehérje megőrzése a szárítás folyamán függ a szemcsék tartózkodási idejétől a szárítási zónában, vagyis a szárítási időtől ( $\tau_{sz}$ ). Az inert szemcsékből álló rétegben az igen nagy gáz-szilárd érintkezési felületnek és a filmszerű bevonatnak köszönhetően a száradási idő igen rövid, még az alacsony, a nedves hőmérsékletének megfelelő hőmérsékleten is. A szárítási zóna felett, a szállítócsiga forgásterében a száraz bevonat hőmérséklete jó közelítéssel azonos a kilépő levegő hőmérsékletével. A d – g kísérletekben – így a 100 °C belépő levegő hőmérséklet mellett is – a tartózkodási idő a szárítási zónában, igen rövid, 9,8 s. Fontos azonban megemlíteni, hogy a visszaoldott fehérjetartalom nem ad információt a makromolekula szerkezetében esetleg végbemenő változásokról.

#### Szárítási kísérletek PEG 6000 adalékanyag alkalmazásával

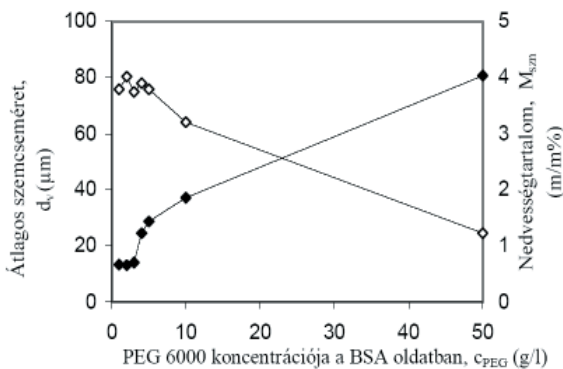
A PEG tartalmú BSA oldatokból kiinduló szárítási kísérletek körülményei megegyeztek az 1. Táblázatban feltüntetett e mérés körülményeivel, azzal a különbséggel, hogy a BSA oldatokhoz a szárítást megelőzően, különböző mennyiségű PEG 6000-t adtunk,  $c_{PEG} = 1, 2, 3, 4, 5, 10$  és 50 g/l PEG koncentrációk beállítására. A kísérleteket 60 °C hőmérsékletű szárítólevegővel végeztük, tekintettel a PEG 6000 olvadáspontjára (55-60 °C). A szárított termékek összetételét az egyes alkotók tömegarányának százalékában adtuk meg: polimer ( $c_{PEG,sz}$ ), oldható albumin ( $c_{BSA,sz}$ ), nedvesség ( $M_{szn}$ ) és a fehérje veszteségként jelentkező, vissza nem oldható fehérje ( $c_{BSA,v}$ ) alkotja a szárítványt. Ez utóbbi érték számítható az előző három paraméter ismeretében. A termékek összetételének alakulását a kiindulási oldatok PEG tartalmának függvényében a 3. Ábrán mutatjuk be.



3. Ábra. A termék összetételének változása a BSA oldathoz adott PEG 6000 mennyiségének függvényében.

A szárítás során végbemenő nedvességelvonás és/vagy hőhatás a fehérje szerkezetében változást idézhet elő, végbe mehet a fehérje irreverzibilis koagulációja, melynek következtében az albumin visszaoldása már nem lehetséges. A 3. Ábra adatai alapján a vissza nem oldható fehérjetartalom a szárítványokban 5 % alatt maradt, tehát a fehérje csak nagyon kissé megmaradt.

szenvedett, ill. a fehérjetartalom teljes mértékben visszaoldható volt. A termékek nedvességtartalma viszont jelentősen függ az oldatok kezdeti polimer tartalmától. A szemcseméret és a nedvességtartalom változását együtt mutatjuk be a 4. Ábrán. E két paraméter különösen a fehérjetartalom 10 %-ának megfelelő 4 g/l koncentrációtól kezdődően változik jelentősen. E koncentráció alatt (pl.  $c_{PEG} = 3$  g/l mind a szemcseméret ( $d_v = 14,08 \mu\text{m}$ ), mind pedig a nedvességtartalom ( $M_{szn} = 3,75$  m/m%) jó egyezést mutat az 1. Táblázatban rögzített, kizárólag BSA-t tartalmazó oldattal végzett e kísérlet szemcseméret és nedvességtartalom értékeivel, vagyis ilyen alacsony PEG koncentráció tartományban az adalékanyag nem befolyásolja jelentősen sem a szemcseméretet, sem a szárítmány nedvességtartalmát. A PEG-tartalom növelésével, 4g/l koncentráció felett azonban 10g/l koncentrációig gyorsabb, tovább növelve a PEG koncentrációt lassabb, de folyamatos nedvességtartalom csökkenés következik be.



4. Ábra A hozzáadott PEG 6000 mennyiségének hatása a termék szemcseméretére ( $\blacklozenge$ ),  $d_v$  ( $\mu\text{m}$ ) és nedvességtartalmára ( $\diamond$ ),  $M_{szn}$  (m/m%).

Hasonló, de ellentétes irányú a szemcseméret változása, amely 80  $\mu\text{m}$ -nél magasabb értéket ér el  $c_{PEG} = 50$  g/l koncentrációnál. A szemcseméret és a nedvességtartalom változásokat követve, a szárítási gyakorlatban szokatlan eredményt kaptunk. A bevonat vastagság növekedése, amely feltehetően a PEG koncentráció növekedésével esetünkben is bekövetkezik, általában együtt jár a szemcseméret, valamint a nedvességtartalom növekedésével. Az eredmények feltehetően a következő megmondolások alapján értelmezhetők. A PEG 6000, mint jó kiszóó anyag kis koncentrációban ( $c_{PEG} < 4$  g/l), jelen körülmények között nem fejt ki hatását. Növelve a PEG koncentrációt, megkezdődik a fehérje molekulákból a vízmolekulák "kiszorítása", hozzájárulva a rétegen átáramló levegő szárító hatásához. Ez azt jelenti, hogy a nedvességelvonás PEG kiszóó anyag jelenlétében gyorsabb, mint a nélkül. Ennek eredményeképpen valóban nedvességtartalom csökkenés következhet be a PEG koncentráció növelésével. A szemcseméret növekedés a fehérje és a kisebb méretű PEG molekulák összekapcsolódásával, a PEG molekuláknak a fehérje molekulákba való beépülésével magyarázható.

A vizsgálatok azt mutatják, hogy a fehérjéhez képest nagyobb mennyiségű (több mint 10 %) PEG 6000 használata esetén a termék nedvesség tartalma és szemcsemérete jelentős mértékben eltérhet az adalék nélküli, 60 °C-on történő szárítás eredményeihez képest. Viszont a visszaoldható fehérjetartalom a polimer jelenlétében, annak arányától függetlenül, még kedvezőbb értékeket is mutat. PEG jelenléte a termékben elősegíti a nem vizes közegű további

felhasználások esetén a fehérje diszpergálhatóságát és stabilitását szerves oldószerekben, mint például polimer-protein társított rendszerek előállításánál szabályozott hatóanyag leadás céljából.

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők a kísérleti munkákat a GVOP-3.1.1.-2004-05-0031/3.0 sz. pályázat pénzügyi támogatásával végezték.

### Hivatkozások

- Orive, G.; Hernandez, R. M.; Gascon, A. R.; Dominguez-Gil, A.; Pedraz, J. L. *Curr. Opin. Biotech.* **2003**, *14*(6), 659-664.
- Suihko, E. J.; Forbes, R. T.; Apperley, D. C. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *25*(1), 105-112.
- Okamoto, H.; Todo, H.; Iida, K.; Danjo, K. *Powder Science and Technology in Japan* **2002**, *20*, 71-83.
- Wang, W. *Int. J. Pharm.* **2000**, *203*, 1-60.
- Maa, Y.-F.; Nguyen, P.-A.; Andya J. D.; Sweeney, T. D.; Shire, S. J.; Hsu, C. C. *Pharm. Res.* **1998**, *15*(5), 768-775.
- Mumenthaler, M.; Leuenberger, H. *In. J. Pharm.* **1991**, *72*(2), 97-110.
- Jono, K.; Ichikawa, H.; Miyamoto, M.; and Fukumori, Y. *Powder Technol.* **2000**, *113*, 269-277.
- Szentmarjay, T.; Pallai, E.; Szalay, A. *Drying Technol.* **1995**, *13*(5-7), 1203-1219.
- Szentmarjay, T.; Szalay, A.; Pallai, E.; Bencze, T.; Vass, T. *Drying Technol.* **1996**, *14*(3-4), 501-512.
- Ingham, K. C. *Method Enzymol.* **1990**, *182*, 301-306.
- Vert, M.; Domurado, D. *J. Biomat. Sc.-Polym. E.* **2000**, *11*(12), 1307-1317.
- Szentmarjay, T.; Pallai, E.; Regényi, Zs. *Drying Technol.* **1996**, *14*(9), 2091-2115.

### Formation of bovine serum albumin microparticles by gentle drying

The aim of this study was to investigate the drying process of bovine serum albumin (BSA) in a laboratory scale mechanically spouted bed dryer for production of protein powders with a mean particle size of  $d_v < 10 \mu\text{m}$  and to preserve the protein content. Different solutions of BSA with and without excipient (polyethylene glycol,  $M_w = 6000$ , PEG 6000) were dried on inert particles to study the effect of process parameters and of excipient on the quality of the product.

The moisture removal of heat sensitive materials is rather difficult. Intensive, well controlled heat and mass transfer can be carried out in the so called „Mechanically Spouted Bed” (MSB) dryer in which the particle recirculation is ensured by an inner vertical houseless conveyor screw, as it can be seen in Fig. 1. By using inert packing, heat sensitive materials of high moisture content can be advantageously dried during very short time. In the MSB dryer the drying process is performed in a film-like thin layer formed on the surface of inert packing. Due to the large contact surface provided by the inert particles the heat and mass transfer processes of drying are very short (few seconds) even at relatively low wet bulb temperature. Therefore the moisture diffusion resistance in the very thin film-like coating can be considered negligible and the drying proceeds at „quasi constant” rate. This assures a very gentle drying, as well.

Protein requires special consideration in formulation since their biological efficiency tightly depends on their chemical and physical structure. Polyethylene glycols with different molecular weights

are favourable salting-out agent for separation and purification of proteins. The product gained by this method can contain in lower or higher ratio residual polyethylene glycol which can influence the further processes (e. g. the drying step) and the final solid properties. Polyethylene glycol was selected as an excipient and added to the BSA solutions to be dried. The effect of the used PEG on the characteristics of the protein powder was investigated and compared with the results obtained with pure BSA.

The drying experiments were performed in an MSB-dryer with inert particles of laboratory size (See Fig. 2.). The dried product was characterized by the volume mean particle size ( $d_v$ ), the residual moisture content ( $M_{szn}$ , m/m%) and the protein preservation was expressed as the mass ratio of the soluble protein content in the dried product ( $c_{BSA,sz}$ ).

To achieve a favorable drying time the thickness of the coating have to adjust to an optimum value. The thickness of the coating affects not only the drying time, hereby the final moisture content, but also the final particle size of the dried product. The thickness of the coating can be regulate by the circulation rate of inert particles (by adjusting the rotation speed of the screw) and the feeding rate of the suspension. In our experiments the height of the inert particles and the inlet air flow were kept constant. The influence of the other process parameters on the main particle size and residual moisture content of the dried product, as well as the protein content preservation are shown in Table 1., in case of pure BSA solutions. The BSA concentration of the solutions was 40 g/l in each case, the feeding rate was  $q = 4.5$  or  $3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  in runs **a** – **c** and **d** – **g**, respectively. It was found that the particle size particularly decreased by decreasing the rotation speed, but there is not much difference between the residual moisture content of these products (samples **a-c**).

To check the thickness of the coating under the experimental conditions demonstrated in Table 1. calculation was made on the basis of the equation. The thickness of the coating,  $\delta$  was found of  $5,94 \mu\text{m}$ .

The experiments were carried out in four different inlet air temperatures, samples **d-g**. It was found that the final moisture content depends considerably on the air temperature but it can be

hardly influenced by the mentioned other process parameters. This result is not so surprising since the temperature has in addition to its effect on the moisture removal a major influence on the structure and the composition of the protein molecules. At  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , in run **g** the mean particle size of the product decreased below the demanded  $10 \mu\text{m}$ .

The acceptable protein preservation ( $c_{BSA,sz}$ ) can be explained by the relatively short residence time ( $\tau_{sz}$  values in Table 1.) in the drying zone.

The effect of PEG 6000 on the particle size, residual moisture and preserved soluble protein content of the product was also investigated. The experiments were carried under the same conditions as in run **e** for pure BSA shown in Table 1 but different amount of PEG 6000 was added to the BSA solution before drying to adjust the polymer concentration to  $c_{PEG} = 1, 2, 3, 4, 5, 10$  and  $50 \text{ g/l}$ . The composition of the dried products is shown in Fig. 3. The product consists of PEG ( $c_{PEG,sz}$ ), soluble protein ( $c_{BSA,sz}$ ), nonsoluble protein ( $c_{BSA,v}$ ) and moisture ( $M_{szn}$ ) content. It was found that the non-soluble protein content is lower than 5 %. The particle size and the residual moisture content depend significantly from PEG concentration of  $4 \text{ g/l}$  (i.e 10 % of the protein content) as it can be seen in Fig. 4. Under this concentration the particle size,  $d_v = 14.08 \mu\text{m}$  and also the residual moisture content,  $M_{szn} = 3,75 \text{ m/m}\%$  are similar to the values obtained in experiment **e** (pure BSA). The decrease of the residual moisture content can be explained by the higher salting-out effect of the higher PEG content which can aid the water removal from the protein. The agglomeration between the two macromolecules can result in bigger particle size of the dried product.

It can be concluded that usage of higher PEG 6000 than 10 % of the protein content in the BSA solutions to be dried causes considerable change in particle size and moisture content of the product. But the ratio of the soluble protein in product reaches higher values than in case of drying the pure BSA solutions. The presence of PEG in protein powders improves the dispersion rate and stability of proteins in organic media in further applications such as formation of polymer-protein composite particles for controlled drug delivery systems.