BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

# ENZIMKATALIZÁLT RESZOLVÁLÁS SZUPERKRITIKUS SZÉN-DIOXIDBAN

Tézisfüzet

Készítette: Utczás Margita
Témavezető: Dr. Székely Edit
Konzulens: Dr. Simándi Béla

Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék

**2012**

# 1 Bevezetés és irodalmi háttér

A gyógyszer- és élelmiszeripar területén rendkívül fontos a különböző biológiai hatással rendelkező enantiomerek elválasztása, és lehetőség szerint a készítményekben csak a hasznos tulajdonságot hordozó enantiomer felhasználása. Ezeket az elválasztási módszereket leggyakrabban szerves oldószerben végzik, így mindig problémát jelent az oldószer regenerálása vagy megsemmisítése és a visszamaradó oldószernyomok eltávolítása a termékből.

Az utóbbi években a nagyipari termelésben is előtérbe kerültek a környezetbarát eljárások, a régi, hagyományos oldószerekkel végzett technológiák helyett egyre gyakrabban fordulnak új, kisebb környezetterhelést okozó oldószereket használó gyártások felé. Az ionos folyadékok mellett a szuperkritikus fluidumoknak, közülük is a szuperkritikus víznek és a szuperkritikus szén-dioxidnak ($scCO_2$) lehet jelentős felhasználása. A $scCO_2$ alacsony kritikus paramétereinek köszönhetően alkalmas lehet biológiailag aktív szubsztrátokkal és katalizátorokkal végzett reakciók, mint például különböző gyógyszerhatóanyagok enzimkatalizált kinetikus reszolválásának megvalósítására. Az irodalomból ismert, hogy az enzimek, különösen a lipázok számos képviselője, képesek megőrizni aktivitásukat és enantioszelektivitásukat $scCO_2$-ban is [1, 2, 3]. Ezzel a technológiával lehetőség nyílik gyógyszerhatóanyagok teljesen környezetbarát előállítására. A $scCO_2$ nemcsak mint oldószer, hanem mint elválasztó közeg is használható a reakció utáni feldolgozó lépések során. A $CO_2$ nyomás- és hőmérséklet-változtatással szabályozható oldóképességének köszönhetően különböző oldhatóságuk szerint szelektíven kioldhatók az egyes anyagok.

Munkám során négy vegyület különböző típusú enzimkatalizált reakcióját vizsgáltam: egy β-laktám származék (4-fenilazetidin-2-on (LAK)) gyűrűnyitási reakcióját, *transz*-2-hidroxiciklohexánkarbolnitril (CCH) acilezését, *transz*-1,2-ciklohexándiol (CHD) kétlépéses konszekutív acilezési reakcióját és 1-feniletanol (PE) dinamikus-kinetikus reszolválását.

---

[1] Knez, Ž.: Enzymatic reactions in dense gases. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *47*, 357-372.

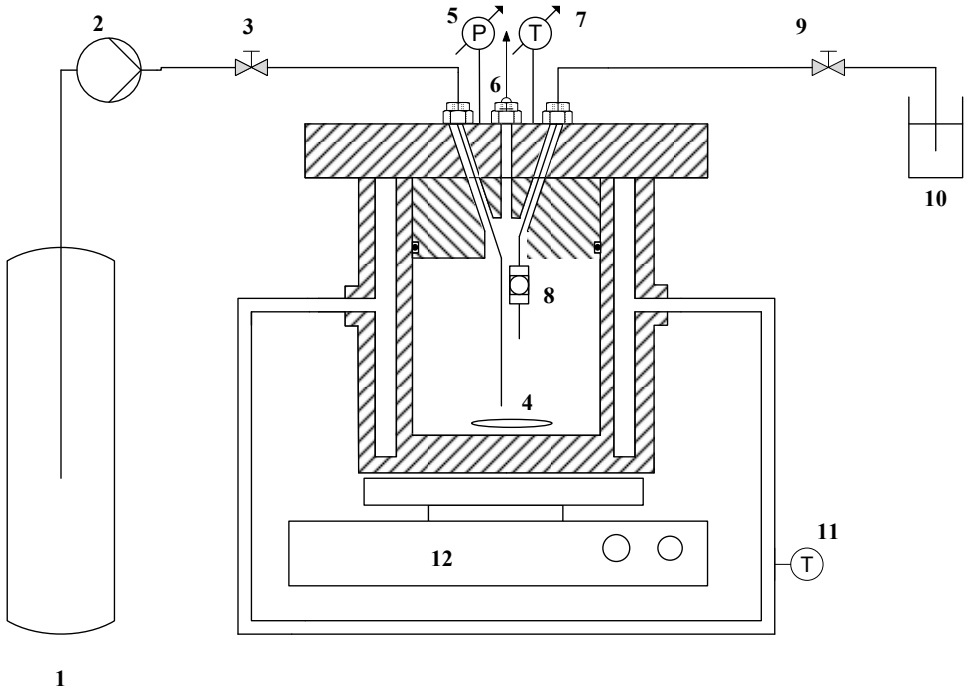
[2] Randolph, T. W., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M., Wilke, C. R.: Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnol. Lett.* **1985**, *7*, 325-328.

[3] Hammond, D. A., Karel, M., Klibanov, A. M., Krukonis, V. J.: Enzymatic-reactions in supercritical gases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1985**, *11*, 393-400.

## 2 Kísérleti módszerek

Kísérleteimet a Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszéken kifejlesztett szakaszos és folyamatos nagynyomású készülékekben végeztem. Oldószerként $scCO_2$-ot használtam, biokatalizátorként immobilizált *Candida antarctica* lipáz B-t (CAL-B), valamint a PE dinamikus-kinetikus reszolválásához két további *Pseudomonas cepacia* eredetű immobilizált lipázt (PS-IM, PS-CI) alkalmaztam a mérések során. A használt készülékek a 2-1. és 2-2. ábrákon láthatók, egyes kísérletek esetén kisebb kiegészítéssel vagy módosítással éltem.

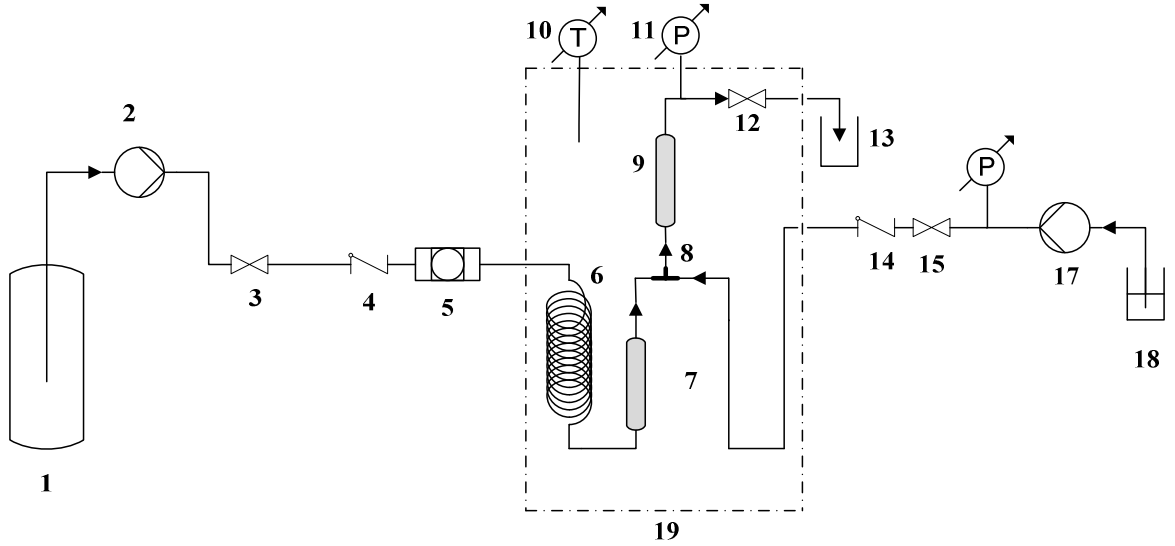
A szakszos reaktorba (2-1. ábra) a szubsztrát, a reagens és az enzim betöltését követően a megfelelő nyomású $CO_2$-ot az előmelegített reaktor aljára vezettem be, így a mágneses keverőn (12) kívül ezzel is biztosítottam a keveredést. A mintavételek a mintavevő szelepen (9) keresztül történtek, a nyomás állandó értéken tartásához mintavétel közben állandó térfogatáramú $CO_2$-ot vezettem a reaktor aljába. A mintavételeken kívül a szelektív termékkioldást is ezzel a módszerrel végeztem.




**2-1. ábra: A nagynyomású tartályreaktor vázlata**

1. $CO_2$ puffertartály, 2. nagynyomású szivattyú, 3. $CO_2$ bevezető szelep, 4. mágneses keverő mag, 5. manométer, 6. hasadótárcsa, 7. hőmérő, 8. szűrő, 9. leeresztő szelep, 10. minta, 11. termosztát, 12. mágneses keverő

A 2-2. ábrán látható folyamatos reaktorban végeztem a folyamatos kinetikus (kapcsolt extrakció-reakció), illetve a dinamikus kinetikus reszolválási reakciókat. Az extrakció-reakció kapcsolt műveletnél a szubsztrát oszlopból (7) a már megfelelő nyomású és hőmérsékletű $scCO_2$-dal kioldottam a szubsztrátot, majd az ellenkező irányból a HPLC szivatytyún (17) át érkező reagenssel (18) a statikus keverővel ellátott T-csatlakozóban (8) homogenizáltam és átvezettem az enzimet tartalmazó reaktor oszlopon (9). A mintákat adott ideig gyűjtöttem a nyomáscsökkentő szelepen (12) történő leeresztést követően. A PE kinetikus reszolválásánál a PE is folyadék halmazállapotú, így ezt a reagenssel együtt adagoltam be.




**2-2. ábra: Folyamatos üzemű reaktor vázlata**

1. $CO_2$ puffertartály, 2. Jasco PU-2080-CO2 szivattyú, 3. $CO_2$ bevezető szelep, 4. visszacsapó szelep, 5. szűrő, 6. előmelegítő csőkígyó, 7. szubsztrát extraktor oszlop, 8. statikus keverővel ellátott T-elágazás, 9. enzimreaktor oszlop, 10. hőmérő, 11. manométer, 12. leresztőszelep, 13. minta, 14. visszacsapó szelep, 15. bevezető szelep, 16. manométer, 17. HPLC pumpa, 18. szubsztrát, 19. termosztált vízfürdő

Kísérleteim során az egyes kiindulási vegyületeknél eltérő beállítási paraméterek hatását és néhány esetben a köztük fennálló kölcsönhatásokat vizsgáltam (nyomás, hőmérséklet, vízkoncentráció, reagens arány). Ahol lehetőségem nyílt rá, ott a kísérlettervezés módszereit alkalmaztam.

A mintákat királis állófázison végzett GC-vel, GC-MS-sel, NMR-rel és optikai forgatóképesség méréssel analizáltam és azonosítottam a benne található vegyületeket és azok enantiomertisztaságát (*ee*).

# 3 Eredmények

A munkám során négy vegyület különböző módon és eltérő paraméterek optimalizálásával megvalósított reszolválását vizsgáltam, melyek eredményeit az alábbiakban mutatom be.

## 3.1 A 4-fenilazetidin-2-on kinetikus reszolválása

A β-laktám származék CAL-B katalizált, vízaddíciós, enantioszelektív gyűrűnyitási reakcióját vizsgáltam $3^2$-os Box-Behnken típusú kísérlettervvel, ahol a faktorok a nyomás (9-21 MPa) és a hőmérséklet (50-70 °C) voltak. A reakció eredményeképpen β-laktám vegyület és fenilalanin aminosav (Phe) nyerhető. A kísérleteknél az CAL-B enzimkészítményt és a LAK-ot 1:1 tömegarányban alkalmaztam. A két vizsgált faktor hatását tanulmányoztam a reakciósebességre (konverzióra ($X$)), valamint a termék enantioszelektivitására. A kísérletterv kiértékelésekor megállapítottam, hogy a vizsgált tartományban a hőmérséklet lineáris és a nyomás lineáris valamint négyzetes tagjának van szignifikáns hatása a reakciósebességre, míg a két faktor közötti kölcsönhatások elhanyagolhatóak. A legjobb konverzió eredményt (22 óra után $X$ = 38 %, $ee_{\mathrm{Phe}}$ > 98 %) 15 MPa nyomáson és 70 °C-on értem el, míg az aminosav enantiomertisztaságára ($ee_{\mathrm{Phe}}$ > 98 % minden vizsgált esetben) nem voltak hatással a körülmények. Mivel ismert, hogy az enzimek bizonyos hőmérséklet fölött veszítenek az aktivitásukból és a vizsgált tartományban nem értem el az optimális hőmérsékletet, ezért részletesebb hatásvizsgálatot végeztem alacsonyabb (40 °C) és magasabb (80 °C) hőmérsékleten. A kapott eredményekből megállapítottam, hogy $scCO_2$-ban a CAL-B enzim hőmérséklet optimuma nyomástól függetlenül 70 °C-on van, míg nyomás optimuma 15 MPa-on.

A reakciót az elméleti maximumhoz közeli konverzióig ($X$ > 49,9 %) végeztem, majd, mivel a keletkezett enantiomertiszta aminosav termék ($ee_{\mathrm{Phe}}$ > 98 %) és a visszamaradt enantiomertiszta ($ee_{\mathrm{LAK}}$ > 99,9 %) kiindulási szubsztrát különböző oldhatóságuknak köszönhetően szelektíven szétválaszthatóak, a β-laktámot $scCO_2$-dal kimostam a reaktorból. A visszamaradó aminosavat pedig az enzimről meleg vizes mosással leoldottam, majd szűréssel elválasztottam. Ezzel megvalósítottam egy teljesen környezetbarát, termék elválasztással összekapcsolt reszolválást, ahol mindkét enantiomertiszta (β-laktám és Phe) vegyület hasznos és fontos gyógyszeripari szintézis alapanyag illetve intermedier lehet.

## 3.2 A *transz*-2-hidroxiciklohexánkarbonitril kinetikus reszolválása

A vizsgált ciklohexánkarbonitril származék CAL-B katalizált kinetikus reszolválását vizsgáltam, és az optimális acilezőszer (vinil-acetát (VA)) arányt (0,5-10 mólarány) határoztam meg 10 MPa nyomáson és 45 °C hőmérsékleten. A kísérletek során a bemért enzimmennyiség és a szubsztrát:enzim arány állandó volt. Az acilezőszer aránya jelentősen befolyásolta a reakciósebességet és az egyensúlyi konverzió értékét is. A reakciósebesség az acilezőszerarány növelésével nőtt, bár 5 molekvivalens felett már nem volt jelentős hatása. Az 50 %-os egyensúlyi konverzió eléréséhez minimálisan 2 molekvivalens arányú VA szükséges. Az enantiomertisztaság nem változott, a termék minden bemérési arány esetén 98 %-nál nagyobb tisztaságú volt.

A jól oldható szubsztrátra, a VA-ra meghatároztam az enzimkinetikai paramétereket ($r_{max}$, $K_M$) és a látszólagos „turnover number”-t (váltásszám (*TON*)) (0,24 mmol átalakított szubsztrát · g enzim$^{-1}$ · min$^{-1}$).

Az enzimek viselkedésére jelentős hatása lehet még a víztartalomnak, és az optimális vízmennyiség változhat a nyomás és a hőmérséklet függvényében. A vizsgálathoz ismert víztartalmú enzimet és vízmentesített $CO_2$-ot használtam, majd a vízkoncentrációját (0,007-0,983 mg/ml) változtattam különböző nyomáson (10-20 MPa) és hőmérsékleten (40-70 °C) $2^3$-os kísérletterv (centrumpontban három ismétléssel) alapján. Azt tapasztaltam, hogy az enzim aktivitására és enantioszelektivitására is hatással van a víz mennyisége, valamint a 3 vizsgált műveleti paraméter együttesen befolyásolja a reakciót. A kísérletterv során a legjobb eredményeket a hozzáadott víz nélkül, vagyis az enzim saját víztartalmával végzett mérések során kaptam. Azonban egyik mérésnél sem értem el az 50 %-os konverziót, tehát ez jelzi, hogy az enzimnek szükséges bizony víztartalom a megfelelő működéshez. Továbbá a víz túlzott jelenléte nem csak mennyiségi, hanem minőségi változást is okozott a reakció lefutásában, megváltoztatva az enzim enantioszelektivitását. A nyomásnak minőségi változást előidéző hatása nem volt, a hozzáadott víz nélkül végzett kísérletek esetében egyértelműen megállapítható, hogy a nyomás növelése nem kedvez az enzimaktivitásnak. A hőmérséklet növelésével nő az enzimaktivitás. A centrumpontban kapott alacsony konverzió értékek (240 perc után $X \sim 5$ %) a víz jelenlétének és a hőmérséklet növekedésének az egymással ellentétes hatásából fakadhatnak. Megállapítottam, hogy a technológiai szempontból kedvező, egyszer desztillált $CO_2$ által hordozott víz és az enzimkészítmény természetes víz-

tartalma egy jól reprodukálható, állandó vízkoncentrációt biztosít a rendszerben, valamint ez a víztartalom az enzim optimális működési tartományába esik.

### 3.3 A *transz*-1,2-ciklohexándiol kinetikus reszolválása

*Transz*-1,2-ciklohexándiol konszekutív acilezését vizsgáltam $scCO_2$-ban, a célom a szakaszos rendszer eredményeire alapozva egy folyamatos rendszer megtervezése volt. A reakció két acilezési lépésből áll, amelyekről ismert, hogy a második lépés teljesen enantioszelektív. Szakaszos rendszerben vizsgáltam az acilezőszer mennyiségének (2-30 mólarány) hatását 10 MPa nyomáson és 40 °C hőmérsékleten. Az oldhatóság limitált szubsztrát (CHD) és a bemért enzimmennyiség aránya állandó volt a kísérletek során. A teljes konverzió ($X \geq 99{,}9$ %) és az enantiomer tiszta termékek (*ee* > 99,9%) eléréséhez a minimálisan szükséges acilezőszer mólarány a 10 volt, a további növelés már nem okoz jelentős változást a reakciósebességben. A reakcióidő függvényében vizsgáltam a CHD enantiomerek, a köztitermék monoacetát (CHDAc) enantiomerek és az (1*R*,2*R*)-$CHDAc_2$ koncentráció lefutását, és differenciálegyenlet-rendszer segítségével meghatároztam az egyes reakciólépések reakciósebességi állandóit (*k*). A kapott eredményekből megállapítottam, hogy az első acilezési lépés során is mutat kismértékű enantioszelektivitást az enzim, több mint 1,5-szer gyorsabban reagál az (1*R*,2*R*)-CHD enantiomer, mint az (1*S*,2*S*)-CHD.

A jól oldható szubsztrátra a *transz*-1,2-ciklohexándiol esetén is meghatároztam az enzimkinetikai paramétereket és a látszólagos *TON*-t (0,125 mmol átalakított szubsztrát · g $enzim^{-1}$ · $min^{-1}$). A kapott átalakító képesség a diol vegyület esetében a ciklohexán-karbonitril származékhoz képest kb. fele akkora, aminek magyarázata lehet, hogy a két kiindulási vegyület a saját oldhatósági határához közel (tehát nem azonos koncentrációban) lett bemérve.

A kapott „turnover number”-t alapul véve megterveztem a folyamatos rendszert és kiszámítottam a minimálisan szükséges tartózkodási időt. A folyamatos kísérleteket szintén a korábbi műveleti paraméterek mellett, 10 MPa nyomáson és 45 °C hőmérsékleten végeztem, az acilezőszer arányát 10-30 molekvivalens tartományban állítottam be. A tartózkodási időt 3-12 s tartományban változtattam a $CO_2$ térfogatáramának módosításával és vizsgáltam a hatását a produktivitásra és a köztitermék enantiomertisztaságára. A $CO_2$ minden esetben telített volt a diol vegyület-

re nézve, a tartózkodási idő csökkentésével nőtt a kioldódott diol összmennyisége, tehát az enzimágynak adott idő alatt egyre több kiindulási szubsztrátot kellett átalakítania, majd tovább acileznie. Mivel az enzimágy adott tartózkodási időnél (~ 6 s) rövidebb idő alatt nem képes átalakítani a teljes keletkezett mennyiségű CHDAc köztiterméket diacetát ($CHDAc_2$) termékké, így a monoacetát enantiomertisztasága lecsökken. A produktivitásnak ~ 4,5 s tartózkodási időnél maximuma van, mivel a csökkenő tartózkodási idővel (növekvő $CO_2$ térfogatáram) nő a kioldódott és átalakult CHD mennyisége, és ezzel a produktivitás is, azonban csak addig, amíg az enzim képes átalakítani a CHDAc jelentős részét $CHDAc_2$-tá. Mindkét vizsgált jellemzőt figyelembevéve ~ 5 s az optimális tartózkodási idő, amivel jó produktivitással (~ 50 µmol termék · g enzim$^{-1}$ · min$^{-1}$) és enantiomertisztasággal ($ee_{CHDAc}$ > 97 % és $ee_{CHDAc2}$ > 99,9 %) állíthatók elő a termékek.

A folyamatos rendszerre meghatároztam a „turnover” frekvenciát (*TOF*) (0,097 mmol átalakított szubsztrát · g enzim$^{-1}$ · min$^{-1}$), mely jó egyezést mutat a szakaszos kísérletek során számított *TON*-nal (0,125 mmol átalakított szubsztrát · g enzim$^{-1}$ · min$^{-1}$). Míg a folyamatos rendszer produktivitása közel ~ 6-szorosa a szakaszosénak.

## 3.4 Az 1-feniletanol dinamikus-kinetikus reszolválása

Célom az 1-feniletanol dinamikus-kinetikus reszolválásának megvalósítása volt $scCO_2$-ban. A racemizálási lépéshez ((*S*)-1-feniletanol racemizálás) alkalmas katalizátor kiválasztásához szakaszos reaktorban 10 MPa nyomáson és a katalizátor számára legalkalmasabb (de még az enzim szempontjából is megfelelő), hőmérsékleten (40-90 °C) végeztem előkísérleteket az irodalomban leírt katalizátorokkal. Az irodalmi hivatkozásokban csak érintőlegesen említik a melléktermék keletkezés lehetőségét, azonban ez valójában egy fontos probléma. A kísérletek során három paramétert vizsgáltam: a konverziót, az enantiomertisztaságot és a melléktermékképződés arányát. A tíz tesztelt fémes és savas katalizátor közül mindössze kettőt (Nafion NR-50, zeolit) találtam alkalmasnak a további vizsgálatokra. A kiválasztott katalizátorokat három különböző enzimmel (CAL-B, valamint PS-IM, PS-CI) próbáltam ki a dinamikus-kinetikus reszolválás során. A kísérleteket folyamatos rendszerben végeztem, ahol a *rac*-1-PE és a VA előre elkészített elegyét a $CO_2$-dal összekeverve homogén fázisban áramoltattam át (térfogatáram: 1 ml/min) az en-

zimmel és a katalizátorral töltött reaktor oszlopon 10 MPa nyomáson és a Nafion NR-50 katalizátor esetében 45 °C, míg a zeolit esetében 80 °C hőmérsékleten. Az enzim és a kémiai katalizátor között fizikai elkülönítést kellett alkalmazni (enzim – katalizátor – enzim), mivel az érintkeztetésük az enzim aktivitás vesztéséhez vezet [4, 5]. A Nafion NR-50 – PS-CI katalizátor-enzim párral végzett dinamikus-kinetikus reszolválás egyik vizsgált paraméter szerint sem tekinthető eredményesnek. A legjobb eredményt a zeolit – CAL-B katalizátor-enzim párral értem el, a keletkezett termék, az (1-feniletil)-acetát (PEAc) enantiomertisztasága 85 % feletti volt, hozama pedig nagyobb, mint 75 %, a képződött feniletiléter dimer ($PE_2$) melléktermékek aránya 20 %-nál kisebb. A zeolit-PS-IM összeállításban a közel teljesen enantiomertiszta (> 95 %) PEAc termék keletkezett, azonban a keletkezett melléktermékek aránya ~ 35 % és csak nagyon gyenge hozam (< 20 %) érhető el.

## 4 Tézisek

1. Kidolgoztam egy olyan technológiát, mely során 4-fenilazetidin-2-on (LAK) gyűrűnyitásos kinetikus reszolválása, majd a keletkezett, gyógyszeripari szempontból hasznos két enantiomertiszta termék (LAK, Phe) elválasztása megvalósítható teljesen környezetbarát módszerekkel; enzim (CAL-B), $scCO_2$ és víz segítségével [4, 7, 13].
   1.1. A LAK szakaszos reaktorban végzett kinetikus reszolválásának műveleti paramétereit (nyomás, hőmérséklet) optimáltam az enzimaktivitásra és az enantioszelektivitásra nézve. A Phe a vizsgált tartományban a hőmérséklettől és a nyomástól függetlenül 98 %-nál nagyobb enantiomertisztasággal keletkezett, az enzimaktivitás optimuma 15 MPa nyomáson és 70 °C hőmérsékleten volt.
   1.2. Teljes konverzióig ($X$ > 49,9 %) lejátszódott reakciót követően a szakaszos üzemből folyamatos kevert autokláv üzemre váltva állandó $CO_2$ térfogatáram mellett, jelentősen eltérő oldhatóságának

[4] Westerbeek A., Szymański W., Feringa B. L., Janssen D. B.: Dynamic kinetic resolution process employing haloalkane dehalogenase. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1654-1660.

[5] Xin J.-Y., Li S.-B., Xu Y., Chui J.-R., Xia C.-G.: Dynamic enzymatic resolution of Naproxen methyl ester in a membrane bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2001**, *76*, 579-585.

köszönhetően, a LAK szelektíven kioldható ($ee_{LAK}$ > 99,9 %), majd a visszamaradó Phe ($ee_{Phe}$ > 98 %) meleg vízzel elválasztható az enzimtől.

2. Szakaszos üzemben CAL-B-vel elvégeztem a 2-hidroxiciklohexánkarbonitril (CCH) kinetikus reszolválását $scCO_2$-ban minimálisan szükséges mennyiségű acilezőszer felhasználásával és az optimális kísérleti paraméterek (hőmérséklet, nyomás, víztartalom) meghatározásával.
   2.1. Igazoltam, hogy a reakció teljes lefutásához az 1:1 mólarányú acilezőszer nem elégséges, az elméleti maximális 50 %-os konverzió eléréséhez minimálisan szükséges acilezőszer arány a racém szubsztrátra nézve 2-szeres. Az így keletkező termékek enantiomertiszták ($ee_{CCH}$ > 99,8 %, $ee_{CCHAc}$ > 98%) [3].
   2.2. Megállapítottam, hogy technológiai szempontból, az enzim maximális aktivitásának és enantioszelektivitásának figyelembevételével, az optimális vízkoncentráció beállítás az enzim saját, illetve az egyszer desztillált $CO_2$ együttes vízkoncentrációja, ami nagy biztonsággal állandó értéken (~ 0,04-0,05 mg/ml) tartható, és ez az érték az enzim működési optimumába esik [10, 11].
   2.3. Kimutattam, hogy a nyomást 10-ről és 20 MPa-ra növelve csökkent, a 40-70 °C hőmérséklet tartományban a hőmérséklet növelésével egyértelműen nőtt az enzimaktivitás [10, 11].

3. Szakaszos rendszer eredményeire alapozva kidolgoztam egy folyamatos, kapcsolt extrakciós-reakciós eljárást *transz*-1,2-ciklohexándiol (CHD) CAL-B katalizált kinetikus reszolválására $scCO_2$-ban.
   3.1. Szakaszos rendszerben igazoltam, hogy a CHD első acilezési lépésekor az enzim kismértékű enantiomer megkülönböztetést mutat, a keletkező monoacetát nem racém [1].
   3.2. A szakaszos kísérletekből számított enzim „turnover number”-t alapul egy új számítási módszerrel becsültem a folyamatos rendszerben szükséges tartózkodási időt, mely jól használható ebben a speciális (konszekutív) és egyszerűbb esetekben is. A produktivitásra és az enantioszelektivitásra nézve optimalizáltam a tartózkodási időt és a meghatározott értéknél (~ 5 s) közel maximális produktivitással, teljes konverzióval előállíthatók az enantiomertiszta (1*S*,2*S*)-monoacetát és (1*R*,2*R*)-diacetát termékek [2, 6, 12].

4. 1-Feniletanol (PE) dinamikus-kinetikus reszolválását vizsgáltam $scCO_2$-ban és az alábbi megállapításokra jutottam [8, 14]:
   4.1. Bizonyítottam, hogy a szerves oldószerben tapasztaltakhoz (Poppe és mtsi.) hasonlóan $scCO_2$-ban is a PE racemizálásakor feniletiléter dimer diasztereomer melléktermékek képeződése okozza a legnagyobb problémát, melyek kizárólag a kiindulási szubsztrátból és nem az acilezett termékből képződnek. Továbbá igazoltam, hogy a melléktermékek az irodalomban leírt szubsztrát koncentráció – melléktermékképződés összefüggésében meghatározott szubsztrát koncentrációnál kisebb kiindulási koncentráció mellett is keletkeznek.
   4.2. A szakaszos rendszerben vizsgált savas és fémes katalizátorok közül a savas Nafion NR-50 és a zeolit katalizátorokkal kaptam a legjobb konverziót és a legkevesebb melléktermékет.
   4.3. A vizsgált enzimek közül dinamikus kinetikus reszolválás során zeolit katalizátorral kombinálva a CAL-B nagyobb hozammal, jó enantioszelektivitással (*ee* > 85 %), míg a PS-IM kitűnő enantioszelektivitással (*ee* > 96 %), azonban gyenge hozammal képzi az acetát terméket.

## 5 Alkalmazási lehetőségek

A $scCO_2$-os technológia ígéretes eljárás lehet a gyógyszeripar területén, amely akkor nyerhet teret, ha egyértelmű előnyökkel jár az adott vegyület esetében és gazdaságosabb előállítást biztosít a hagyományos módszerekhez képest. Mivel sok esetben a gyógyszerhatóanyagok nem vízoldhatóak vagy a szerves oldószeres szintézisük után visszamaradó oldószer regenerálása meglehetősen költséges, ezeknek a problémáknak a kiküszöbölésére megoldást nyújthat ez az oldószer.

Tiszta enantiomerek előállítására a $scCO_2$ bizonyítottan nem pusztán csak reakcióközeg, hanem egyben a termékek elválasztását végző közeg is lehet, így lehetővé teszi teljesen környezetbarát eljárások megvalósítását. Így elkerülhető akár teljes mértékben a szerves oldószerek alkalmazása a racém szubsztrátból kiindulva a tiszta enantiomer termék előállításig. Kihasználva a nyomás és hőmérséklet változtatásával jól szabályozható oldóképességét kifejezetten alkalmas az egyes vegyületek egymástól történő elválasztására. Az immobilizált enzimek használata szintén előnyös lehet

az ipari üzemeltetés során, mivel így könnyen elválaszthatók a termékektől és tisztítás után újra felhasználhatóak.

Természetesen fontos megtalálni minden esetben az optimális beállítási paramétereket az adott vegyületek esetén. Az egyes vegyületeknél megállapított optimális hőmérséklet, nyomás, acilezőszer arány, vízkoncentráció hasznos információval szolgálhat a méretnöveléskor a technológia megtervezéséhez.

A szakaszos rendszerre kiszámított enzimkinetikai paraméterek, főként a „turnover number” alapján jó közelítéssel becsülhető a folyamatos rendszer üzemeltetéséhez szükséges optimális tarózkodási idő. Ezek mind olyan műveleti paraméterek, melyek ismerete elengedhetetlenül fontos az esetleges ipari megvalósításhoz. A dinamikus-kinetikus reszolválás módszerét alkalmazva lehetőség nyílik kifejezetten jó hatásfokkal előállítani a kívánt terméket hosszú időn keresztül változatlan produktivitással.

## 6 A doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények

***Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények:***

[1] Utczás M., Székely E., Szeleczky Zs., Szőllősy Á., Simándi B.: Enzyme catalysed kinetic resolution of *trans*-1,2-cyclohexanediol in supercritical carbon dioxide. *Process Biochemistry* c. folyóiratba beküldve.

[2] Székely, E., Utczás, M., Simándi, B.: Kinetic resolution in $scCO_2$ - Design of continuous reactor based on results of batch experiments. *The Journal of Supercritical Fluids* c. folyóiratban elfogadva (2012)

*IF*: 2,860 *idézettség*: 0 független

[3] Utczás M., Székely E., Forró E., Szőllősy Á., Fülöp F., Simándi B.: Enzymatic resolution of *trans*-2-hydroxycyclohexanecarbonitrile in supercritical carbon dioxide. *Tetrahedron Lett.* 2011;52: 3916-3918.

*IF*: 2,618 *idézettség*: 0 független

[4] Utczás M., Székely E., Tasnádi G., Monek É., Vida L., Forró E., Fülöp F., Simándi B.: Kinetic resolution of 4-phenyl-2-azetidinone in supercritical carbon dioxide. J. *Suprecrit. Fluids* 2011;55: 1019-1022.

*IF*: 2,986 *idézettség*: 1 függő

***Hazai folyóiratban megjelent közlemények:***

[5] Utczás M., Molnár P., Székely E., Máthé E., Verhoef H. J., Korporaal R., Vries de J., Visser T. J., Simándi B.: Fehérjék stabilitásának vizsgálata szuperkritikus szén-dioxid - víz rendszerben. *Olaj Szappan Kozmetika* 2009;58: 108-111.

***Nemzetközi konferencia közlemények:***

[6] Székely E., Utczás M., Simándi B.: Kinetic resolution in sc-$CO_2$ - Design of continuous reactor based on results of batch experiments, *10th International Symposium on Supercritical Fluids (ISSF)*, San Francisco, CA, USA, 13th-16th May 2012, **Szóbeli előadás**

[7] Utczás M., Székely E., Tasnádi G., Monek É., Vida L., Forró E., Fülöp F., Simándi B.: Kinetic resolution of 4-phenyl-2-azetidinone in supercritical carbon dioxide, *12th European meeting on Supercritical Fluids (International Society for Advancement of Supercritical Fluids – ISASF Event)*, Graz, Austria, 9th-12th May 2010, ISBN: 978-2905267-72-6, p. 130., **Poszter**

[8] Utczás M., Monek É., Benaissi K., Székely E., Vida L., Simándi B.: Biocatalysis in supercritical carbon dioxide, *Xth Netherlands' Catalysis and Chemistry Conference*, Noordwijkerhout, The Neatherlands, 2nd-4th March 2009, p. 301., **Poszter**

***Hazai konferencia közlemények:***

[9] Utczás M., Székely E., Forró E., Tasnádi G., Monek É., Szeleczky Zs., Szőllősy Á., Fülöp F., Simándi B.: Enzimkatalizált reszolválások szuperkritikus szén-dioxidban, *Szuperkritikus Oldószerek Műveleti és Analitikai Alkalmazása '12*, Budapest, Magyarország, 2012. május 24., ISBN: 978-963-313-057-5, p. 22., **Szóbeli előadás**

[10] Alekszi, N., Utczás, M., Székely, E., Forró, E., Fülöp, F., Szőllősy, Á., Simándi, B., *Transz*-2-hidroxiciklohexánkarbonitril lipázkatalizált kinetikus reszolválása szuperkritikus szén-dioxidban, *Szuperkritikus Oldószerek Műveleti és Analitikai Alkalmazása '12*, Budapest, Magyarország, 2012. május 24., ISBN: 978-963-313-057-5, p. 28., **Poszter**

[11] Utczás M., Székely E., Alekszi N., Forró E., Szőllősy Á., Fülöp F., Simándi B.: *Transz*-2-hidroxiciklohexánkarbonitril kinetikus reszolválása szuperkritikus szén-dioxidban, *Műszaki Kémiai Napok '12*, Veszprém, Magyarország, 2012. április 24-26., ISBN: 978-915-5044-54-0, p. 243., **Szóbeli előadás**

[12] Szeleczky Zs., Utczás M., Vida L., Simándi B., Székely E.: *Transz*-1,2-ciklohexán-diol enzimkatalizált kinetikus reszolválása, *Műszaki Kémiai Napok '10*, Veszprém, Magyarország, 2010. április 27-29., ISBN: 978-963-9696-93-8, p. 276., **Poszter**

[13] Utczás M., Tasnádi G., Monek É., Vida L., Forró E., Fülöp F., Simándi B., Székely E.: *Rac*-4-fenil-2-azetidinon kinetikus reszolválása szuperkritikus szén-dioxidban, *Műszaki Kémiai Napok '10*, Veszprém, Magyarország, 2010. április 27-29., ISBN: 978-963-9696-93-8, p. 155., **Szóbeli előadás**

[14] Monek É., Utczás M., Székely E., Vida L., Benaissi K., Simándi B.: Kinetikus reszolválás folyamatos üzemű szuperkritikus reaktorban, Műszaki Kémiai Napok '09, Veszprém, Magyarország, 2009. április 21-23., ISBN: 978-963-9696 68-6, p. 97., **Poszter**

[15] Utczás M., Molnár P., Székely E., Máthé E., Verhoef H. J., Korporaal R., Vries de J., Visser T. J., Simándi B.: Fehérjék stabilitása szuperkritikus szén-dioxidban, *Műszaki Kémiai Napok '08*, Veszprém, Magyarország, 2008. április 22-24., ISBN: 978-963-969636-5, p. 142. **Szóbeli előadás**

[16] Utczás M., Molnár P., Székely E., Máthé E., Verhoef H. J., Korporaal R., Vries de J., Visser T. J., Simándi B.: Fehérjék stabilitás vizsgálata szuperkritikus szén-dioxid – víz rendszerben, *Szuperkritikus oldószerek analitikai és műveleti alkalmazása'08*, Budapest, Magyarország, 2008. május 22., **Poszter**

***Egyéb publikációk:***

[17] Utczás M., Székely E., Forró E., Tasnádi G., Monek É., Szeleczky Zs., Szőllősy Á., Fülöp F., Simándi B.: Enzim katalizált reszolválás szuperkritikus szén-dioxidban, *MTA Vegyipari Műveleti Munkabizottsági ülés*, Veszprém, Magyarország, 2012. április 26. **Szóbeli előadás**