

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.¹ A tématerület azóta elért jelentős eredményeit több összefoglaló közlemény is taglalja.²⁻⁵

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 oldószerekben 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 oldószerekre volt szükségük, amelyek megtartják a szerves oldószerekkel 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 oldószerekben, mint vízben.	Csökkenhet a reakciósebesség a szerves oldószerekben
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 oldószerek gyúlékonyak, alacsony a forráspontjuk.
Csökken a mikrobiális elszennyeződés veszélye.	A szerves oldószerek denaturálhatják az enzimeket.

Alkalmazásukkal egyrészt kiküszöbölhető a nagy mennyiségű vegyipari szennyvíz keletkezése, kezelése, tisztítása, másrészt elkerülhető a hagyományos szerves oldószerek használatakor keletkező oldószerelegyek 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 oldószerekkel való elegyedés. Ezen utóbbi tulajdonságuk alapján az ionos folyadékok „tervezhető oldószerek”, amelyek sok helyen kiszoríthatják a „hagyományos” szerves oldószereket.

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

Az ionos folyadékokat általában erősen poláros oldószereknek 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.¹²⁻¹³ Az érdeklődési körünkbe tartozó ionos folyadékok, mint a [Bmim]BF₄ (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 1,0.¹² 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]BF₄ és a [Bmim]MeSO₄ (1-butil-3-metil-imidazolium-metil-szulfát) elegyednek vízzel, azonban a [Bmim]PF₆ (1-butil-3-metil-imidazolium-hexafluorofoszfát) és a [Bmim]Tf₂N (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. Feltételezzük, hogy hasonló eset áll fenn az ionos folyadékok és a víz esetében is.^{6, 13, 14}

* 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]PF₆ és [Omim]BF₄ (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.^{14, 15}

Az ionos folyadékok sokkal viszkózusabbak, mint a hagyományos szerves oldószerek. A [Bmim]BF₄ 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.^{13, 16, 17}

3. Aroma észterek előállítása ionos folyadékokban

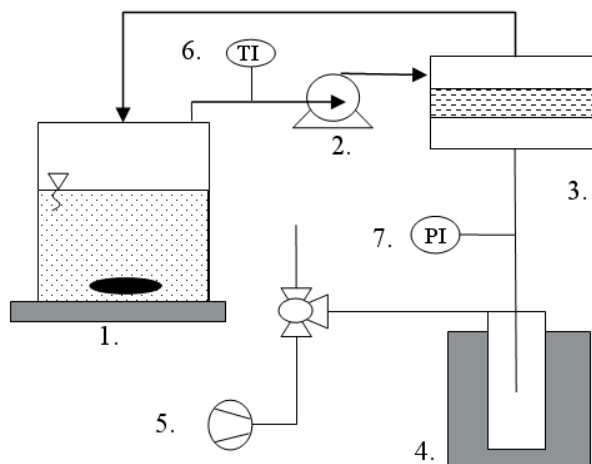
A kis molekulású aroma észterek enzimakatalitikus előállításának alakulása az elmúlt 10-15 évben jól reprezentálja az alkalmazott oldószerek tekintetében végbement változásokat. A legtöbb természetes aroma néhány száz egyedi komponensből tevődik össze, de ez a komplexitás csökkenthető, ha csak a 70-100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

Szerves közegben végzett enzimikus aromaészter előállításáról beszámoló kísérleti eredményeket az irodalomban találhatunk.^{24, 28} A 2-6 szénatomszámú savak és alkoholok nagylaboratóriumi berendezésben történő észterezése NOVOZYM 435 (Novozymes, Dánia) lipáz enzim jelenlétében már jól kidolgozott folyamat.²⁹ 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.³⁰ 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 vázlatja. 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 cm³-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.^{31, 32}

4. Enzimakatalitikus enantioszelektív észterezés

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

Az ionos folyadékokban lejátszódó enzimakatalitikus reakciók közül az enantioszelektív észterezések a leggyakrabban vizsgált típusba tartoznak. Az első megjelent közlemények^{34, 35} eredményeit később többen vitatták.³⁶ 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.³⁷ Az ionos folyadékokból történő vízelávolítást pervaporációval először csak modell oldatokkal tesztelték,³⁸ később sav katalizálta észterezéseknél is alkalmazták.³⁹

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]PF₆, [Onim]PF₆, [Bmim]BF₄) és összehasonlításként szerves oldószerekben (n-hexán, toluol, tetrahydro-furán) vizsgáltuk a reakciót.⁴⁰

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

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

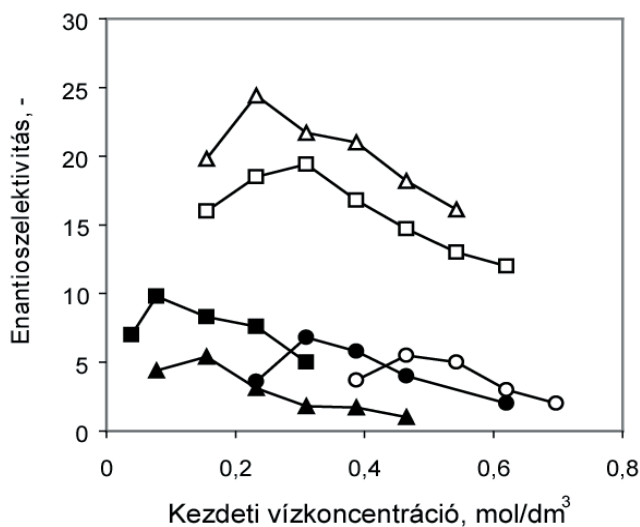
^a A „rázatott lombikos” módszerrel, általunk meghatározott értékek

^b 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.⁴¹

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]PF₆, Δ -[Onim]PF₆, ○ -[Bmim]BF₄

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.⁴²

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.; Tónova, 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]PF₆) and 1-methyl-3-nonyl-imidazolium-hexafluoro-foszfát ([Omim]PF₆) 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.