

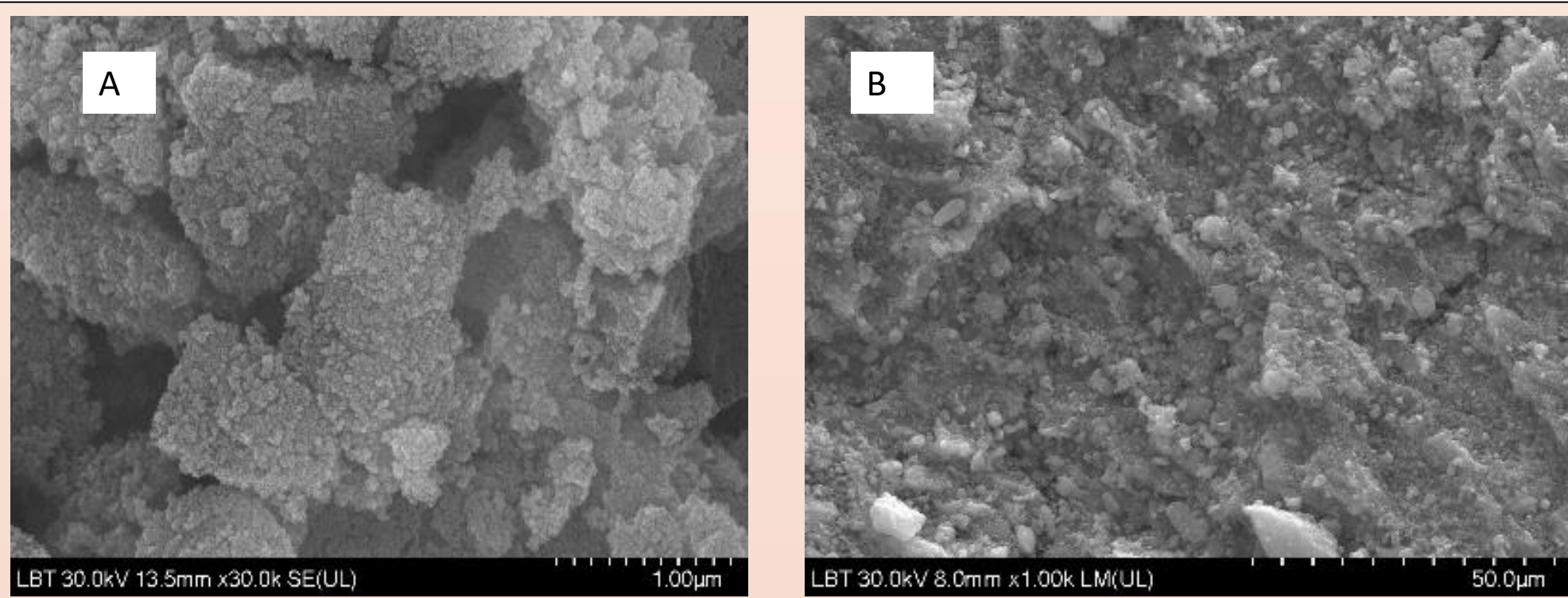
Elméleti bevezető

A mikrofluidika kiváló módszer a kémiai és biológiai szintézisek javítására, lehetőséget kínálva különböző funkcionális modulok egyetlen platformra történő integrálására. A mikrofluidika lehetővé teszi a reakciókörülmények jobb szabályozását és a nagyobb hozamú termelést, csökkentve a reagensfogyasztást és a rendszerköltséget. Felhasználható elválasztási, tisztítási folyamatokban, valamint lépcsőzetes kémiai és biológiai reakciókban.¹A biokatalitikus acilezési reakciókat folyamatos áramlású mikrofluidikai rendszerben, polikarbonát alapú mikrochipben végeztük el. A reakciókban alkalmazott magnetit, mint a Cal-B lipáz katalitikus hordozóját TEM és SEM mikroszkóppal vizsgáltuk felületének jellemzésére. Az immobilizált lipáz katalitikus aktivitását különböző racém alkoholokkal teszteltük: rac-4-Cl-1-fenil-etanol, rac-4-Br-fenil-etanol, rac-4-F-fenil-etanol, rac-1-fenil-etanol, rac-benzotiofén-3-etanol, rac-3-nitro-1-fenil-etanol, rac-4-nitro-1-fenil-etanol. A mikrofluidikai rendszer hatékonyságának tesztelése érdekében változtattam a hőmérsékletet, az áramlási sebességet és a rac-1-fenil-etanol:vinil-acetát térfogatarányát.

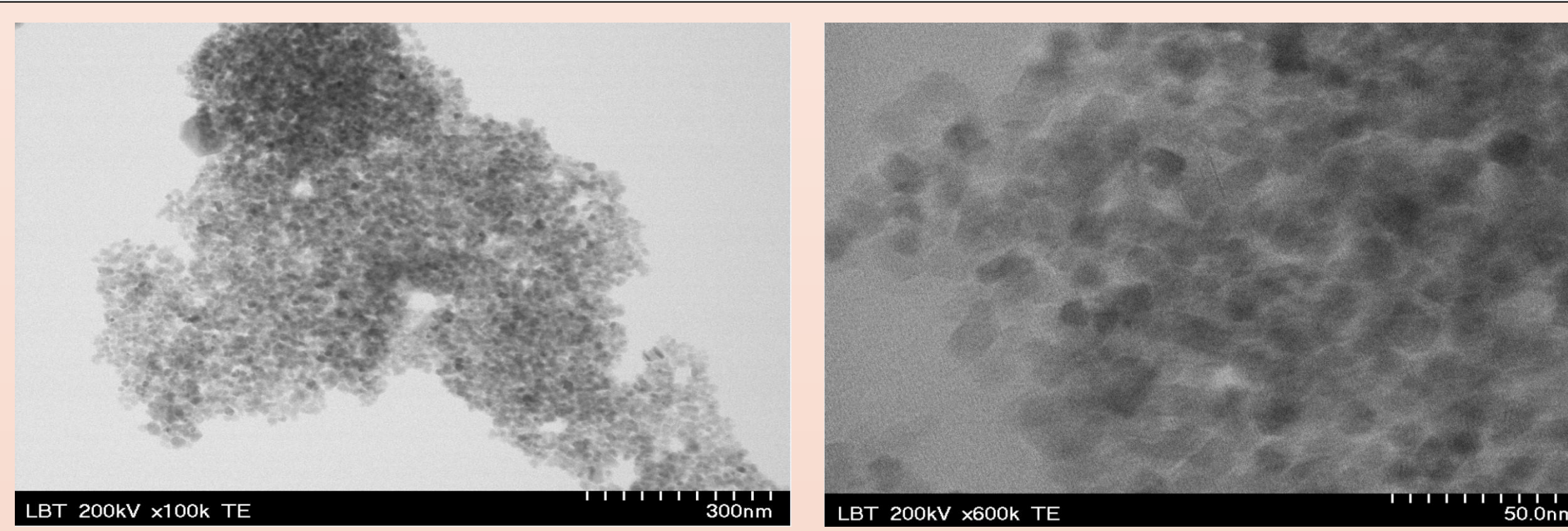
Kísérleti rész

Magnetit előállítása

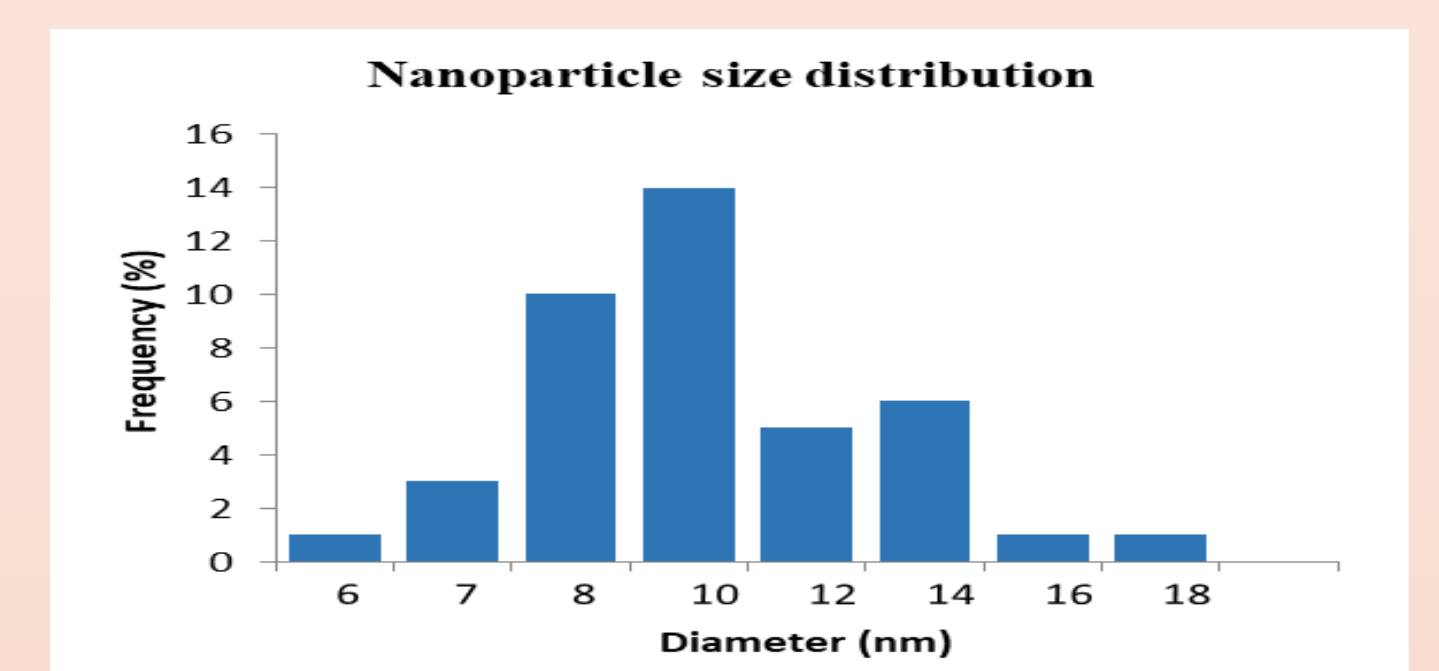
A magnetit (Fe_3O_4) előállítása $FeCl_2$ és $FeCl_3$ -ból történik folyamatos kevertetés mellett Ar gáz alatt. A magnetit nanorészecske karboxilezése céljából szukcinil savat adtam a $FeCl_2$ és $FeCl_3$ hoz, majd a karboxil csoport aktiválása érdekében karbonil-diimidazol és glicerol-diglicidil-éter². A magnetit felületére immobilizált enzim felületét és morfológiáját pásztázó elektromikroszkópiával vizsgáltuk: A. 30,000x és B.1,000x nagyítással. (1.Ábra). A magnetit nanorészecskék méretét transzmissziós elektron mikroszkóppal határoztuk meg (2.Ábra), a részecske méret eloszlás szerint a részecskék mérete átlagosan 9,46 nm (3.Ábra).



1. Ábra. Előállított magnetit SEM felvételei



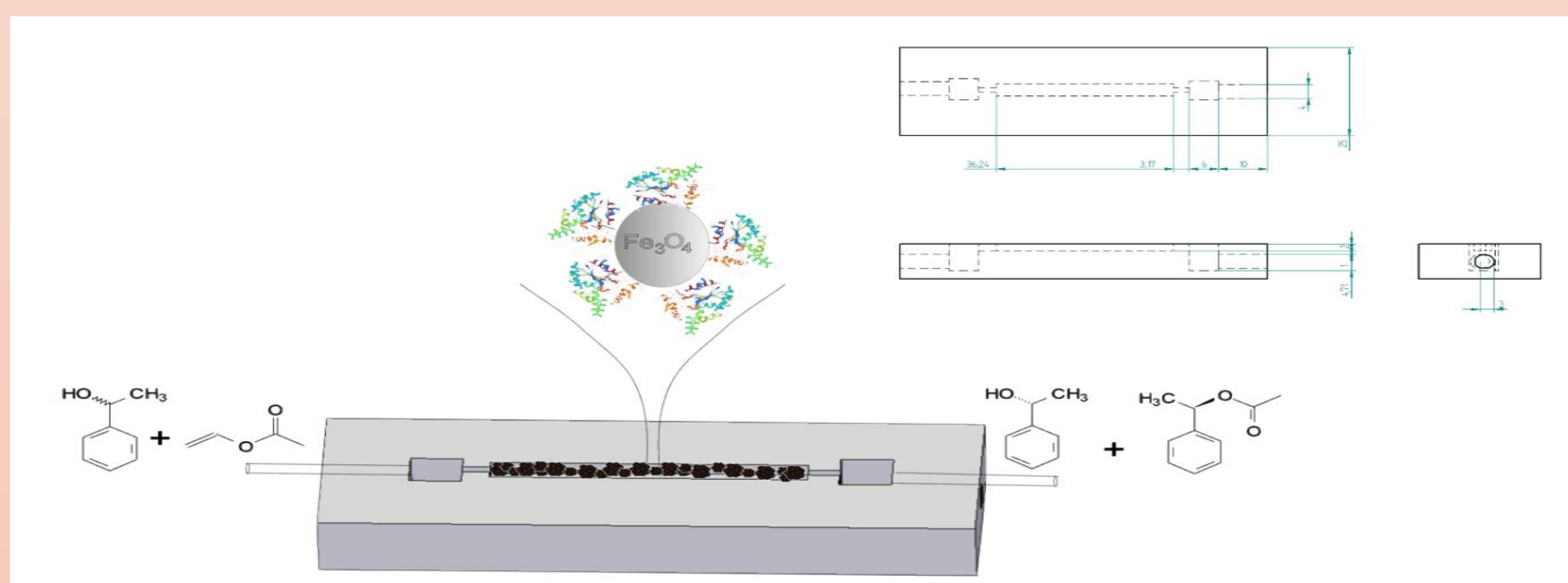
2. Ábra. Előállított magnetit TEM felvételei



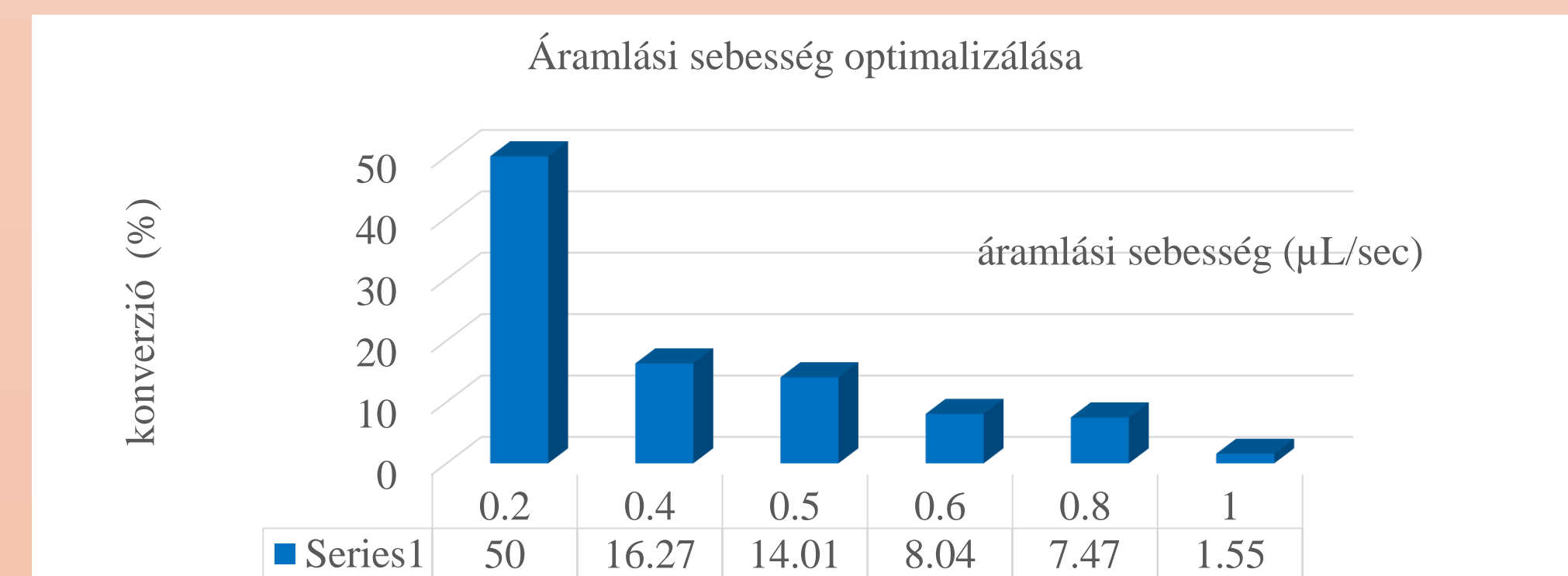
3. Ábra. A magnetit nanorészecskék méret eloszlása

Az enzimatis reakciók vizsgálata mikrofluidikus rendszerben

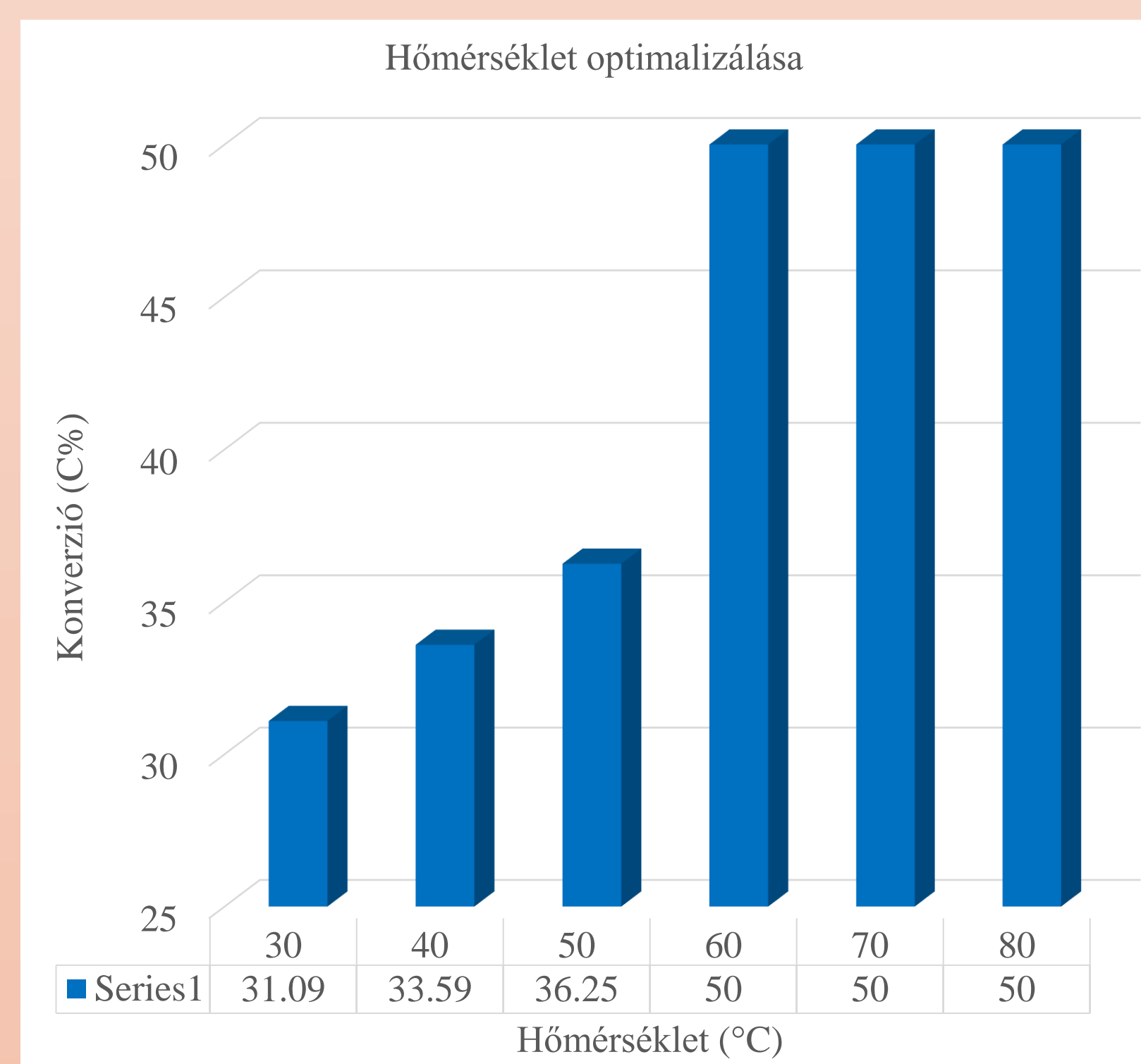
A tervezett mikrochip anyaga 10 mm vastag polikarbonát lapból készült, amely CNC gravírozási technikával lett megmunkálva és a következő méretekkkel rendelkezik: szélesség = 25 mm, hossz = 55,41 mm, a járat szélessége 3 mm, a járat mélysége 2 mm. A magnetitre immobilizált Cal-B enzimet a rac-1-fenil-etanol vinil-acetáttal végzett enzimatis kinetikai rezolválására használtam folyamatos áramlású mikrofluidikus rendszerben (4. ábra). A biokatalizátort használva a rac-1-fenil-etanol és a vinil-acetát térfogatarányát optimalizáltuk a vinil-acetát térfogatának (4-10 μ l) változtatásával. Az optimális térfogatarány 1:2 volt (1. Táblázat). A hőmérsékletet 30-80 °C (6.Ábra), az áramlási sebességet a 0,2-0,4-0,5-0,6-0,8-1 μ L/s tartományban vizsgáltam. A kiválasztott hőmérséklet 60 °C, az áramlási sebesség 0,2 μ L/s (5. Ábra).



4. Ábra. Enzimatis reakció mikrofluidikus rendszerben



5. Ábra. Konverzió változása az áramlási sebesség függvényében



6. Ábra. Hőmérséklet optimalizálás során kapott eredmények

1. Táblázat. Rac-1-fenil-etanol:vinil-acetát térfogatarányának optimalizálása során kapott eredmények

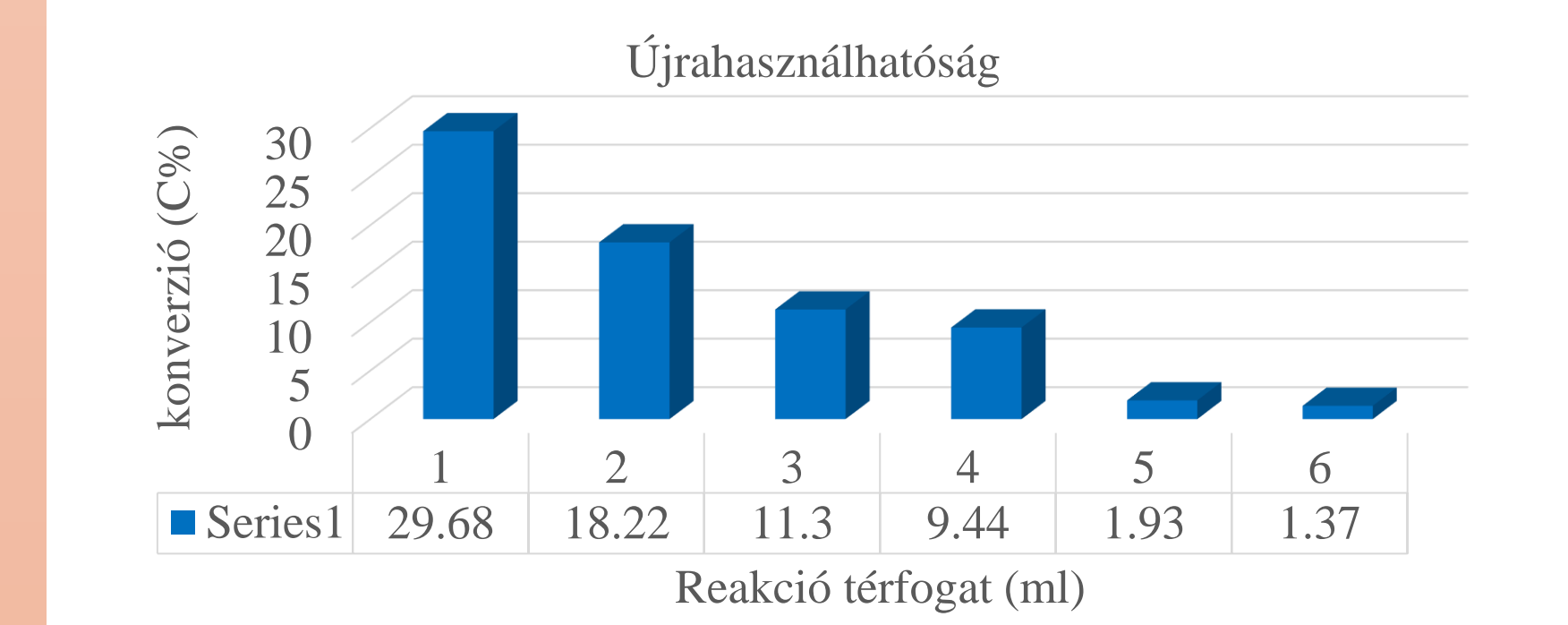
$V_{\text{Rac-1-fenil-etanol}}$ (μ L)	$V_{\text{Vinil-acetát}}$ (μ L)	Reakció-ido (h)	m_{Magnetit} (mg)	m_{Enzim} (mg)	Termék retenció ideje (min)		E_{sz} (%)	C (%)
					$T_{\text{S enantiomer}}$	$T_{\text{R enantiomer}}$		
2	4	2	88,50	0,37	16,39	17,48	45,32	31,4
		4					100	50
		6					100	50
	5	2	109	1,456			9,17	8,47
		4					7,66	7,18
		6					6,64	6,25
	6	2	130	1,736			2,04	2,01
		4					3,26	3,19
		6					2,37	2,33
	7	2	117	1,56			1,97	1,95
		4					7,87	7,37
		6					2,02	4,83
	8	2	118	1,57			3,99	3,88
		4					3,22	2,8
		6					5,69	5,43
	10	2	82,6	2,28			0,75	0,75
		4					1,69	1,68
		6					2,14	2,12

A magnetit alapú biokatalizátor újrahaználhatósága

Vizsgáltam az előállított biokatalizátor újrafelhasználhatóságát az optimális körülmények között. Az acilezési reakciót 60 °C-on hajtottam végre 0,2 μ L/s áramlási sebességgel és 1:2 fenil-etanol:vinil-acetát térfogataránnyal (7.Ábra).

Különbözö alkoholszármazékok acilezési reakciói

A magnetit biokatalizátort különböző királis alkoholok (4-fluor-fenil-etanol, 4-klór-fenil-etanol, 4-Bróm-fenil-etanol, 3-nitro-fenil-etanol, 4-nitro-fenil-etanol, benzotiofén-3-etanol) acilezésében teszteltük³. Az optimális feltételek: 2 mg alkohol/ml, 2 ekv. vinil-acetát és 1 ml hexán, 3-nitro- és 4-nitro-fenil-etanol esetén: 2 mg alkohol/ml, 2 ekv. vinil-acetát és 1 ml diizopropil-éter (2. Táblázat). A 4-Bróm-fenil-etanol (2. Táblázat) esetében 6 óra elteltével érte el a maximális 50%-os konverziót. A benzotiofén-3-etanol esetében a konverzió értéke 41,93% -ot éri el (3. Táblázat).



7. Ábra. Biokatalizátor újrahaználhatóságára vonatkozó paraméterek és eredmények

2. Táblázat. Rac-4-Br-1-fenil-etanol acilezési reakciója során kapott eredmények

Reakció-ido (h)	V_{h} (μ L)	V_{rac} (μ L)	V_{VA} (μ L)	m_{Magnetit} (mg)	m_{Enzim} (mg)	Termék retenció ideje (min)		E_{sz} (%)	C (%)
						$T_{\text{S enantiomer}}$	$T_{\text{R enantiomer}}$		
2								5,58	5,34
4	1000	1,40	2,80	108	1,75	9,26	9,67	50,77	33,90
6								>99	50

3. Táblázat. Rac-benzotiofén-3-etanol acilezési reakciója során kapott eredmények

Reakció-ido (h)	V_{h} (μ L)	V_{rac} (μ L)	V_{VA} (μ L)	m_{Magnetit} (mg)	m_{Enzim} (mg)	Termék retenció ideje (min)		E_{sz} (%)	C (%)
						$T_{\text{S enantiomer}}$	$T_{\text{R enantiomer}}$		
2								11,51	10,41
4	1000	1,62	3,24	107	1,73	10,01	11,08	38,13	27,81
6								71,50	41,93

4. Táblázat. Az acilezési reakció során használt paraméterek és reagens mennyiségek

Szubsztát	Szerkezet	Alkohol származékok - Paraméterek, mennyiségek		V_{Hozs} (μ L)	$V_{\text{Vinil-acetát}}$ (μ L)	T ($^{\circ}$ C)	Q_{v} (μ L/sec)	Reakció-ido (h)
		$V_{\text{szubsztát}}$ (μ L)	$V_{\text{Vinil-acetát}}$ (μ L)					
Rac-1-fenil-etanol		2	4					
Rac-4-F-1-fenil-etanol		1,80	3,60					
Rac-4-Cl-1-fenil-etanol		1,70	3,40	1000	-			6
Rac-4-Br-1-fenil-etanol		1,40	2,80			30	0,20	
Rac-benzotiofén-3-etanol		1,62	3,24					
Rac-3-nitro-1-fenil-etanol		1,53	3,06					
Rac-4-nitro-1-fenil-etanol		1,57	3,14			1000		8

Következtetés

A Cal-B enzimet immobilizáltam a magnetitre. Az előállított magnetit biokatalizátor komplexet a rac-1-fenil-etanol vinil-acetáttal történő átészterezési reakciójában teszteltem folyamatos mikrofluidikai rendszerben. A biokatalizátor újrafelhasználhatóságát egy acilezési reakcióban vizsgáltam az optimalizált reakciókörülmények között. Az acilezési reakciót más alkoholokkal (4-fluor-fenil-, 4-klór-fenil-, 4-bróm-fenil-, 3-nitro-fenil- és 4-nitro-fenil-1-etanol, benzotiofén-3-1-etanol) is elvégeztem vinil-acetátot használva acilező ágensként.

Bibliográfia

- S.M. Scott, A.Zulfikur: Fabrication Methods for Microfluidic Devices: An Overview, *Micromachines*, 2021; 12(3): 319,1-38.
- M. Abboud, S.Youssef, J. Podlecki, R. Habchi, G. Germanos, A. Foucaran: Superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles, synthesis and surface modification, *Materials Science in Semiconductor Processing*, 39, 2015, 641-648.
- C. A. Gal, L. E. Barabás, J. H. Bartha Vári et al., Lipase on carbon nanotubes – an active, selective, stable and easy-to-optimize nanobiocatalyst for kinetic resolutions, *Reaction Chemistry & Engineering* 6 (2021) 2391-2399.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm az Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpontnak a támogatást, amellyel segítették a munkámat.