



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem  
Villamosmérnöki és Informatikai Kar

# **Mikroreaktorok modellezése, megvalósítása és karakterizálása chipméretű laboratóriumokban**

**Doktori értekezés téziséhez**

Szerző: Ender Ferenc

Témavezető: Prof. Székely Vladimír, az MTA rendes tagja

Elektronikus Eszközök Tanszéke  
Budapest, 2016.



# 1. Bevezetés

Gordon Moore az integrált áramkörök fejlődési ütemére vonatkozó jóslata ma már sztenderd mérőszámnak tekinthető. Az integrált áramköri technológia elmúlt 50 évben tapasztalt töretlen fejlődése áttörést eredményezett a kapcsolódó technológiai ágazatokban is: a finom mechanikában és a mikrotechnológiában. A 70-es években, röviddel az első nyomásmérő szenzorok megjelenése után, a biológiai minták kezelése is lehetővé vált chip méretű eszközön, megteremtve ezzel a *chipméretű laboratórium* (Lab-on-a-Chip, LoC) fogalmát.

A kémiai, különösen a biokémiai analízis területén kiemelt szerep jut a mikrofluidikai és LoC technológiáknak, első sorban azokban az esetekben, amikor az eszköz mikroreaktor formájában közvetlen ipari vagy klinikai hasznosításra kerül. Az ilyen eszközökben a mikroméret és az arányos méretcsökkentés számos hatása előnyösen használható fel, az enzimatisz folyamatok költséghatékonyá tehetők a makroméretű megvalósításhoz képest. A mikroreaktorok olyan, mikrotechnológiával készülő reakciórendszerek, melyek mérete legalább az egyik dimenzióban a szubmilliméteres tartományba esik. Számos mikroreaktor tovább bontható olyan funkcionális algegyiségekre (például hordozó részecskékre) melyek szubmikronos tartományba esnek [1].

A mikroreaktor technológia elterjedése előtt a tradicionális kémiai szintézist és analízist tartály reaktorokban hajtották végre, amikben a reagensek keverése rázással vagy lapátkeveréssel történt. Az arányos méretcsökkentés hatásainak kiaknázása által mikroreaktoros környezetben jobb hatékonysággal hajthatók végre a reakciók, mint a hagyományos makroszkopikus reaktorokban. Míg a klasszikus rázatott lombikos reakció paraméterei *helyfüggek*, a mikroreaktorban zajló folyamatok kizárólag *időfüggést* mutatnak, azaz a termelési volumen növelése csupán az idő függvénye. A mikroreaktoros folyamatok ezáltal gyorsabban fejleszthetők. Mindemellett a mikroreaktoros környezetben homogénebb hőmérsékleteloszlás, egyenletesebb keveredés érhető el, a nagyobb felület-térfogat arány hatékonyabb, míg a rövidebb diffúziós távolságok gyorsabb reakciót eredményeznek. A biokatalitikus al-

kalmazások esetén az enzim molekulák nanohordozók felületén a reaktorban rögzíthetők, így a katalizátor környezetbarát módon újrahasznosítható. A mikrofluidika eszköztára segítségével a mikroreaktorokban precíz folyadékkezelés, ezáltal kiváló ismételtetés és reprodukálhatóság biztosítható. A mikroreaktor technológia egyes tervezési kérdései továbbra is megválaszolásra várnak az elmúlt évtizedben tapasztalt gyors fejlődés ellenére. A széleskörben használt kinetikai paramétereket a Michaelis-Menten modellből származtatjuk, ami azonban kizárólag álló fázisú reakció esetén érvényes. Mikroreaktor rendszerek esetén a folyadék áramlás hatását is figyelembe kell venni. További nehézséget okoz az enzimek rögzítése, egyrészt a rögzítési mechanizmus az enzimaktivitásra kifejtett hatása, másrészt az egymáshoz képest relatíve elmozduló reagens és katalizátor fázisok miatt. Mikroreaktorok bizonyos típusainál a rögzített biokatalizátort közvetlenül a reakció előtt töltik az előre kialakított reaktortérbe. Mikroméret esetén lényeges, egyben kihívást jelent ennek a feltöltésnek a reprodukálhatósága és a töltet mennyiségének precíz meghatározása.

Az áramlási sebesség, szubsztrát koncentráció, a kialakult töltet morfológiája szintén befolyásolhatja a reaktorparaméterek hosszútávú stabilitását. Az áramlásos mikroreaktorok termikus tervezése kapcsán problémákat vehetnek fel a mikroméretre jellemző axiális hővezetés, viszkózus disszipáció és az alacsony Reynolds szám okozta hatások.

## 2. Célkitűzések

Egyes biológiai felhasználású LoC eszközök, például csepp alapú polimeráz láncreakció mikroreaktorok vagy nanokaloriméterek esetén a termikus tervezés kulcsfontosságúnak tekinthető. Számos megközelítés került bemutatásra mikroreaktor eszközök termikus modellezése kapcsán, de jelenleg nem létezik hatékony modell mozgó csepp mikroreaktorok termikus tervezéséhez.

**Első célkitűzés:** Egy olyan termikus kompakt modell megalkotása, amely közvetlen bemenetet biztosít egy későbbi tranziens analízis számára és egy időfüggő kémiai reakció (pl. enzimatis katalízis) hőtermelését is képes

figyelembe venni. A számítás kimenete a reaktor térbeli és időbeli hőmérsékleteloszlása.

Enzimatis biokatalízist több ízben demonstráltak már töltött ágyas mikroreaktorban, de a kinetikai paraméterek meghatározásához szükséges méréssel meghatározható mennyiség, a biokatalitikus töltet koncentrációjának meghatározására nincs sztenderdizált megoldás.

**Második célkitűzés:** Egy olyan in-situ és valós idejű módszer megalkotása, ami lehetővé teszi a (mágneses) biofunkcionalizált nanorészecske töltet mennyiségének meghatározását az áramlásos reakciókamrában.

A biofunkcionalizált hordozóból (pl. nanorészecskéből) felépülő réteg morfológiája az áramlás okozta viszkózus erők következtében megváltozhat, következésképp az áramlás hatással lehet a réteg biokatalitikus aktivitására.

**Harmadik célkitűzés:** A biofunkcionalizált részecskékből álló réteg struktúrájában bekövetkező változások hatásainak tanulmányozása, továbbá egy olyan mérőszám megalkotása, ami a strukturális változások mértékét jellemzi. A mérőszám segítségével a megismételhető mérések követelményeinek meghatározása az adott rendszerre.

A biofunkcionalizált részecske mérete kétségkívül hatással van az elérhető biokatalitikus aktivitásra, habár a különböző méretű részecskék hatását azonos reaktorban még nem vizsgálták.

**Negyedik célkitűzés:** A mikroreaktorba töltött különböző méretű részecskék hatásának vizsgálata az enzimek biokatalitikus aktivitására illetve a reaktorba tölthető részecskék össz mennyiségére nézve.

Enzimatis katalízis során a termékmolekula képződése után az enzim a kiindulási állapotba reverzibilisen visszaállítható. Ha az enzim a reaktor térben rögzített állapotban van jelen, a biokatalizátor folyamatosan visszanyerhető, így a reaktorok hatékonyan és környezetbarát módon használhatóak.

**Ötödik célkitűzés:** Chip méretű mikroreaktorban, nanorészecskére rögzí-

tett enzimek kinetikai paramétereinek megállapítása és egy olyan módszer kidolgozása ami az enzim reverzibilitását kihasználva multiparaméteres enzimkinetikai méréseket tesz lehetővé.

### 3. Új tudományos eredmények összefoglalása

**1. tézis. Termikus kompakt modell mozgó csepp mikroreaktorokhoz**  
*Új kompakt termikus modellt dolgoztam ki kétfázisú áramlású mikrocsatornák termikus modellezésére. A modell segítségével a csatornában kialakuló helyés időfüggő hőmérsékleti profil számolható ki a csatornában haladó csepp-mikroreaktor által termelt vagy a csatornafalból a cseppbe átadott hő, valamint a kétfázisú közegáramlás sebességének figyelembevételével. A csepp-mikroreaktor által termelt hőmennyiség a reaktorban zajló időfüggő reakció (pl. enzimatis katalízis) következménye.[S1],[C1],[C2]*

1. A modell egy elemi egysége hővezető elemekből épül fel és a kapcsolt kapacitású áramkörök elvét felhasználva írja le a konvektív hőtranszferet olyan módon, hogy a mikrocsatornán belüli áramlás irányának megfelelően, a szomszédos elemi egységbe a léptetési idő alatt a hővezető elemeken keresztül átáramoltatott hő az axiális hőkonvekció mértékével egyezik meg. A léptetési frekvencia az áramlási sebesség függvénye. Az elemek a csatorna geometria négyzetes hálójára illeszkednek. Megmutattam, hogy a modell akár a hálóra illeszkedő 2D, axiszimmetrikus hővezető elemek, akár a csomópontokra illeszkedő ekvivalens áramkörre is leképezhető. Megmutattam, hogy e két realizáció gyakorlatilag ekvivalens (az eltérés az általam vizsgált benchmark problémák esetén 2.65%-nál kisebbnek adódott). A modell ekvivalens áramköri helyettesítő képe az ipari gyakorlatban is használatos áramkörszimulációs programokkal használható. Fordítóprogramot készítettem a kétféle modell-reprezentáció közötti konverzió végrehajtására.
2. Megállapítottam, hogy a modell az áramlást jellemző Reynolds szám mely intervallumában érvényes. Analitikus összefüggést adtam meg

ezen Reynolds szám tartomány felső határára és megállapítottam, hogy a jelenlegi modell  $Re = 7$  értékig érvényes. A modell által szolgáltatott hőmérsékleti profilokat több áramlási sebesség esetén összehasonlítottam azonos paraméterekkel beállított, részletes geometria modellel végrehajtott CFD szimulációk eredményeivel. Megállapítottam, hogy  $Re = 7$  érték alatt a részletes CFD modell és a kompakt modell segítségével számított értékek relatív eltérése az 5% – 7% tartományba esik. A kompakt modellel végzett szimulációkhoz szükséges számítási idő mintegy két nagyságrenddel csökkent a részletes CFD modellel végzett szimulációkhoz szükséges számítási időhöz képest.  $Re = 7$  érték felett a relatív hiba meredeken nőtt.

## **2. tézis. Mágneses részecskék mennyiségének in-situ meghatározása mikroreaktorban**

*Új, reprodukálható módszert dolgoztam ki chipméretű reaktorok reakciókamráinak mágneses nanorészecskével történő feltöltésére. A töltet lekötése a kamrákban mágneses tér segítségével valósul meg. Módszert dolgoztam ki a kamrában lekötött mágneses nanorészecskék mennyiségének in-situ és on-line meghatározására. A módszer alkalmazását lehetővé tevő mikroreaktor alapja egy módosított polidimetilsziloxán (PDMS) alapú mikrofluidikai struktúra, amelybe egy tekercs ágyazódik. Ezt külső passzív elektronikus alkatrészekkel kiegészítve egy rezonáns magnetométer tekercs elrendezés alakítható ki. Megállapítottam, hogy a magnetométer rezonanciafrekvenciája a tekercs mágneses terébe kerülő mágneses részecskék összmennyiségével arányos. [S2], [C3]*

1. 250 nm és 600 nm átmérőjű mágneses nanorészecskéket tartalmazó szuszpenziók felhasználásával megmértem a mikrofluidikai eszköz kamrájában csapdázható nanorészecskék tömegét. Megmutattam, hogy a kamrában csapdázható részecskék össz tömege 250 nm és 600 nm átmérőjű részecskék alkalmazása esetén közel azonos (az eltérés 2.7%). Igazoltam, hogy ugyanabban a kamrában a kétféle részecske 1 : 1 arányú homogén keverékből kialakuló csapdázott nanorészecske réteg szignifikánsan (17% – al) nagyobb tömegű, mint a csak egy részecskeméretet tartalmazó réteg.

### **3. tézis. Töltött ágyas mikroreaktorok karakterizálása**

*Chipméretű, töltött ágyas mikroreaktor platformot dolgoztam ki mágneses nanorészecskékre rögzített enzimek reakciókinetikájának vizsgálatára. A platform in-line optikai (UV-VIS) detektor segítségével lehetővé teszi a reakciókamrákban lezajló enzimkatalizált biotranszformációk valós idejű követését. [S3],[B1]*

1. Chipméretű laboratóriumban alkalmazható módszert dolgoztam ki enzimkatalizált folyamatok multiparaméteres végrehajtására. Az egyes reakcióparameter kombinációk jellemzése egymást követő mérési ciklusokkal történik. A ciklusok végrehajtása közben a nanorészecskéket külső mágneses tér köti le, így a teljes méréssorozat végrehajtása során a reakciókban ugyanazok a biokatalizátor molekulák vesznek részt. A mikrofluidikai chip ciklikus működtetésének első fázisa a reagensek teljes kimosása. Ezt követi a vizsgálandó enzimreakció megvalósítása a megváltoztatott paraméterekkel.
2. Megvizsgáltam a kamrák feltöltési folyamatának hatását a mérések reprodukálhatóságára. Megállapítottam, hogy a reakciókamrák feltöltése egy adott enzimes nanorészecske töltet-szuszpenzióval a lekötött biokatalitikus aktivitására vonatkoztatva 98%-nál nagyobb reprodukálhatósággal valósítható meg.
3. Megvizsgáltam változatlan töltet és azonos paraméterbeállítások mellett ciklikusan végrehajtott mérések ismételtetését. Megmutattam, hogy az így végrehajtott mérések a lekötött biokatalitikus aktivitásra vonatkozó ismételtetésége 98%-nál nagyobb.
4. Módszert dolgoztam ki a chip-reaktor biokatalizátor töltet optikailag észlelhető változásainak jellemzésére. A ciklikus méréssorozatban két egymástól független ciklust akkor tekintettem összehasonlíthatónak, ha a reaktortöltetek optikailag észlelhető változása 0 – 1 intervallumra normalizált skálán 0.35 érték alatti. Méréssel igazoltam, hogy e feltétel teljesülése esetén a mérés összes ciklusa függetlennek tekinthető, amennyiben a mérés első és utolsó, azonos paraméterekkel



végrehajtott ciklusa közötti eltérés a biokatalitikus aktivitásra vonatkozóan 5% alatti.

#### **4. tézis. Mikroreaktor kamra enzimkinetikai paramétereinek megállapítása**

*Több reakciókamrából álló chipméretű reaktor segítségével multiparaméteres méréseket hajtottam végre nanorészecskére rögzített fenilalanin ammónia-liáz (PAL) által katalizált reakciók jellemzésére. E mérések segítségével feltártam a PAL-katalizált reakció mikroáramlásos rendszerben jellemző tulajdonságait. [S3],[B1]*

1. Megállapítottam, hogy az általam vizsgált 600 nm illetve 250 nm átmérőjű részecskék esetén a mikrofluidikai reakciócellában végrehajtott biotranszformációk során a biokatalitikus aktivitás a funkcionizált nanorészecskék méretének csökkentésével nő. Méréssel kimutattam, hogy kétféle méretű részecskéből álló biner keverék (600 nm + 250 nm) esetén a biokatalitikus aktivitás további növekedése tapasztalható. [S2]
2. Multiparaméteres mérésorozattal megállapítottam a PAL biokatalitikus aktivitását a fenilalanin ammónia eliminációjában, és a szubsztrát oldat áramlási sebességének hatását az aktivitásra. Igazoltam, hogy a biokatalitikus aktivitás csak adott áramlási sebességig nő (a vizsgált rendszer esetén  $20 \mu\text{l min}^{-1}$ ), majd telítésbe kerül. Méréssel igazoltam, hogy a vizsgált tartományban az áramlási sebesség növelése során fellépő erők nem okoznak irreverzibilis változást az enzimaktivitásban.
3. Multiparaméteres mérésorozattal meghatároztam a fenilalanin PAL-katalizált ammónia eliminációjára jellemző enzimkinetikai állandókat  $20 \mu\text{l min}^{-1}$  szubsztrát áramlási sebesség esetén. Megállapítottam, hogy a tapasztalt reakciókinetika a Lilly-Hornby modellnek megfelelő, és a biokatalitikus aktivitás 2.75-ször magasabb, a számított  $K_m$  érték 3.64-szer alacsonyabb, a specificitási konstans 3.22-szer

magasabb mint az azonos paraméterek mellett, hagyományos rázattott lombikban végrehajtott reakció esetén.

## 4. A kutatási eredmények hasznosítása

**Kapilláriserek tápanyagtranszportjának kompakt modellje** ♦ A kapilláriserek tanulmányozása az élettudományok egyik mélyen kutatott területe. A kapilláriserekben történő anyagtranszport modellezése a kapilláris-szerv közötti interakciók megértésének kulcsa, kiváltképp a malignus tumorerok esetén, ahol a tumoros állományban fokozott tápanyag igény lép fel, ezáltal a kapilláris érhálózat sűrűsége megnövekszik. A kapilláris dugóáramlásban kialakuló belső cirkuláció megváltoztathatja a véráram és az érfal közötti lokális anyagcsere mértékét a lamináris áramlásban feltételezett értékekhez képest. A disszertációban bemutatott kapilláris dugóáramlást jellemző termikus kompakt modell alapján Németh és társai olyan kompakt modellt alkottak, ami a kapilláriserekben kialakuló anyagtranszportot írja le, tekintve hogy a kapilláriserekben tapasztalható áramlás az érvolumen kitöltő vörösvértestek által a kapilláris dugóáramláshoz hasonló viselkedést mutat [C4].

**A PAL enzim működési mechanizmusának vizsgálata** ♦ A disszertációban bemutatott MagneChip mikroreaktor eszköz segítségével Weiser és társai [S4] elsőként mutatták meg, hogy a PAL enzim katalizálja az aciklikus DL-propargilglicin (PG) ammónia eliminációját, miáltal (*E*)-pent-2-én-4-inoát keletkezik. A felfedezés a MIO enzimek szubsztrátpaletáját kiterjeszti az aciklikus aminosavakra. Mivel az aciklikus PG dezaminálása nem mehet végbe a PAL enzim működése kapcsán eddig feltételezett Friedel-Crafts mechanizmus által, így ez a kísérlet az enzim -MIO intermedieren történő működési mechanizmusát igazolja.

Az L-propargilglicin biotranszformációját a MagneChip eszközben hajtottuk végre a reakciókamrákban rögzített, mágneses nanorészecskékre kötött PAL enzim segítségével deuterált vízben. A termék, (*E*)-pent-2-én-4-inoát detektálása in-line UV-Vis módszerrel történt 242 nm-es hullámhosszon.

A reakció során elegendő termék képződött  $^1\text{H-NMR}$  vizsgálat számára, amely alátámasztotta a termék molekula jelenlétét.

## Saját közlemények

- [S1] Ferenc Ender, Márton Németh, Péter Pálovics, Andras Drozdy, and András Poppe. Thermal compact modeling approach of droplet microreactor based Lab-on-a-Chip devices. *Microelectronics Journal*, 45(12):1786–1794, 2014.
- [S2] Ferenc Ender, Diána Weiser, András Vitéz, Gábor Sallai, Márton Németh, and László Poppe. In-situ measurement of magnetic nanoparticle quantity in a microfluidic device. *Microsystem Technologies*, 21(12), 2015.
- [S3] Ferenc Ender, Diána Weiser, Botond Nagy, László Csaba Bencze, Csaba Paizs, Péter Pálovics, and László Poppe. Microfluidic multiple cell chip reactor filled with enzyme-coated magnetic nanoparticles - An efficient and flexible novel tool for enzyme catalyzed biotransformation. *Journal of Flow Chemistry*, Accepted, 2015.
- [S4] Diána Weiser, László Csaba Bencze, Gergely Bánóczy, Ferenc Ender, Róbert Kiss, Eszter Kókai, András Szilágyi, Beáta G Vértessy, Ödön Farkas, Csaba Paizs, and László Poppe. Phenylalanine Ammonia-Lyase-Catalyzed Deamination of an Acyclic Amino Acid: Enzyme Mechanistic Studies Aided by a Novel Microreactor Filled with Magnetic Nanoparticles. *ChemBioChem*, 16(16):2283–2288, 2015.

## Konferenciakiadványban megjelent előadás

- [C1] Ferenc Ender. Modelling of heat transfer in Taylor flow in microchannels. In *Design, Test, Integration and Packaging of MEMS/MOEMS (DTIP), 2012 Symposium on*, pages 164–170. IEEE, 2012.
- [C2] Ferenc Ender and Gusztav Hantos. Modelling of heat transfer in microdroplets as microreactors. In *18th International Workshop on Thermal Investigation of ICs and Systems*, 2012.

- [C3] Ferenc Ender, András Vitez, Gábor Sallai, Diána Weiser, and Márton Nemeth. In-situ measurement of nanoparticle quantity in microchambers. In *Design, Test, Integration and Packaging of MEMS/MOEMS (DTIP), 2015 Symposium on*, pages 1–6, apr 2015.
- [C4] Márton Németh, Ferenc Ender, and András Poppe. Modeling of Circular Mass Transport of Nutrients in Capillary Vessels Using Microfluidic Approach. In *Proceedings of First European Biomedical Engineering Conference for Young Investigators: ENCY2015*, pages 102–105, Budapest, 2015. Springer Singapore.

## Könyvfejezet

- [B1] Ferenc Ender, Diána Weiser, and László Poppe. Microfluidic multiple cell chip reactor filled with enzyme-coated magnetic nanoparticles. In Margarita Stoytcheva, editor, *Lab on a Chip (in press)*. InTech Open, Rijeka, 2016.

## Tézisekhez szorosan nem kapcsolódó közlemények

- [N1] Ferenc Ender, Gusztav Hantos, Dirk Schweitzer, and Peter Gabor Szabo. Thermal characterization of multichip structures. In *Thermal Investigations of ICs and Systems (THERMINIC), 2013 19th International Workshop on*, pages 319–322, sep 2013.
- [N2] Ferenc Ender, Hunor Santha, and Vladimir Szekely. Optimization of microfluidic flow sensors for different flow ranges by FEM simulation. In *Electronics Technology (ISSE), 2010 33rd International Spring Seminar on*, pages 308–313, may 2010.
- [N3] Ferenc Ender, Hunor Santha, and Vladimir Szekely. Flow sensor for microfluidic applications; Based on standard PWB technology. In *Electronics Technology, 2009. ISSE 2009. 32nd International Spring Seminar on*, pages 1–6, may 2009.

- [N4] Ferenc Ender and Vladimir Szekely. Thermal transfer impedance variations by forced convective heat transfer in microchannels. In *Design, Test, Integration and Packaging of MEMS/MOEMS (DTIP), 2012 Symposium on*, pages 119–124, apr 2012.
- [N5] Ferenc Ender, Gusztav Hantos, Andras Vitez, and Diana Weiser. In-situ thermal conductivity measurement of magnetic nanoparticle layers in Lab-on-a-Chip devices. In *Thermal Investigations of ICs and Systems (THERMINIC), 2014 20th International Workshop on*, pages 1–6, sep 2014.
- [N6] Márton Németh, Ferenc Ender, and András Poppe. Heat and mass transfer reduced order modeling approach of droplet microreactor based Lab-on-a-Chip devices. *Microelectronics Journal*, 46(12):1152–1161, 2015.
- [N7] Dirk Schweitzer, Ferenc Ender, Gusztáv Hantos, and Péter G. Szabó. Thermal transient characterization of semiconductor devices with multiple heat sources - Fundamentals for a new thermal standard. *Microelectronics Journal*, 46(2):174–182, 2015.

## Hivatkozások

- [1] Wolfgang Ehrfeld, Volker Hessel, and Verena Haverkamp. *Microreactors*. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, first edition, 2000.