

# Kisfrekvenciás ultrahang alkalmazása az enzimes textiltechnológiai folyamatokban

Szabó Orsolya Erzsébet és Csiszár Emília

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,  
Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék, Műanyag- és Gumiipari Laboratórium,  
1521 Budapest, Műegyetem rkp. 3.

## 1. Bevezetés

Az elmúlt években bebizonyosodott, hogy a heterogén fázisú enzimkatalizált folyamatok környezetbarát alternatívái lehetnek számos vegyszeres textiltechnológiai folyamatnak. Az enzimes kezelések enyhébb körülményeket igényelnek, mint a hagyományos eljárások, ezáltal kisebb energiafogyasztásúak, továbbá kevesebb és biológiailag lebontható szennyvizet termelnek. Az enzimkatalizált folyamatok fő hátránya, hogy időigényesek, ami egyrészt az enzim makromolekula kis diffúziós sebességével, másrészt a folyadék-szilárd fázishatáron kialakuló folyadékfilm ellenállásával magyarázható [1]. A közelmúltban publikált kutatási eredmények bizonyították, hogy az enzimes textiltechnológiai folyamatok sebessége kisfrekvenciás, nagy energiájú ultrahanggal jelentősen növelhető. Több közleményben szemléletesen bemutatták az ultrahang hatásmechanizmusát is [2]. Az *ultrahang-enzim* és *ultrahang-enzim-szubsztrát* rendszereket azonban eddig kevesen tanulmányozták.

Mivel a textiliparban legnagyobb mennyiségben a cellulóz lebontására képes enzimrendszert, a cellulázokat alkalmazzák főként kiváló fogású és viseletes külső megjelenésű termékek előállítására (*biofinishing*, *biopolishing*, *biostoning*), ezért indokolt volt, hogy ezt az enzimet használjuk az ultrahangos kísérleteinkben. Kutatómunkánkban a kisfrekvenciás ultrahang enzimaktivitásra gyakorolt hatását, majd a celluláz-cellulóz modellreakció eredményességének alakulását vizsgáltuk [3].

## 2. Az ultrahang tulajdonságai

Ultrahangnak a hallható hang feletti, 16–20 kHz-től 10 MHz frekvenciáig terjedő rezgéseket tekintjük. Megkülönböztetjük a nagyfrekvenciás, azaz diagnosztikai ultrahang tartományt (5–10 MHz) és a kisfrekvenciás, energia ultrahang tartományát (20–100 kHz). A kető közötti frekvencia tartományt leggyakrabban kémiai reakciókban alkalmazzák [2]. Az ultrahang keltésére a piezoelektromos jelenségen alapuló készülékek alkalmasak, melyekben a transzducer alakítja át az elektromos energiát hanggá. Az ultrahang energiáján és aktiváló hatásán alapuló szonokémiát az 1980-as évek közepétől tekintjük önálló diszciplínának [4–8].

A hang egy adott rugalmas közegben található tömegrészek mechanikai rezgése. A hanghullám a közeg részecskéivel érintkezve kimozdítja azokat nyugalmi állapotukból, és mozgási energiája átadásával a közegben lokális sűrűsödéseket és ritkulásokat idéz elő. Az akusztikus nyomás küszöbérték felett a ritkulási fázisban vákuum képződik és mikroméretű buborékok jönnek létre a közegben. A jelenséget akusztikus kavi-

tációnak nevezzük, amely főként a kisfrekvenciás ultrahang alkalmazásakor figyelhető meg.

A ritkulási fázisban keletkező buborékok egy vagy több hullámciklussal később a sűrűsödési fázisban – extrém magas lokális hőmérséklet és nyomás kialakulása közben – összeroppannak. Szilárd fázishatáron a kavitációs buborékok az összeroppanást követően folyadékkal töltődnek fel, amely a szilárd felszínre irányuló nagy sebességű mikroáramlásokat gerjeszt [9]. Ezek az ún. mikrojetek jelentősen fokozzák az anyagszállítási folyamatokat. Az ultrahang-enzim rendszer vizsgálatakor figyelembe kell venni, hogy a mikroáramlások nyíró hatása, továbbá az extrém lokális nyomás és hőmérséklet befolyásolhatja az enzim makromolekulák aktivitását.

## 3. A kisfrekvenciás ultrahang alkalmazása enzimreakciókban

Korábbi munkánkban részletes leírást adtunk az ultrahangról, az akusztikus kavitációról, továbbá az ultrahang lehetséges textilipari alkalmazásairól [9]. A kisfrekvenciás ultrahangot más területeken is használják homogén és heterogén fázisú enzimreakciók hatékonyságának javítására. A legtöbb megjelent cikkben az ultrahanggal segített reakciók eredményességének változását követik, majd az enzimaktivitás meghatározása nélkül arra a megállapításra jutnak, hogy az ultrahang fokozza az enzimaktivitást [10–12]. Csupán néhány cikkben jelzik, hogy az enzimek érzékenyek lehetnek a szonikálásra [13], és csak elvétve olvashatunk az ultrahang hatására bekövetkező enzimaktivitás csökkenésről [14–17].

*Guiseppe-Elie* és munkatársai [15] egy kereskedelmi forgalomban kapható glükóz-oxidáz enzimet tanulmányoztak, amelyet 23 kHz frekvenciájú ultrahang kádban kezeltek 10, 30 és 60 percig. Megfigyelték, hogy az ultrahang kezelés hatására a fehérje molekula másodlagos szerkezetében változás történt, ez azonban csak kismértékű enzimaktivitás csökkenéssel járt. *Özbek* és kollégái hat különböző enzim stabilitását vizsgálták kisfrekvenciás ultrahang jelenlétében [16]. Megállapították, hogy a működési paraméterek (mint például a besugárzás ideje, az akusztikus energia, a frekvencia és az enzimoldat viszkozitása) jelentősen befolyásolták az enzimek stabilitását, és az ultrahang kezelés során az enzim molekulák aktivitása az enzimek egyedi tulajdonságaitól függően széles tartományban változhat.

*Souza* [17] és munkatársai 40 kHz frekvenciájú ultrahang kádban kereskedelmi amiláz enzim aktivitását vizsgálták. Az enzimaktivitást 30 °C-tól 100 °C-ig terjedő hőmérséklet intervallumban mérték ultrahanggal ill. anélkül. Eltérő hatást tapasztaltak, amikor az ultrahangos kezeléseket az enzim hőmérséklet opti-

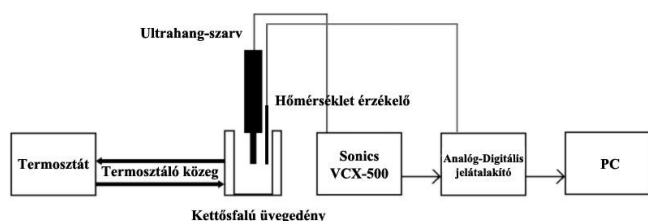
muma (50–60 °C) alatt, továbbá ha az optimális vagy afölötti hőmérsékleten végezték. Arra a következtetésre jutottak, hogy alacsonyabb hőmérsékleten – azaz az optimális tartomány alatt – az ultrahang növelte az enzimaktivitást a szonikálás okozta hőmérséklet emelésével. Ugyanakkor optimális és afölötti hőmérsékleten az ultrahang (tovább növelve a közeg hőmérsékletét) csökkentette az enzimaktivitást. Más cikkekben az ultrahang enzimaktivitásra gyakorolt hatását csak egy-egy kiválasztott rövidebb kezelési idő (10–30 perc), vagy alacsonyabb energiasűrűség értéken vizsgálták, majd az eredményekből az ultrahang általános enzimaktiváló hatására következtettek. Ez megtevesztő lehet, hiszen hosszabb kezelési időt alkalmazva, vagy más energia- és hőmérséklet-tartományban az enzim viselkedése és eredményessége eltérő is lehet [18].

Kutatómunkánkban fontosnak tartottuk, hogy az ultrahang kezelés hatását egy választott modellreakcióban vizsgáljuk, először az enzimaktivitásra, majd a reakció hatékonyságára fókuszálva. Egy kereskedelmi forgalomban kapható és az ipari gyakorlatban elterjedten használt celluláz enzim aktivitását jellemeztük ultrahangos térben, majd a celluláz–cellulóz modellreakció eredményességét vizsgáltuk ultrahanggal és anélkül.

#### 4. Kísérleti munka

A kísérletekben fonalgomba eredetű, a *Trichoderma reesei*-vel termeltetett Celluclast 1.5 L (Novozymes) celluláz enzimkeveréket alkalmaztunk az enzim optimális működéséhez szükséges hőmérséklet és pH tartományban (50 °C, pH=5). Szubsztrátumként 100 %-os tiszta cellulóznak tekinthető fehérített pamutszövetet használtunk (Testfabrics Inc.). A modellreakcióban a golyós malomban örölt szövet 800–1000 µm szemcseméretű frakciójával dolgoztunk.

Az ultrahangos kezelésekhöz horn típusú reaktort használtunk (Sonics & Materials, Vibra-Cell VCX-500 modell), amely 40 kHz frekvenciájú ultrahangot bocsátott ki (1. ábra). A hang amplitúdójának maximális értéke 124 µm, amely százalékosan állítható a készüléken. A kísérleteket egy termosztálható kettősfalú üvegreaktorban végeztük, ahol a horn vége és az üvegedény alja közt egy hullámhossz volt a távolság. A hanghullámok hatásának fokozása céljából acél korong reflektort alkalmaztunk, amely a hanghullámok teljes visszaverését biztosítja.



1. ábra. Az ultrahang horn reaktor és a hozzá kapcsolódó berendezések

Az ultrahang-enzim és az ultrahang-enzim-szubsztrát rendszer vizsgálata előtt kalorimetriás módszerrel jellemeztük az ultrahangos berendezés hatékonyságát [19]. 40, 60 és 80 % amplitúdó értékeken 10 perces szonikálás során rögzítettük a készülék által felvett elektromos teljesítményt ( $P_{el}$ ) és mértük a desztillált víz hőmérsékletének változását. Ez utóbbiból az

akusztikus teljesítményt az alábbi összefüggés alapján számoltuk ki:

$$P_{ac} = (dT/dt)_{t=0} \cdot m \cdot c_p$$

ahol  $P_{ac}$  az akusztikus teljesítmény (W),  $m$  (kg) és  $c_p$  ( $\text{kJ} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ) a kezelt desztillált víz tömege és a hőkapacitása,  $(dT/dt)_{t=0}$  pedig az idő-hőmérséklet függvény kezdeti meredeksége ( $\text{K} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Az akusztikus teljesítmény és a készülék által felvett elektromos teljesítmény hányadosa ( $\eta = P_{ac}/P_{el}$ , %) megadja a készülék hatékonyságát.

Az ultrahang enzimaktivitásra gyakorolt hatásának meghatározása céljából a celluláz enzimoldatot 40, 60 és 80 % amplitúdón kezeltük egy órán át reflektorral és anélkül. A kezelést a cellulóz hidrolízise mintát vettünk a celluláz enzimek összaktivitásának, azaz szűrőpapír lebontó aktivitásának a meghatározásához [20, 21]. Kontrollként mágnesesen kevertetett rendszert alkalmaztunk.

A celluláz–cellulóz modellreakcióban  $f = 1:200$  fűrdőarányt alkalmazva darált fehérített pamut enzimes hidrolízist vizsgáltuk. A szonikálást az előzőekhez hasonlóan végeztük. A reakciót a cellulóz hidrolízise során oldatba jutó redukáló végcsoportot tartalmazó oligomerek kolorimetriás mérésével követtük [21]. Minden mérést legalább háromszor megismételtünk.

#### 5. Eredmények

##### 5.1. Az ultrahang horn reaktor jellemzése kalorimetriás módszerrel

Az I. táblázatban foglaltuk össze a kalorimetriás módszerrel meghatározott akusztikus teljesítmény értékeket ( $P_{ac}$ ), a készülék által felvett elektromos teljesítményt ( $P_{el}$ ), továbbá ezek hányadosát, amely a készülék hatékonyságát ( $\eta$ ) jellemzi. Az eredmények alapján megállapítható, hogy jelentős az energia veszteség a szonikálás során. 40 % amplitúdó értéken a készülék által felvett teljesítmény 32,1 %-a, míg 60 és 80 % amplitúdó értékeken 34,6 % és 39,8 %-os a veszteség. A kalorimetriás vizsgálat eredményei azt is jelzik, hogy reflektor alkalmazása nem változtatja meg jelentősen az ultrahangos rendszer hatékonyságát.

I. táblázat. Az ultrahangos berendezés elektromos teljesítmény felvétele, akusztikus teljesítménye és hatékonysága különböző amplitúdó értékeken, reflektorral és anélkül

Amplitúdó (%) <sup>1</sup>	Reflektor nélkül			Reflektorral		
	$P_{el}$ (W)	$P_{ac}$ (W)	$\eta$ (%)	$P_{el}$ (W)	$P_{ac}$ (W)	$\eta$ (%)
40	30,3	20,6	67,9	29,5	19,9	67,5
60	62,6	40,9	65,3	62,2	40,5	65,1
80	91,6	55,1	60,1	96,0	54,4	56,7

<sup>1</sup> Amplitúdók: 40 %: 49,6 µm; 60 %: 74,4 µm; 80 %: 99,2 µm

##### 5.2. Az ultrahang hatása a celluláz enzim aktivitására

A celluláz enzim összaktivitása a cellulóz (szűrőpapír) hidrolízise során oldatba kerülő redukáló végcsoportot tartalmazó cukor-oligomerek mennyiségével arányos [21]. A Celluclast 1.5 L enzim kiindulási aktivitása 83 FPU/ml volt, amely az egy órán át tartó kontroll mérést követően csupán kismértékben, 78 FPU/ml-re csökkent. Ezzel szemben, az ultrahang kezelés hatására jelentős aktivitás csökkenés következett be (II. táblázat). 40 % amplitúdón kezelve 12–16 %-

os, 60 és 80 % amplitúdó értéken pedig 19-26 %-os enzimaktivitás csökkenést mértünk. A hanghullámok fokozott visszaverődése ellenére reflektor jelenlétében nem tapasztaltunk további jelentős aktivitás romlást.

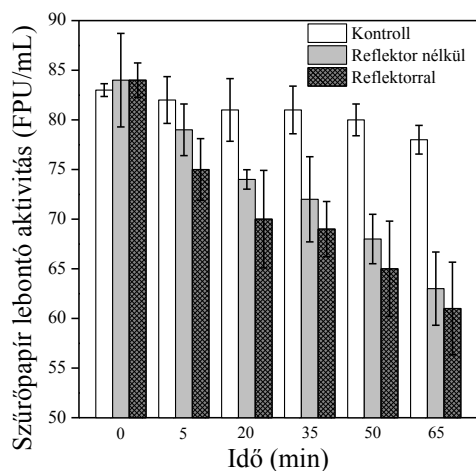
II. táblázat. Az ultrahang Celluclast 1.5 L enzim szűrőpapír lebontó aktivitására gyakorolt hatása az amplitúdó függvényében, 1 órás kezelést követően, reflektorral és anélkül

Amplitúdó (%)	Szűrőpapír lebontó aktivitás (FPU/ml) <sup>1,2</sup>	
	Reflektor nélkül	Reflektorral
40	73 ± 3,7	67 ± 3,1
60	67 ± 2,5	66 ± 2,4
80	63 ± 3,7	61 ± 4,7

<sup>1</sup> Kiindulási aktivitás: 83 ± 2,2 FPU/ml

<sup>2</sup> Aktivitás a kontroll kezelést követően: 78 ± 1,5 FPU/ml

A legnagyobb enzimaktivitás romlást 80 % amplitúdó értéken mértük (II. táblázat). Az aktivitás változás alakulását az idő függvényében 80 % amplitúdó esetén a 2. ábra mutatja. Látható, hogy az alkalmazott egy órás kezelés során a szűrőpapír lebontó aktivitás folyamatosan csökkent. Ennek több oka lehet: magasabb amplitúdón az intenzívebb kavitáció következtében jelentősebb az enzimek hődenaturációja; a mikroáramlások okozta nyíró hatás konformáció változást okozhat; továbbá a kavitáció során szabadgyökök keletkezhetnek, amelyek szintén befolyásolhatják az enzimek szerkezetét. A legjelentősebb enzimkárosító tényező azonban a közeg hőmérsékletének növekedése lehet. A celluláz enzimkeverék alkotóinak – az endo- és exoglükánázoknak, cellobiohidrolázoknak és β-glükozidázoknak – eltérő a hőstabilitása. Az endo-glükánázok a legnagyobb hőstabilitással rendelkező celluláz enzimkomponensek, így valószínűleg ezek az enzimek károsodnak legkésőbb a szonikálás során [22]. A többi enzimkomponens érzékenyebb a hőmérséklet emelésére, így ezek hőkárosodása lehet az enzimaktivitás csökkenés elsődleges oka.



2. ábra. A Celluclast 1.5 L enzim szűrőpapír lebontó aktivitásának változása az ultrahangos kezelés időtartamának a függvényében, 80 % amplitúdón, reflektorral és anélkül.

Kontroll: mágnesesen kevertetett rendszer

### 5.3. A ultrahang hatása a celluláz–cellulóz modellreakció eredményességére

Az ultrahang enzimaktivitásra gyakorolt hatását követően megvizsgáltuk, hogy az ultrahang hogyan befolyásolja a celluláz–cellulóz modellreakció eredményességét. A cellulóz enzim hidrolízisét az oldatban mérhető redukáló cukrok mennyiségével jellemeztük. A kontroll mérés során 0,19 mg/ml koncentrációban termelődik redukáló cukor egy órás hidrolízis követően (III. táblázat). Ultrahangot alkalmazva a hidrolízis hatékonysága jelentősen nőtt, reflektor nélkül 40 % amplitúdón 0,31 mg/ml, míg 60 és 80 % amplitúdón 0,71 és 0,75 mg/ml a végtermék koncentráció a kezelőoldatban. A reflektor hullámerősítő hatása alacsonyabb amplitúdó értéken érvényesül leginkább, 40 % amplitúdón 0,56 mg/ml, 60 és 80 % amplitúdón pedig 0,82 és 0,86 mg/ml termék koncentrációt eredményez.

III. táblázat. Fehértett darált pamut egy óráig tartó celluláz enzim kezelése során felszabaduló redukáló cukor mennyisége az ultrahang amplitúdójának függvényében, reflektorral és anélkül

Amplitúdó (%)	Redukáló cukor koncentráció (mg/ml) <sup>1</sup>	
	Reflektor nélkül	Reflektorral
40	0,31 ± 0,02	0,56 ± 0,05
60	0,71 ± 0,06	0,82 ± 0,03
80	0,75 ± 0,06	0,86 ± 0,05

<sup>1</sup> Kontroll mérés: 0,19 ± 0,01 FPU/ml

A II. és III. táblázat alapján megállapítható, hogy az ultrahang jelentősen fokozza az enzim hidrolízis hatékonyságát annak ellenére, hogy a szonikálás során az eredetihez képest 12–26 %-kal csökkent a celluláz enzim aktivitása. A darált pamut szemcsék jelenléte – mint heterogén fázisú rendszer – fokozott kavitációt eredményez [2]. A pamut szemcséje felszíne közelében kialakuló intenzív mikroáramlásokkal az enzimmolekula diffúziója gyorsabbá válik, és a fázishatáron kialakult folyadékfilmen átjutva gyorsabban éri el a pamut felszínét. Az ultrahang segíti a hidrolízis termékek eltávolítását is. Összefoglalva tehát elmondható, hogy a celluláz–cellulóz modellreakció eredményességét ultrahang alkalmazása esetén két folyamat határozza meg, és ennek megfelelően a keletkező bomlástermékek koncentrációja az (1) ultrahang enzimaktivitást csökkentő és (2) diffúziót gyorsító hatásának az eredményeként alakul ki.

### 6. Összefoglalás

Kutatómunkánkban tanulmányoztuk a kisfrekvenciás ultrahangnak a celluláz enzim aktivitására és a celluláz–cellulóz modellreakció eredményességére gyakorolt hatását. A mérési eredmények alapján megállapítható, hogy az ultrahang – az amplitúdótól függően – jelentősen, 12–26 %-kal csökkenti a celluláz enzim szűrőpapír lebontó aktivitását. Az enzimaktivitás csökkenés ellenére a celluláz–cellulóz modellreakció ultrahangos rendszerben sokkal eredményesebb volt, mint a kontrollként szolgáló mágnesesen kevertetett rendszerben, és az amplitúdótól függően 63, 274 és 295 %-os termék koncentráció növekedést eredményezett. Refle-

tor jelenléte elsősorban 40 % amplitúdón fokozza (kb. 195 %-kal) a kontrollhoz képest a termékfejlődést, de nagyobb amplitúdók esetén is mérhető az ultrahang pozitív hatása.

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak az OTKA-nak a kutatás támogatásáért (Projekt azonosító: K82044). A munka szakmai tartalma kapcsolódik a „Minőségorientált, összehangolt oktatási és K+F+I stratégia, valamint működési modell kidolgozása a Műegyetemen” c. projekt szakmai célkitűzéseinek megvalósításához. A projekt megvalósítását az ÚMFT TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002 programja támogatja.

### Felhasznált irodalom

1. V.G. Yachmenev, E.J. Blanchard, A.H. Lambert, *Ultrasonics*. 42, 87-91 (2004)
2. T.J. Mason, *Chemistry with ultrasound*, Elsevier Applied Science, London (1990)
3. O.E. Szabó, E. Csiszár, *Carbohydr. Polym.* 98, 1483-1489 (2013)
4. J. Curie, P. Curie, *C. R. Acad. Sci.* 91, 294-297 (1880)
5. F. Galton, *Inquiries into Human Faculty and Development*. MacMillan, London (1883)
6. B. Török, Á. Molnár, *Kémiai átalakulások mikrohullámú és szonokémiai aktiválással*, 82. kötet, Akadémiai Kiadó, Budapest (1996)
7. R.C. Asher, *Ultrasonics*. 25(1), 17-19 (1987)
8. V.S. Moholkar, V.A. Nierstras, M.M.C.G. Warmoeskerken, *AUTEX Research J.* 3(3), 129-138 (2003)
9. O.E. Szabó, E. Csiszár, *Magyar Textiltechnika*, LXIV(3), 99-102 (2011)
10. C. Basto, T. Tzanov, A. Cavaco-Paulo, *Ultrason. Sonochem.* 14, 350-354 (2007)
11. B.E. Wood, H.C. Aldrich, L.O. Ingram, *Biotechnol. Prog.* 13(3), 232-237 (1997)
12. Z.M. Tian, M.X. Wan, S.P. Wang, J.Q. Kang, *Ultrason. Sonochem.* 11, 399-404 (2004)
13. Z.-L. Yu, W.-C. Zeng, W.-H. Zhang, X.-P. Liao, B. Shi, *Ultrason. Sonochem.* 21, 93-936 (2014)
14. P.B. Subhedar, P.G. Gogate, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 101, 108-114 (2014)
15. A. Guiseppi-Elie, S.-H. Choi, K.E. Geckeler, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 58, 118-123 (2009)
16. B. Özbek, K.Ö. Ülgen, *Process Biochem.* 35, 1037-1043 (2000)
17. M. Suoza, E.T. Mezardi, E. Zimmerman, E.X. Leaes, M.M. Bassaco, V. Dal Prá, E. Foletto, A. Cancellier, L.M. Terra, S.L. Jahn, M.A. Mazutti, *Ultrason. Sonochem.* 20, 89-94 (2013)
18. P.B. Subhedar, P.R. Gogate, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 101, 108-114 (2014)
19. L.C. Hagenson, L.K. Doraiswamy, *Chem. Eng. Sci.* 53(1), 131-148 (1998)
20. T.K. Ghose, *Pure Appl. Chem.* 59(2), 257-268 (1987)
21. G.L. Miller, *Anal. Chem.* 31, 426-428 (1959)
22. J.O. Baker, K. Tatsumoto, K. Grohmann, J. Woodward, J.M. Wichert, S.P. Shoemaker, M.E. Himmel, *Appl. Biochem. Biotech.* 34-35(1), 217-231 (1992)