



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Εφαρμογή κυτταρινασών σε απορρυπαντικά και μαλακτικά ρούχων»

Δρακοπούλου Ζωή

Επιβλέπων Καθηγητής:

Τόπακας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2021

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής των Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή, κύριου Τόπακα Ευάγγελου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Τόπακα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, ιδιαίτερα δεδομένου των δύσκολων συνθηκών.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Αγγελίνα Χαλιμά για το ειλικρινές ενδιαφέρον και την αμέριστη βοήθειά της σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας. Την ευχαριστώ προσωπικά για την υποστήριξη, τις συμβουλές και τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου που με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της εκπόνησης και συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κωτσάκη Πάνο από την εταιρεία Rolco για την πολύτιμη καθοδήγηση και την μετάδοση των γνώσεων του. Ακόμη, τον ευχαριστώ για την χορήγηση των ενζύμων και των εμπορικών απορρυπαντικών και μαλακτικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς και την παραχώρηση των εγκαταστάσεων της εταιρείας για τη διεξαγωγή των πειραμάτων για τον προσδιορισμό της βελτίωσης της λευκότητας και της αντιγήρανσης των βαμβακερών ιματισμών, μετά την πλύση τους με μαλακτικά με κυτταρινάσες.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, για το όμορφο και συνεργατικό κλίμα και την προθυμία τους να βοηθήσουν σε κάθε δυσκολία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένεια και τους φίλους μου, για την υπομονή και τη στήριξη τους, τόσο τον τελευταίο χρόνο, όσο και όλα τα προηγούμενα χρόνια των σπουδών μου. Η ενεργή παρουσία και η συμπαράστασή τους με βοήθησαν να φτάσω εδώ που βρίσκομαι σήμερα.

Δρακοπούλου Ζωή,

Αθήνα 2021

Περίληψη

Οι κυτταρινάσες, και γενικότερα τα ένζυμα, εφαρμόζονται πολλά χρόνια στη βιομηχανία των απορρυπαντικών, καθώς η χρήση τους αποτελεί μια διεργασία φιλική προς το περιβάλλον και ταυτόχρονα συμβάλλουν στον καθαρισμό των υφασμάτων, αφαιρούν τις ίνες μικρού μήκους και τα χνούδια από την επιφάνεια, δημιουργούν μια απαλή και γυαλιστερή εμφάνιση και βελτιώνουν την ένταση των χρωμάτων και τη λευκότητα των ενδυμάτων. Μέχρι σήμερα, τα ένζυμα χρησιμοποιούνται στα απορρυπαντικά προϊόντα και όχι στα μαλακτικά. Ισχύει ότι κατά τις οικιακές πλύσεις ρούχων με αυτόματο πλυντήριο, τα απορρυπαντικά προϊόντα προστίθενται πριν τα μαλακτικά. Επομένως, γίνεται η υπόθεση ότι αν τα ένζυμα προστεθούν στα μαλακτικά θα αυξηθούν οι θετικές τους επιδράσεις στα ενδύματα ως προς την αίσθηση απαλότητας της επιφάνειας, την αφαίρεση του χνουδιάσματος και των κόμπων, καθώς και της βελτίωσης της λευκότητας. Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να πραγματοποιηθεί μια βιβλιογραφική ανασκόπηση σύγχρονων ερευνών σχετικά με την εφαρμογή κυτταρινασών σε απορρυπαντικά, αλλά και να αξιολογηθεί η συμβατότητα των κυτταρινασών παρουσία μαλακτικού και η βελτίωση της λευκότητας και της αντιγήρανσης των βαμβακερών υφασμάτων λόγω της επεξεργασίας τους με μαλακτικά με κυτταρινάσες.

Η έρευνα για συμβατές με απορρυπαντικά κυτταρινάσες επικεντρώνεται στην εύρεση ή κατασκευή κυτταρινασών με επιθυμητές ιδιότητες για την προσθήκη τους σε απορρυπαντικά. Τέτοιες ιδιότητες είναι η συμβατότητα με επιφανειοδραστικές ουσίες (π.χ. Tween 20, Triton X-100), απορρυπαντικά (π.χ. SDS), μεταλλικά ιόντα, οργανικούς διαλύτες (π.χ. γλυκερόλη, αιθανόλη), οξειδωτικούς παράγοντες (π.χ. H₂O₂), χημικά προσθετικά (π.χ. EDTA), αλλά και εμπορικά απορρυπαντικά.

Για την εκτίμηση της συμβατότητας των κυτταρινασών με τα μαλακτικά, αρχικά, εξετάστηκε η σταθερότητα των εμπορικών παρασκευασμάτων κυτταρινάσης Celluclean, Carezyme και Revitalenz παρουσία μαλακτικού σε σύγκριση με την παρουσία απορρυπαντικού και νερού, για διάρκεια 30 ημερών σε θερμοκρασία 37°C. Οι συνθήκες προσομοιάζουν τις πραγματικές συνθήκες οικιακής πλύσης για περίοδο ενός χρόνου. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση υποστρώματος CMC, ενώ το Filter Paper κρίθηκε ακατάλληλο λόγω της μικρής εξειδίκευσης των κυτταρινασών με το υπόστρωμα και της γαλακτώδους φύσης των απορρυπαντικών και μαλακτικών. Τα ένζυμα Carezyme και Revitalenz προέκυψαν συμβατά με το μαλακτικό, ενώ το ένζυμο Celluclean παρουσίασε συμβατότητα με το απορρυπαντικό. Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε η βελτίωση της αντιγήρανσης και της λευκότητας βαμβακερών υφασμάτων μετά την πλύση τους με μαλακτικό με κυτταρινάσες. Από τον οπτικό έλεγχο των υφασμάτων δεν παρατηρήθηκε ορατή βελτίωση στην επιφάνεια τους, ούτε στη λευκότητα τους. Από τη μέτρηση του ολικού χρώματος των υφασμάτων, προέκυψε βελτίωση της λευκότητας των δειγμάτων που πλύθηκαν με αραιωμένο μαλακτικό (3% κατιονικά) με ένζυμο, της τάξης του 0-1.5%, ενώ για τα δείγματα που πλύθηκαν με συμπυκνωμένο μαλακτικό (8% κατιονικά) με ένζυμο δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή.

Abstract

Cellulases, and enzymes in general, have been used for many years in the detergent industry, as their use is an environmentally friendly process and at the same time they contribute to clean fabrics, remove short fibers and fuzz from the surface, create a soft and glossy appearance and improve the intensity of colors and whiteness of clothes. To date, enzymes have been added to detergents rather than fabric softeners. It is true that during household washing with an automatic washing machine, detergents are added before the softeners, as opposed to the softeners added to the last rinse cycle of the total wash cycle. Therefore, it is hypothesized that if the enzymes are added to the fabric softeners, their positive effects on the clothes will increase in terms of the feeling of surface softness, the removal of fuzz and pills, as well as the improvement of whiteness. The purpose of this dissertation is to conduct a literature review of current research on the application of cellulases in detergents, but also to evaluate the compatibility of cellulases in the presence of fabric softeners and to improve the whiteness and anti-aging of cotton fabrics due to their enzymatic treatment with conditioners.

Research on detergent-compatible cellulases focuses on finding or manufacturing cellulases with desirable properties for their addition to detergents. Such properties are compatibility with surfactants (e.g. Tween 20, Triton X-100), detergents (e.g. SDS), metal ions, organic solvents (e.g. glycerol, ethanol), oxidizing agents (e.g. H₂O₂), chemical additives (e.g. EDTA), but also commercial detergents.

To assess the compatibility of cellulases with fabric softeners, the stability of commercial cellulases preparations Celluclean, Carezyme, and Revitalenz was initially tested in the presence of softeners compared to the presence of detergent and water for 30 days at 37 °C. The conditions mimic the actual conditions of a household wash for a period of one year. The reactions were performed using CMC as substrate, while the Filter Paper was deemed unsuitable due to the low specificity of the cellulases with the substrate and the milky nature of the detergents and softeners. The enzymes Carezyme and Revitalenz were found compatible with the softener, while the enzyme Celluclean was compatible with the detergent. Then, the improvement of anti-aging and whiteness of cotton fabrics after washing them with enzyme softener was evaluated. From the visual inspection of the fabrics, no visible improvement was observed on their surface, nor on their whiteness. The measurement of the total color of the fabrics showed an improvement in the whiteness of the samples washed with diluted fabric softener (3% cationic) with a cellulase, of the level of 0-1.5%, while for the samples washed with concentrated fabric softener (8% cationic) with enzyme no change was observed.

Πίνακας περιεχομένων

1. Θεωρητικό Μέρος	6
1.1 Εισαγωγή	6
1.2 Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας	7
1.3 Μικροοργανισμοί που αποικοδομούν την κυτταρίνη.....	11
1.4 Εφαρμογή κυτταρινασών στην κλωστοϋφαντουργική βιομηχανία	19
1.5 Εφαρμογή κυτταρινασών στη βιομηχανία των απορρυπαντικών	27
1.6 Παρασκευάσματα κυτταρινάσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία	43
2. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση.....	44
2.1 Έρευνα για συμβατές με απορρυπαντικά κυτταρινάσες.....	44
2.2 Έρευνα κυτταρινασών για την επεξεργασία υφασμάτων	56
2.3 Έρευνα για συμβατά με απορρυπαντικά υπόλοιπα ένζυμα	58
3. Υλικά-Μέθοδοι	64
3.1 Υλικά.....	64
3.2 Μέθοδοι.....	65
4. Αποτελέσματα	75
4.1 Καθορισμός συνθηκών του πειράματος	75
4.2 Μελέτη σταθερότητας ενζύμων παρουσία εμπορικού απορρυπαντικού ή μαλακτικού	82
4.3 Εκτίμηση λευκότητας και αντιγήρανσης σε βαμβακερό ιματισμό μετά από πλύση με μαλακτικά με ένζυμα	88
5. Συμπεράσματα & Συζήτηση.....	92
5.1 Καθορισμός συνθηκών του πειράματος	92
5.2 Μελέτη σταθερότητας ενζύμων παρουσία εμπορικού απορρυπαντικού ή μαλακτικού	94
5.3 Εκτίμηση λευκότητας και αντιγήρανσης σε βαμβακερό ιματισμό μετά από πλύση με μαλακτικά με ένζυμα	96
5.4 Μελλοντικοί στόχοι.....	97
6. Βιβλιογραφία.....	99

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, έχει αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό η ευαισθητοποίηση σχετικά με την προστασία του περιβάλλοντος, το αποτύπωμα του άνθρακα και την ορθολογική διαχείριση του νερού. Παράλληλα, οι ολοένα αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών πρέπει να είναι σύμφωνες με τα διάφορα θέματα της αειφόρου και βιώσιμης ανάπτυξης. Η χρήση ενζύμων, όπως των κυτταρινασών, στα στάδια της προεπεξεργασίας και του φινιρίσματος των υφασμάτων, καθώς και στη σύσταση απορρυπαντικών ρούχων και πιάτων αποτελεί διαδικασία φιλική προς το περιβάλλον, καθώς συμμορφώνεται με τις αρχές της πράσινης χημείας, με αποτέλεσμα τη μείωση της κατανάλωσης χημικών, τη χρήση προϊόντων και διαδικασιών ασφαλών για το περιβάλλον, την καλύτερη διαχείριση ενέργειας και νερού, καθώς την ελαχιστοποίηση των απορριμμάτων («zero waste»).

Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, η παγκόσμια αγορά ενζύμων αναμένεται να φτάσει τα 12 δισεκατομμύρια ευρώ το 2025. Η μεγάλη ζήτηση των ενζύμων σε ποικίλες βιομηχανίες αυξάνεται λόγω της συγκεκριμένης δράσης που έχουν, ενώ παράλληλα καταλύουν τις αντιδράσεις πιο γρήγορα, αποτελεσματικά, επιλεκτικά και με λιγότερα παραπροϊόντα [1]. Η παγκόσμια έκθεση για την έρευνα αγοράς των κυτταρινασών (Global Cellulase Market Research Report, CAS 9012-54-8) [2], που δημοσιεύτηκε το 2020 για την πρόβλεψη της περιόδου 2021-2030, αναφέρει ότι η αύξηση της ζήτησης για κυτταρινάσες στις κλωστοϋφαντουργικές, φαρμακευτικές και καλλυντικές βιομηχανίες συνιστά σημαντικό παράγοντα βάσει του οποίου αναμένεται να πολλαπλασιαστεί η ανάπτυξη της αγοράς.

Οι κυτταρινάσες, επί του παρόντος, εφαρμόζονται ευρέως στη κλωστοϋφαντουργική βιομηχανία για την επεξεργασία των βαμβακερών υφασμάτων, με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας, της απαλότητας των ενδυμάτων, την αφαίρεση περίσσειας βαφής από τα υφάσματα, καθώς και την αποκατάσταση της φωτεινότητας των χρωμάτων. Στα απορρυπαντικά, οι κυτταρινάσες χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση ακαθαρσιών παγιδευμένων στο δίκτυο των ινών, την αποφυγή επανατοποθέτησης τους στα ρούχα κατά την πλύση, αλλά και τη γενικότερη αναβάθμιση της εμφάνισης του υφάσματος, με την αφαίρεση των ινών και κόμπων από την επιφάνεια τους, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της λευκότητας και έντασης των χρωμάτων των βαμβακερών ενδυμάτων.

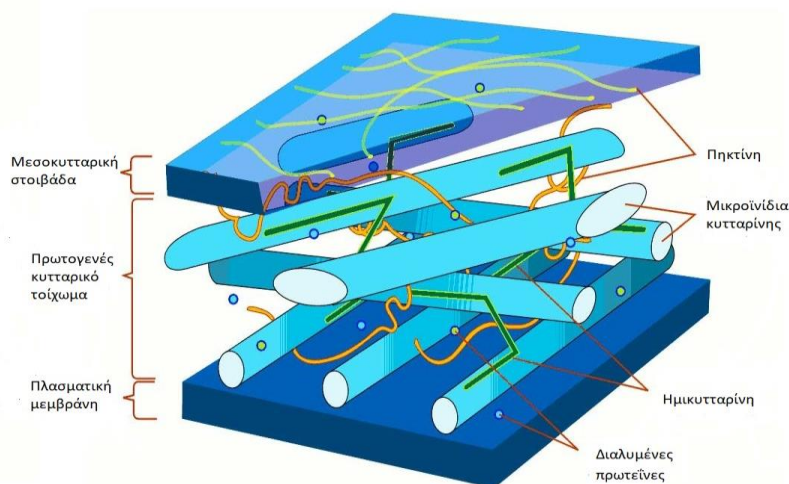
Μέχρι σήμερα, σημαντικές μελέτες και έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την απομόνωση, την ταυτοποίηση, την παραγωγή, τον καθαρισμό και το χαρακτηρισμό κυτταρινασών συμβατών με τη σύσταση των απορρυπαντικών. Στο μέλλον, όμως, οι έρευνες προβλέπεται να επικεντρωθούν περισσότερο στη γενετική και πρωτεϊνική μηχανική των κυτταρινασών, αυτών, ώστε να επιτευχθεί η υπερπαραγωγή σταθερών και οικονομικά αποδοτικών κυτταρινασών από μικροοργανισμούς. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η εκμετάλλευση υποστρωμάτων, όπως τα γεωργικά υπολείμματα και υποπροϊόντα, καθώς είναι οικονομικά και φιλικά προς το περιβάλλον. Η ανακάλυψη νέων κυτταρινασών με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, ώστε να είναι συμβατές με τα απορρυπαντικά, θα επιτρέψει τη σύνθεση δραστικών απορρυπαντικών που αφαιρούν όλους τους δύσκολους τύπους λεκέδων. Η ανάπτυξη, επομένως, κυτταρινασών που διατηρούνται σταθερές και αποτελεσματικές παρουσία άλλων συστατικών και ταυτόχρονα έχουν χαμηλό κόστος παραγωγής, παρουσιάζει πολλές προοπτικές για μελλοντικές εφαρμογές του ενζύμου στη βιομηχανία.

1.2 Σύσταση λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Η λιγνοκυτταρίνη είναι ένα ανανεώσιμο οργανικό υλικό και το σημαντικότερο δομικό στοιχείων όλων των φυτικών κυττάρων. Ο όρος “λιγνινοκυτταρίνη” περιγράφει τα βασικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, δηλαδή την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη. Συνοπτικά, η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης της γλυκόζης, οι ημικυτταρίνες είναι ετερογενείς πολυσακχαρίτες, ο σκελετός των οποίων αποτελείται από διαφορετικές εξόζες και πεντόζες (γλυκόζη, μανόζη, γαλακτόζη και ξυλόζη, αραβινόζη, αντίστοιχα) και η λιγνίνη είναι ένα σύνθετο δίκτυο από διαφορετικές μονάδες φαινυλοπροπανίου [3]. Λιγότερο σημαντικά συστατικά είναι πρωτεΐνες, λιπίδια, πηκτίνη, διαλυτά σάκχαρα και μεταλλικά στοιχεία.

Τα κυτταρικά τοιχώματα διαδραματίζουν πολλούς και διαφορετικούς ρόλους και συχνά αντίθετους. Για παράδειγμα, η αντίσταση στη μηχανική καταπόνηση είναι απαραίτητη, όπως και το σχήμα του κυττάρου για την προστασία του ευαίσθητου εσωτερικού των φυτών από τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Ταυτόχρονα, όμως, τα κυτταρικά τοιχώματα πρέπει να είναι αρκετά εύκαμπτα για να αντιστέκονται στις διατμητικές δυνάμεις, αλλά και αρκετά διαπερατά, ώστε να επιτρέπουν τη διέλευση σηματοδοτικών μορίων στο κύτταρο [4]. Η χημική τους σύσταση περιλαμβάνει, κυρίως, μικροϊνίδια κυτταρίνης ενσωματωμένα μέσα σε ένα πολύπλοκο δίκτυο από πρωτεΐνες, ημικυτταρίνες, καθώς και άλλους πολυσακχαρίτες (Εικόνα 1.1).

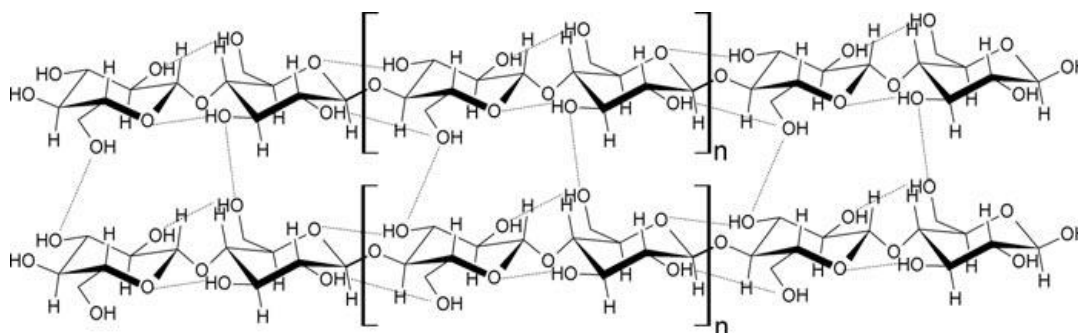
Τα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα δημιουργούνται από δύο γειτονικά φυτικά κύτταρα και αποτελούνται από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Στη συνέχεια, η πηκτίνη που είναι μια κολλώδης ουσία, συμβάλλει στη συγκόλληση και τη συγκράτηση των γειτονικών κυττάρων στη θέση τους. Ένα δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα, δημιουργείται από ορισμένα κύτταρα, μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του πρωτογενούς τοιχώματος, που αποτελείται από λιγνίνη και συνεισφέρει στη μηχανική υποστήριξη του φυτού. Η κυτταρίνη, δηλαδή, προσδίδει ακαμψία (αντοχή σε εφελκυσμό) στους φυτικούς ιστούς, ενώ η ημικυτταρίνη παρέχει το υλικό επικόλλησης, με τη λιγνίνη να αντιπροσωπεύει την κόλλα, προσδίδοντας αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση. Η σύσταση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας διαφέρει ανάλογα την πηγή της φυτικής βιομάζας, αλλά ενδεικτικά αποτελείται από 38-50% κυτταρίνη, 23-32% ημικυτταρίνη και 15-25% λιγνίνη [5].



Εικόνα 1.1 Δομή πρωτογενούς κυτταρικού υποστρώματος (Τροποποίηση από [6])

1.2.1 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί το βασικό συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Πήρε το όνομα της, “cellulose” (cell=κύτταρο) από τον Anselme Payger (19ος αιώνας), ο οποίος την όρισε ως “τον πολυσακχαρίτη που αποτελούσε στοιχειώδη και ομοιόμορφο συστατικό όλων των φυτικών κυττάρων” και συνιστά το βιοπολυμερές, εκείνο, που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στη γη [5]. Είναι ένα γραμμικό πολυμερές που αποτελείται από μονομερή D-γλυκοκυρανόζης, συνδεδεμένα με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Κάθε μονομερές (δακτύλιος γλυκοκυρανόζης), περιστρέφεται κατά 180° ως προς το γειτονικό του μονομερές, γύρω από το γλυκοζιτικό δεσμό, οπότε η κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβανόμενη βασική μονάδα του πολυμερούς. Η κελλοβιόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από δύο μόρια γλυκοκυρανόζης (Εικόνα 1.2) [7]. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης έχει ένα εύρος από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης.



Εικόνα 1.2 Απεικόνιση της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας της κυτταρίνης, της κελλοβιόζης [8].

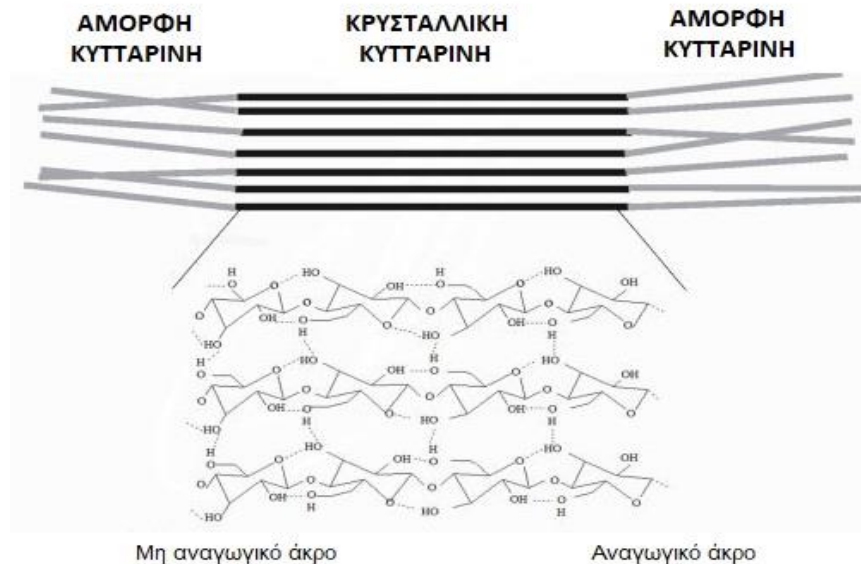
Τα πολυμερή της κυτταρίνης σχηματίζουν διατεταγμένες δομές, που ονομάζονται μικροϊνίδια, οι οποίες σταθεροποιούνται από διαμοριακούς και ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις van der Waals μεταξύ των μορίων γλυκόζης [9]. Τα μικροϊνίδια έχουν διάμετρο 2-20 nm, μήκος 100-40.000 nm και περιέχουν το καθένα 24-36 αλυσίδες κυτταρίνης. Βασική τους λειτουργία είναι η εξασφάλιση της ακαμψίας του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών [5].

Το δίκτυο που δημιουργείται, έχει ως αποτέλεσμα την ομοιόμορφη διάταξη των ινών σχηματίζοντας κρυσταλλική κυτταρίνη. Η κρυσταλλική δομή της κυτταρίνης συνεπάγεται μια ορισμένη διάταξη, στην οποία όλα τα άτομα βρίσκονται σε σταθερές, διακριτές θέσεις. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της συνιστά ότι τα μόρια των μεμονωμένων μικροϊνιδίων βρίσκονται τόσο σφικτά πακεταρισμένα, ώστε αποτρέπεται η διείσδυση όχι μόνο των ενζύμων, αλλά και μικρών μορίων, όπως του νερού. Παρόλο που η κρυσταλλική δομή της κυτταρίνης εμποδίζει την ενζυμική αποικοδόμηση της προκαλώντας πολλά προβλήματα, η ομοιογένεια που συνεπάγεται, αποτελεί ένα μεγάλο πλεονέκτημα [7].

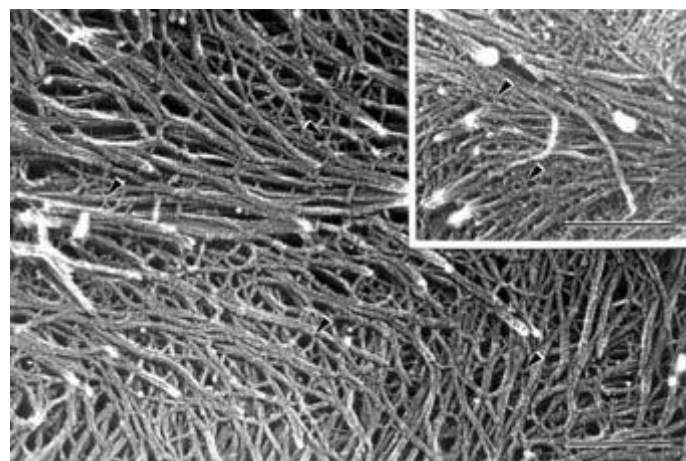
Μεταξύ των στενά διατεταγμένων, κρυσταλλικών περιοχών της κυτταρίνης παρεμβάλλονται περιοχές μη οργανωμένης ή και άμορφης κυτταρίνης (Εικόνα 1.3). Πολλές έρευνες έρευνες έχουν δείξει ότι η άμορφη κυτταρίνη υδρολύεται με πολύ πιο γρήγορο ρυθμό σε σχέση με την μερικώς κρυσταλλική κυτταρίνη. Το γεγονός αυτό ενισχύεται από την αντίληψη ότι ο αρχικός βαθμός

κρυσταλλικότητας παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενζυμική αποικοδόμηση ενός κυτταρινικού δείγματος.

Ο βαθμός κρυσταλλικότητας είναι μια παράμετρος που περιγράφει το ποσοστό βάρους ή όγκου κρυσταλλικών περιοχών στην κυτταρίνη σε σχέση με το σύνολο του πολυμερούς, που περιέχει και άμορφες περιοχές. Οι κρυσταλλικές περιοχές έχουν ένα βαθμό κρυσταλλικότητας περίπου 70%, ενώ το υπόλοιπο συνιστά άμορφη κυτταρίνη [5]. Ο βαθμός κρυσταλλικότητας ποικίλλει εκτεταμένα μεταξύ των κυτταρικών τοιχωμάτων κυτταρίνης που προέρχονται από τα φυτά σε σχέση με εκείνα που προέρχονται από βακτήρια και άλγες, από 40-50% σε 65-80% αντίστοιχα [10].



Εικόνα 1.3 Κρυσταλλική και άμορφη δομή της κυτταρίνης. Η κρυσταλλική δομή διατηρείται με δεσμούς υδρογόνου και Van der Waals δυνάμεις, στην άμορφη δομή υπάρχουν στροφές και στρέψεις που διαταράσσουν την οργανωμένη διάταξη. (Τροποποίηση από [11])



Εικόνα 1.4 Μικρογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της εξωτερικής επιφάνειας των κυτταρικών τοιχωμάτων επιδερμικών κυττάρων ενός πιτζελιού (*Pisum sativum*). Τα μικροϊνίδια κυτταρίνης και οι συνδέσεις υποδεικνύονται με βέλη. Μέγεθος κλίμακας, 200nm [12].

1.2.2 Ημικυτταρίνη

Η χρήση του όρου “ημικυτταρίνη” είναι λανθασμένη, καθώς υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι ημικυτταρινών. Οι ημικυτταρίνες ορίζονται, πιο ορθώς, ως το μίγμα συμπολυμερών ουσιών που μαζί με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη συγκροτούν τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών κυττάρων. Το ποσοστό τους ποικίλλει ευρέως, από 17% μέχρι 42% ανάλογα το είδος των φυτών. Οι ημικυτταρίνες χαρακτηρίζονται από χαμηλό βαθμό πολυμερισμού και υψηλή χημική δραστηριότητα. Επίσης, είναι έντονα υγροσκοπικές και η δομή τους πιο άμορφη και λιγότερο συμπαγής από αυτήν της κυτταρίνης [5]. Συνδυάζοντας τα παραπάνω προκύπτει ότι οι ημικυτταρίνες επιτρέπουν πιο εύκολα την υδρόλυση του πολυσακχαρίτη, σε σύγκριση με τις κυτταρίνες.

Η ημικυτταρίνη είναι μια ετερογενής ομάδα διασταυρωμένων φυτικών μη-κυτταρινικών πολυσακχαριτών, οι οποίοι αποτελούνται από πεντόζες (όπως D-ξυλόζη, L-αραβινόζη, L-ραμνόζη και L-φουκόζη), από εξόζες (όπως D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη) και ουρονικά οξέα (όπως D-γλυκουρονικό οξύ, D-4-O-μεθυλ-γλυκουρονικό οξύ και D-γαλακτουρονικό οξύ). Οι ημικυτταρίνες κατηγοριοποιούνται, συνήθως, με βάση το βασικότερο μονομερές σάκχαρο, οπότε χωρίζονται σε γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες με την ξυλάνη να αποτελεί το βασικότερο συστατικό της ημικυτταρίνης [5].

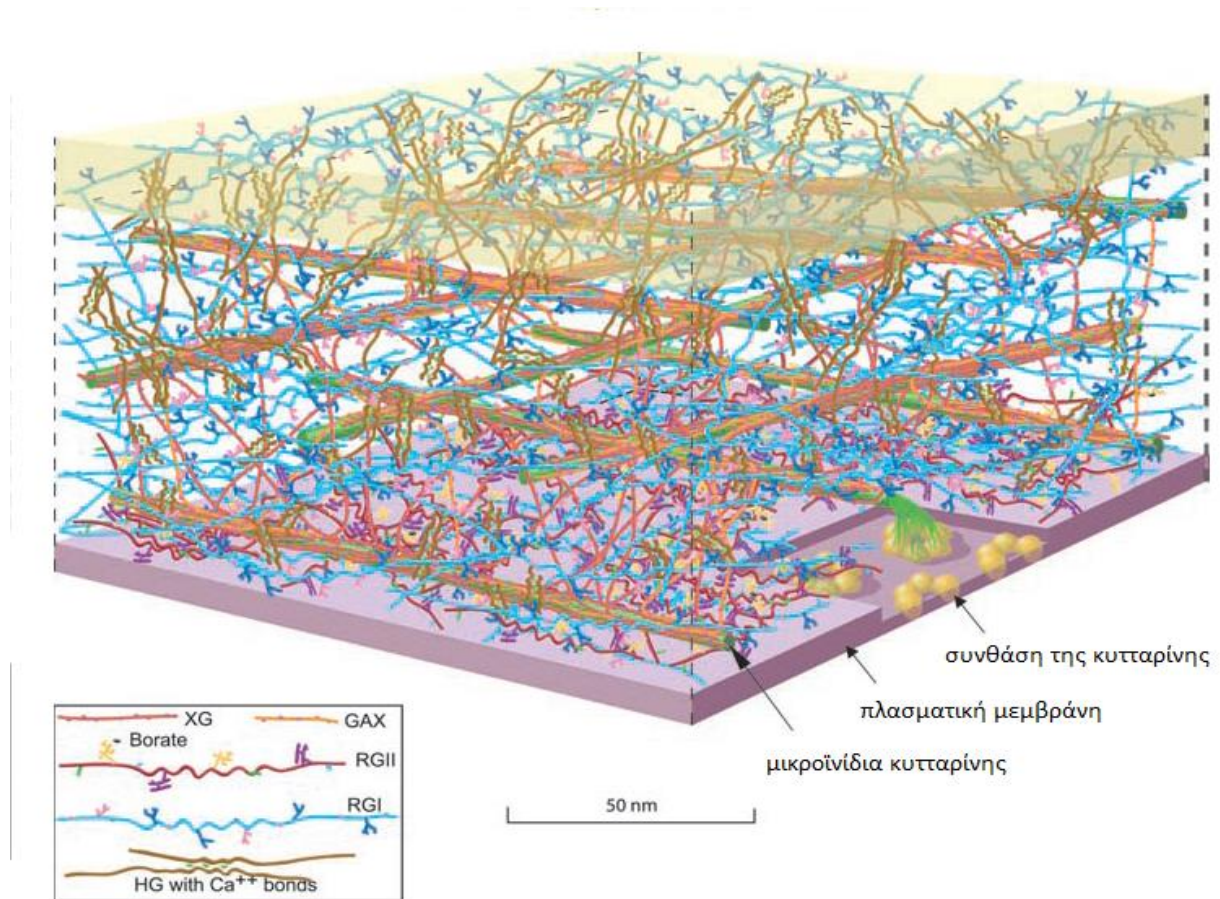
Η **ξυλάνη** βρίσκεται δεύτερη σε σειρά, μετά την κυτταρίνη, ως ο πιο άφθονος πολυσακχαρίτης στη φύση. Αποτελείται από μία κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλοπυρανόζης που ενώνονται μεταξύ τους με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η δομή της εξαρτάται από την πηγή προέλευσης της ξυλάνης και παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία, ποικίλλει από απλή, σχεδόν γραμμική, μη υποκατεστημένη αλυσίδα μέχρι ένα σύνθετο σύμπλεγμα ετεροπολυσακχαριτών με πολλές διακλαδώσεις.

Η ξυλάνη εντοπίζεται, κατά βάση στην περιοχή ανάμεσα στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη των δευτεροταγών κυτταρικών τοιχωμάτων τους, αλλά και στα μονοκοτυλήδονα των πρωτοταγών κυτταρικών τους τοιχωμάτων και λειτουργεί ως ο συνδετικός ιστός για την εξασφάλιση της συνεκτικότητας και της ακεραιότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι ξυλάνες αλληλεπιδρούν με τις υπόλοιπες δομικές μονάδες του κυτταρικού τοιχώματος, όπως με τα μικροϊνίδια κυτταρίνης, πρωτεΐνες, πηκτινικούς πολυσακχαρίτες, άλλα μη κυτταρινικά πολυμερή και λιγνίνη. Η σύνδεση της ξυλάνης με τη λιγνίνη πραγματοποιείται μέσω φαινολικών οξέων με ομοιοπολικούς δεσμούς και με δεσμούς υδρογόνου με τους άλλους πολυσακχαρίτες [5].

1.2.3 Λιγνίνη

Η λιγνίνη βρίσκεται σε αφθονία στη φύση και η παρουσία της συνδέεται στενά με την κυτταρίνη. Είναι άμορφη και έχει υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100.000-300.000). Η λιγνίνη είναι ένα φαινολικό πολυμερές που προσδίδει αντοχή στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Πιο αναλυτικά, είναι ένα εξαιρετικά αδιάλυτο πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο. Οι δομικές μονάδες συνδέονται μεταξύ τους με αιθερικούς ή άνθρακα-άνθρακα δεσμούς σχηματίζοντας ένα εκτεταμένο δίκτυο με πολλές διασταυρώσεις εντός του κυτταρικού τοιχώματος. Οι διακλαδώσεις αυτές μεταξύ των διαφορετικών πολυμερών προσδίδουν πολυπλοκότητα και ακαμψία στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, που είναι υπεύθυνο για τη συνολική προστασία του φυτικού κυττάρου, έναντι παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων πολλών

μικροοργανισμών. Ωστόσο, μέσω της εξελικτικής διαδικασίας πολλοί μικροοργανισμοί ανέπτυξαν αποτελεσματικούς τρόπους αποικοδόμησης των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, κυρίως των πολυσακχαριτών προκειμένου να επιβιώσουν [5], [13].



Εικόνα 1.5 Μοντέλο κλίμακας των πολυσακχαριτών από ένα Arabidopsis φυτικό κυτταρικό τοίχωμα. Η ποσότητα των πολυμερών απεικονίζεται με βάση την αναλογία τους προς την ποσότητα κυτταρίνης, η οποία μειώθηκε σε σχέση με το ζωντανό κύτταρο για σαφήνεια. Μεταξύ των μικροϊνιδίων, απεικονίζονται οι διασταυρώσεις ημικυτταρίνης, σε σκούρο ή ανοιχτό πορτοκαλί. (Τροποποίηση από [12])

1.3 Μικροοργανισμοί που αποικοδομούν την κυτταρίνη

Η κυτταρίνη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, όντας συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, αποικοδομείται πολύ δύσκολα και μόνο λίγοι εξειδικευμένοι μικροοργανισμοί διαθέτουν αυτή την ικανότητα. Γενικά, τα συστήματα που υπάρχουν για την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης διακρίνονται σε δύο τύπους. Από τη μία πλευρά, ένας οργανισμός παράγει μια ομάδα ελεύθερων ενζύμων που δρουν συνεργιστικά προκειμένου να αποικοδομήσουν τα κυτταρικά τοιχώματα. Από την άλλη, ένζυμα ειδικά για αποικοδόμηση οργανώνονται σε ένα δίκτυο ενζύμων στη κυτταρική επιφάνεια, που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων [14].

1.3.1 Κυτταρινάσες

Οι κυτταρινάσες είναι τα ένζυμα εκείνα που δρουν συνεργιστικά για να αποικοδομήσουν την κυτταρίνη. Οι κυτταρινάσες ανήκουν στην κατηγορία των υδρολασών. Τα ένζυμα, γενικά, ανάλογα με την αντίδραση που καταλύουν ταξινομούνται σε έξι κατηγορίες, όπως παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα [15].

Πίνακας 1.1 Κατηγορίες ενζύμων, είδη αντιδράσεων και αντίστοιχα ένζυμα

Κατηγορία	Αντιδράσεις	Ένζυμα
Οξειδωδουκτάσες	Μεταφορά υδρογόνου ή οξυγόνου ή ηλεκτρονίων μεταξύ των μορίων	Αφυδρογονάσες, οξειδάσες, οξυγονάσες, υπεροξειδάσες
Τρανσφεράσες	Μεταφορά ομάδων ατόμων από το ένα μόριο στο άλλο	Φρουκτοσυλοτρανσφεράσες, τρανσκετολάσες, τρανσαμινάσες, ακυλοτρανσφεράσες
Υδρολάσες	Υδρολυτική διάσπαση δεσμών	Πρωτεάσες, αμυλάσες, λιπάσες, κυτταρινάσες, ακυλάσες, φωσφατάσες,
Λυάσες	Μη υδρολυτική διάσπαση με προσθήκη ή αφαίρεση ομάδων	Λυάσες, υδρατάσες, αφυδατάσες, δεκαρβοξυλάσες, φουμαράση
Ισομεράσες	Μεταφορά ομάδας από μια θέση σε άλλη μέσα στο μόριο	Ισομεράσες, επιμεράσες,
Λιγάσες	Σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών δύο μορίων με σύζευξη με την υδρόλυση της ATP ή παρόμοιων τριφωσφορικών	Συνθετάσες, λιγάσες

Παρόλο που τα τελευταία 50 με 60 χρόνια πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν πετύχει τον αποπολυμερισμό του κυτταρινικού μέρους λιγνοκυτταρικών υποστρωμάτων σε διαλυτά σάκχαρα με τη χρήση ενζύμων αποδόμησης υδατανθράκων, η αποτελεσματική, γρήγορη και ολοκληρωμένη ενζυματική υδρόλυση λιγνοκυτταρικών υλικών χρησιμοποιώντας χαμηλά πρωτεϊνικά φορτία έχει αποδειχθεί μια μεγάλη πρόκληση, από τεχνικής και οικονομικής άποψης [16]. Μέσα από έρευνες έχουν προταθεί πολλοί παράγοντες ότι σχετίζονται με την απειθαρχία της κυτταρίνης να υποστεί αποτελεσματικά ενζυμική υδρόλυση. Τέτοιοι παράγοντες αφορούν είτε τα υποστρώματα είτε τα ένζυμα, όπως η συσχέτιση λιγνίνης/ημικυτταρίνης, ο βαθμός κρυσταλλικότητας και πολυμερισμού της κυτταρίνης, η έκταση της εξωτερικής επιφάνειας και αντίστοιχα η αναστολή των τελικών προϊόντων, η ανάγκη για συνέργεια και η μη αναστρέψιμη απορρόφηση ενζύμων [17].

Οι κυτταρινάσες παράγονται και απομονώνονται από μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών που περιλαμβάνει τόσο μύκητες όσο και βακτήρια (Πίνακας 1.2) [18]. Οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι

αερόβιοι ή αναερόβιοι, μεσόφιλοι ή θερμόφιλοι. Βακτήρια με ικανότητα παραγωγής κυτταρινασών είναι τα *Acidothermus cellulolyticus* [19], *Anaerocellum thermophilum* [20], *Clostridium stercorarium*, *Thermotoga marittima* [21], *Clostridium thermocellum* [22] και άλλοι. Εκτός από τον μύκητα *Trichoderma reesei*, ο οποίος έχει μελετηθεί εκτενώς, άλλοι μύκητες που παράγουν κυτταρινάσες είναι οι *Fusarium oxysporum* [23], *Aspergillus niger* [24] και ο *Aspergillus fumigatus* [25].

Πίνακας 1.2 Μικροοργανισμοί με κυτταρολυτικές ιδιότητες

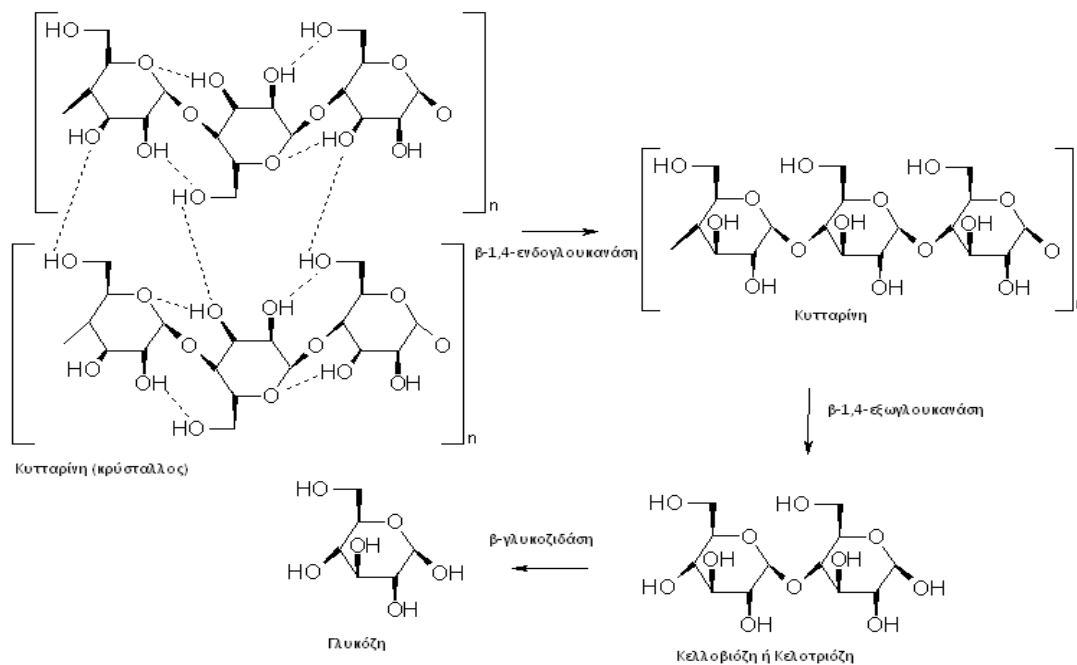
	Μαλακής σήψης
	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. nidulans</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>A. terreus</i> ; <i>Fusarium solani</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>Humicola insolens</i> ; <i>H. grisea</i> ; <i>Melanocarpus albomyces</i> ; <i>Penicillium brasilianum</i> ; <i>P. occitanis</i> ; <i>P. decumbans</i> ; <i>Trichoderma reesei</i> ; <i>T. longibrachiatum</i> ; <i>T. harzianum</i> ; <i>Chaetomium cellulyticum</i> ; <i>C. thermophilum</i> ; <i>Neurospora crassa</i> ; <i>P. fumigosum</i> ; <i>Thermoascus aurantiacus</i> ; <i>Mucor circinelloides</i> ; <i>P. janthinellum</i> ; <i>Paecilomyces inflatus</i> ; <i>P. echinulatum</i> ; <i>Trichoderma atroviride</i>
Μύκητες	Καφέ σήψης
	<i>Coniophora puteana</i> ; <i>Lanzites trabeum</i> ; <i>Poria placenta</i> ; <i>Tyromyces palustris</i> ; <i>Fomitopsis sp.</i>
	Λευκής σήψης
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ; <i>Sporotrichum thermophile</i> ; <i>Trametes versicolor</i> ; <i>Agaricus arvensis</i> ; <i>Pleurotostreatus</i> ; <i>Phlebia gigantea</i>
	Αερόβια βακτήρια
	<i>Acinetobacter junii</i> ; <i>A. amitatus</i> ; <i>Acidothermus cellulolyticus</i> ; <i>Anoxybacillus sp.</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>B. pumilus</i> ; <i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>B. licheniformis</i> ; <i>B. circulans</i> ; <i>B. flexus</i> ; <i>Bacteriodes sp.</i> ; <i>Cellulomonas bioazotea</i> ; <i>Cellvibrio gilvus</i> ; <i>Eubacterium cellulosolvens</i> ; <i>Geobacillus sp.</i> ; <i>Microbispora bispora</i> ; <i>Paenibacillus curdolanolyticus</i> ; <i>Pseudomonas cellulosa</i> ; <i>Salinivibrio sp.</i> ; <i>Rhodothermus marinus</i>
Βακτήρια	Αναερόβια βακτήρια
	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Clostridium thermocellum</i> ; <i>C. cellulolyticum</i> ; <i>C. acetobutylicum</i> ; <i>C. papyrosolvens</i> ; <i>Fibrobacter succinogenes</i> ; <i>Ruminococcus albus</i>
Ακτινομύκητες	<i>Cellulomonas fimi</i> ; <i>C. bioazotea</i> ; <i>Streptomyces drozdowiczii</i> ; <i>S. lividans</i> ; <i>Thermomonospora fusca</i> ; <i>T. curvata</i>

1.3.1.1 Είδη κυτταρινασών

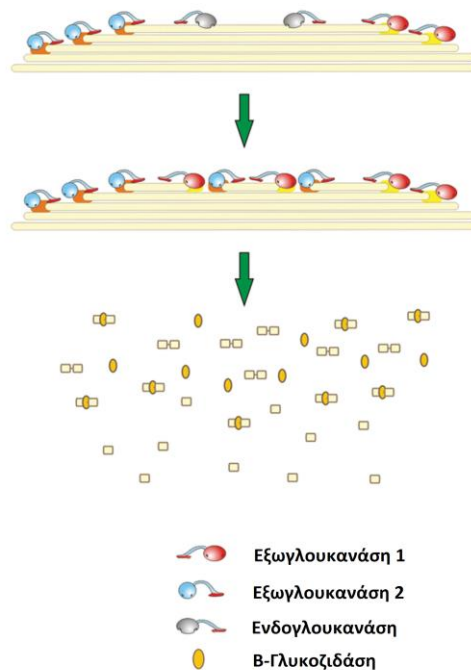
Ο όρος κυτταρινάση αναφέρεται στο σύνολο των υδρολυτικών ενζύμων που καταλύουν τη διάσπαση της κυτταρίνης σε μικρότερους ολιγοσακχαρίτες και τελικά γλυκόζη. Η δράση της κυτταρινάσης αναφέρεται σε ένα σύνθετο σύστημα ενζύμων που δρουν συνεργιστικά και αποτελείται από τρία είδη κυτταρινασών: τις ενδογλουκανάσες (EG: ένδο-1,4-β-γλουκανάσες, EC 3.2.1.4), τις εξωγλουκανάσες ή κελλοβιοϋδρολάσες (CBH: έξω-1,4-β-D-γλουκανάσες, EC 3.2.1.74) και τις β-γλυκοζιδάσες (BGL, EC 3.2.1.21). Στο μηχανισμό συμμετέχουν, επίσης, πολυσακχαρικές μονοοξυγενάσες (LPMO) που συνεργάζονται με τις υπόλοιπες κυτταρινάσες για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης.

Η ενδογλουκανάση δρα τυχαία στις άμορφες περιοχές κατά μήκος της κυτταρικής αλυσίδας, υδρολύοντας 1,4-β-D-γλυκοζιτικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα τη μείωση του βαθμού πολυμερισμού (DP) του υποστρώματος και τη δημιουργία νέων “ελεύθερων” άκρων. Στη συνέχεια, οι

εξωγλουκανάσες δρουν προοδευτικά ξεκινώντας από τα άκρα της κυτταρικής αλυσίδας, επιτίθενται στα κρυσταλλικά μέρη παράγοντας κυρίως κελλοβιόζη και μειώνουν τον βαθμό πολυμερισμού του υποστρώματος πολύ αργά. Οι εξωγλουκανάσες δρουν συνεργιστικά μεταξύ τους και με τις ενδογλουκανάσες, δηλαδή ένα μίγμα από ενδογλουκανάσες και εξωγλουκανάσες δρουν πιο αποτελεσματικά από τη συνολική δράση όλων των ενζύμων αν δρούσαν μεμονωμένα. Στο τελικό στάδιο, οι β-γλυκοζιδάσες υδρολύουν την κελλοβιόζη και τους διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες σε γλυκόζη (Εικόνα 1.6) [26]. Στο μηχανισμό, αυτό, συμμετέχουν και μη υδρολυτικές πρωτεΐνες που δρουν επικουρικά, βελτιώνοντας την υδρόλυση με την αύξηση της διαθέσιμης κυτταρίνης μέσα από την αμορφογένεση του υποστρώματος, αλλά και πολυσακχαρικές μονοοξυγενάσες που αποικοδομούν την κυτταρίνη μέσω οξειδωτικών αντιδράσεων, αντίστοιχα [27], [28].



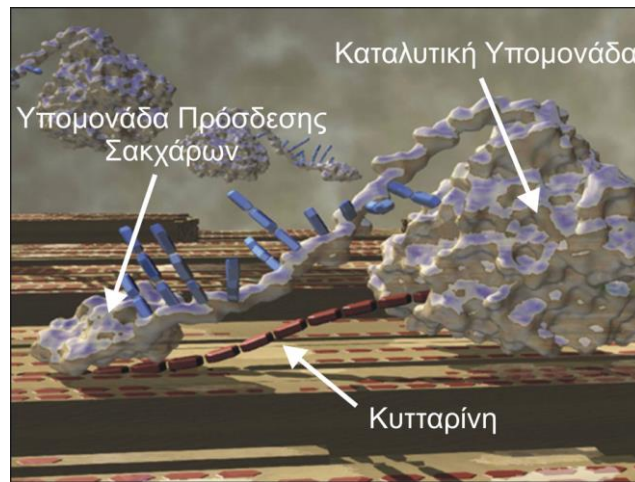
Εικόνα 1.6 Σχηματική αναπαράσταση της συνεργιστικής δράσης των κυτταρινασών. Οι τρεις αντιδράσεις που καταλύονται από τις κυτταρινάσες είναι: 1) προσβολή των άμορφων περιοχών της κυτταρίνης από την β-1,4-ενδογλουκανάση, 2) Υδρόλυση των μορίων της κυτταρίνης προς κελλοβιόζη ή κελοτριόζη από την β-1,4-εξωγλουκανάση, 3) Υδρόλυση της κελλοβιόζης προς γλυκόζη από την β-γλυκοζιδάση.



Εικόνα 1.7 Μοντέλο ενζυμικής υδρόλυσης κυτταρίνης με απεικόνιση της συνεργιστική δράση των κυτταρινασών. (Τροποποίηση από [29])

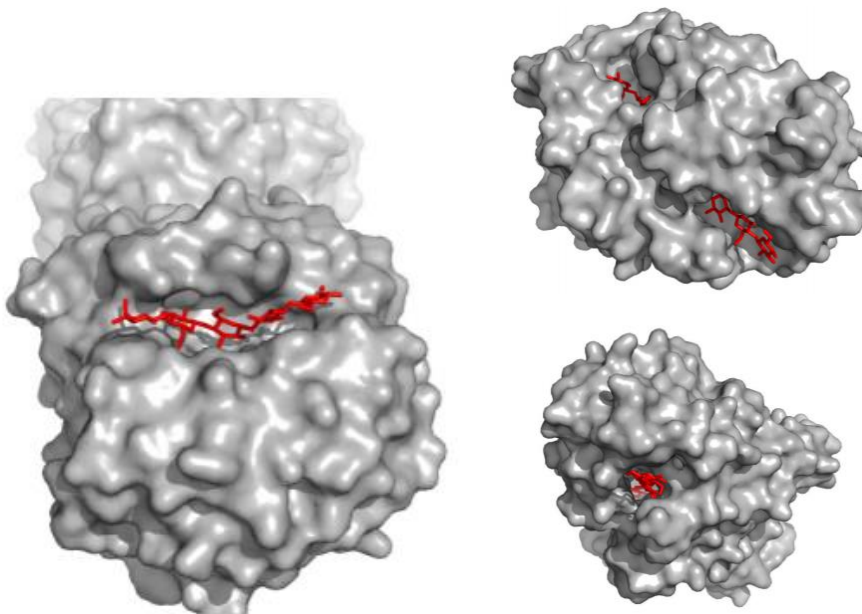
1.3.1.2 Μοριακή δομή κυτταρινασών

Οι κυτταρινάσες αποτελούνται από ανεξάρτητα αναδιπλούμενα, δομικά και λειτουργικά στοιχεία που αποκαλούνται τμήματα ή υπομονάδες κυτταρινασών. Τυπικά, οργανώνονται δομικά σε δύο ξεχωριστές υπομονάδες, την καταλυτική υπομονάδα (CD: Catalytic Domain) και μια υπομονάδα πρόσδεσης σακχάρων (CBM: Carbohydrate-Binding Module) (Εικόνα 1.8) [18]. Στο παρελθόν η υπομονάδα αυτή καλούνταν, υπομονάδα πρόσδεσης κυτταρίνης (Cellulose-Binding Domain), καθώς οι πρώτες CBM που ανακαλύφθηκαν, ήταν εκείνες που συνδέονταν με την κυτταρίνη [29]. Η καταλυτική υπομονάδα είναι μεγαλύτερη και είναι αυτή που υδρολύει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς της αλυσίδας της κυτταρίνης. Η μικρή υπομονάδα δεν έχει κάποιο καταλυτικό ρόλο, απλά προσδέεται στην κυτταρίνη, διατηρώντας, έτσι προσδεδεμένη, και την καταλυτική υπομονάδα, ώστε να αυξήσει το χρόνο επαφής της με το αδιάλυτο κυτταρινούχο υπόστρωμα. Η CBM συνδέεται στο άκρο της καταλυτικής υπομονάδας μέσω μιας μικρής πεπτιδικής αλυσίδας (linker). Η υπομονάδα CBM αποτελείται, περίπου, από 35 αμινοξέα και η περιοχή σύνδεσης είναι πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη [18].



Εικόνα 1.8 Απεικόνιση μορίου κυτταρινάσης [30]

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.9, το ενεργό κέντρο της ενδογλουκανάσης έχει ανοιχτή διαμόρφωση, με αποτέλεσμα να επιτρέπει την προσέγγιση των αλυσίδων κυτταρίνης χωρίς αυτές να παρεμποδίζονται, οπότε το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών σε τυχαίες θέσεις του πολυσακχαρίτη. Από την άλλη, το ενεργό κέντρο στις εξωγλουκανάσες βρίσκεται στο εσωτερικό ενός τούνελ, όπου υπάρχουν τουλάχιστον 6 θέσεις πρόσδεσης, ώστε να εξασφαλίζεται η σωστή τοποθέτηση της κυτταρινικής αλυσίδας στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, καθώς και η παραμονή της κυτταρίνης στο τούνελ μετά από κάθε καταλυτική δράση του ενζύμου [8].

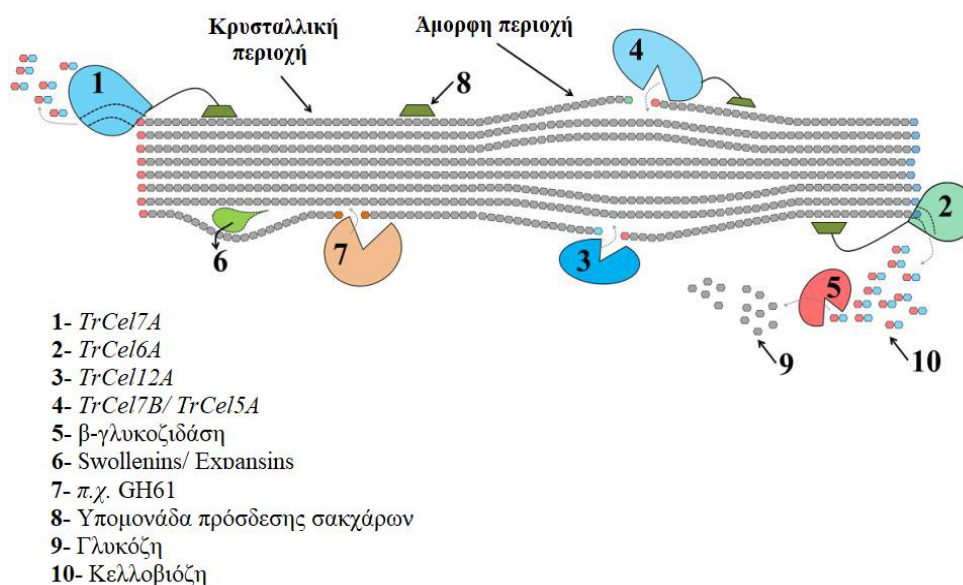


Εικόνα 1.9 Ενδογλουκανάση Cel5A από τον *Bacillus agaradhaerens* παρουσία του υποστρώματος της κελλοτριόζης (PDB: 1HF6) (Αριστερά). Εξωγλουκανάση I από τον *Trichoderma reesei* παρουσία του υποστρώματος της κελλοεξαόζης (PDB: 7CEL) (Δεξιά).

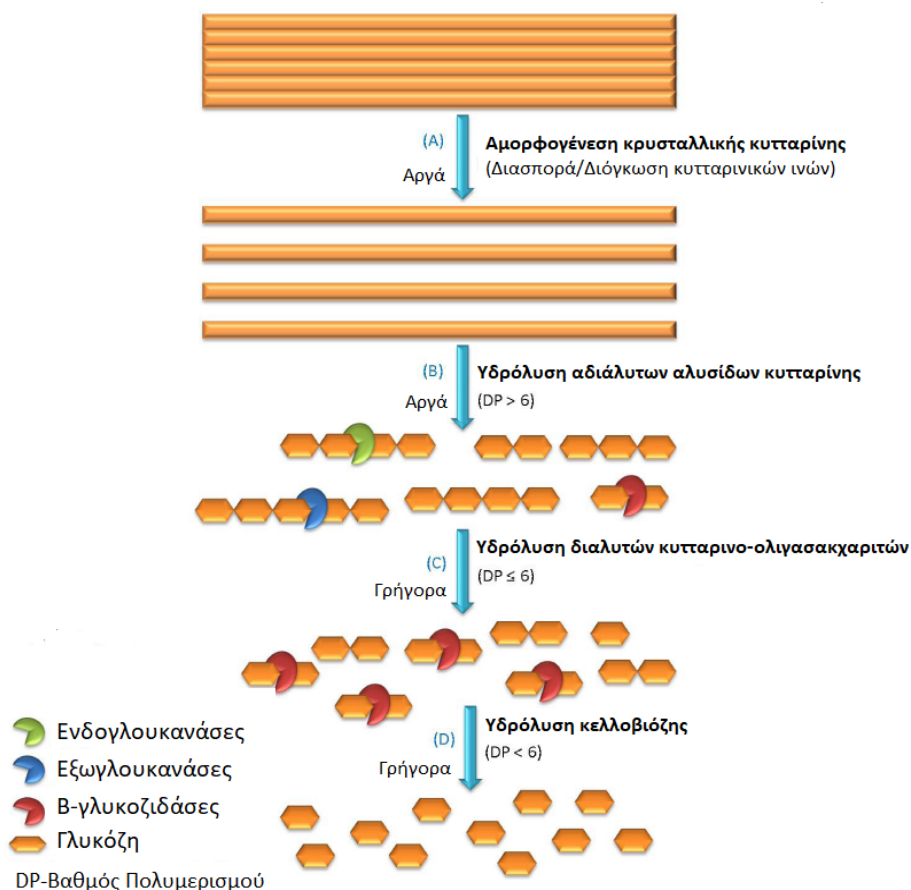
1.3.1.3 Ενζυμική υδρόλυση

Στα μέσα του 19ου αιώνα, παρουσιάστηκε το αρχικό μοντέλο μηχανισμού της ενζυμικής αποικοδόμησης της κυτταρίνης ως ένα C1-Cx μοντέλο. Οι ερευνητές υπέθεσαν τότε ότι ένα υποθετικό συστατικό του συστήματος κυτταρινασών C1 (γνωστό ως παράγοντα διόγκωσης) διασπά την κυτταρική δομή, επιτρέποντας έτσι τον πολυμερισμό περισσότερο υποστρώματος από το μίγμα υδρολυτικών ενζύμων Cx που ακολουθεί. Η πραγματική εικόνα, βέβαια, σήμερα είναι διαφορετική και περιλαμβάνει τις τρεις διαφορετικές ενζυμικές δράσεις, όπως αυτές περιγράφονται παραπάνω, στην παράγραφο 1.3.1.1 (Εικόνα 1.11) [31], [32].

Η ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης περιγράφεται, γενικά, ως ένα σύστημα ετερογενών αντιδράσεων, κατά το οποίο οι κυτταρινάσες αντιδρούν, σε ένα υδατικό περιβάλλον, με την αδιάλυτη και πυκνά οργανωμένη κυτταρίνη. Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, η μορφολογία της κυτταρίνης είναι σύνθετη και ετερογενής σε πολλά δομικά επίπεδα. Αποτελείται, αρχικά, από περιοχές υψηλής τάξης και περιοχές αταξίας, δηλαδή διακρίνεται σε κρυσταλλική και άμορφη κυτταρίνη, αντίστοιχα. Επιπλέον, στα φυτά, οι αλυσίδες κυτταρίνης βρίσκονται στενά πακεταρισμένες με ημικυτταρίνη και λιγνίνη στη μορφή αδιάλυτων μικροϊνιδίων, περιορίζοντας με τον τρόπο αυτό την προσβασιμότητα και αποτρέποντας τη διείσδυση ακόμα και μικρών μορίων, όπως είναι το νερό [17]. Επομένως, μόνο τα μόρια κυτταρίνης που βρίσκονται εκτεθειμένα στην εξωτερική επιφάνεια είναι επιρρεπή σε αποικοδόμηση από τα ένζυμα. Κατ' επέκταση, αν θεωρηθεί ότι η ενζυμική υδρόλυση λαμβάνει χώρα μόνο στην επιφάνεια, τότε η διαθέσιμη επιφάνεια κυτταρίνης καθορίζει το μέγιστο βαθμό υδρόλυσης που είναι δυνατό να επιτευχθεί, ενώ οι στενά πακεταρισμένες περιοχές, παίζουν επίσης βασικό ρόλο, καθώς δυσχεραίνουν την αποικοδόμηση της κυτταρίνης, περιορίζοντας την πρόσβαση στις κυτταρινάσες [16], [33], [34].



Εικόνα 1.10 Υδρολυτικές και μη υδρολυτικές πρωτεΐνες από την επεξεργασία μιας κυτταρίνης από *Trichoderma reesei* και βιοκαταλυτικές αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά την αποικοδόμηση της κυτταρίνης. (Τροποποίηση από [28])

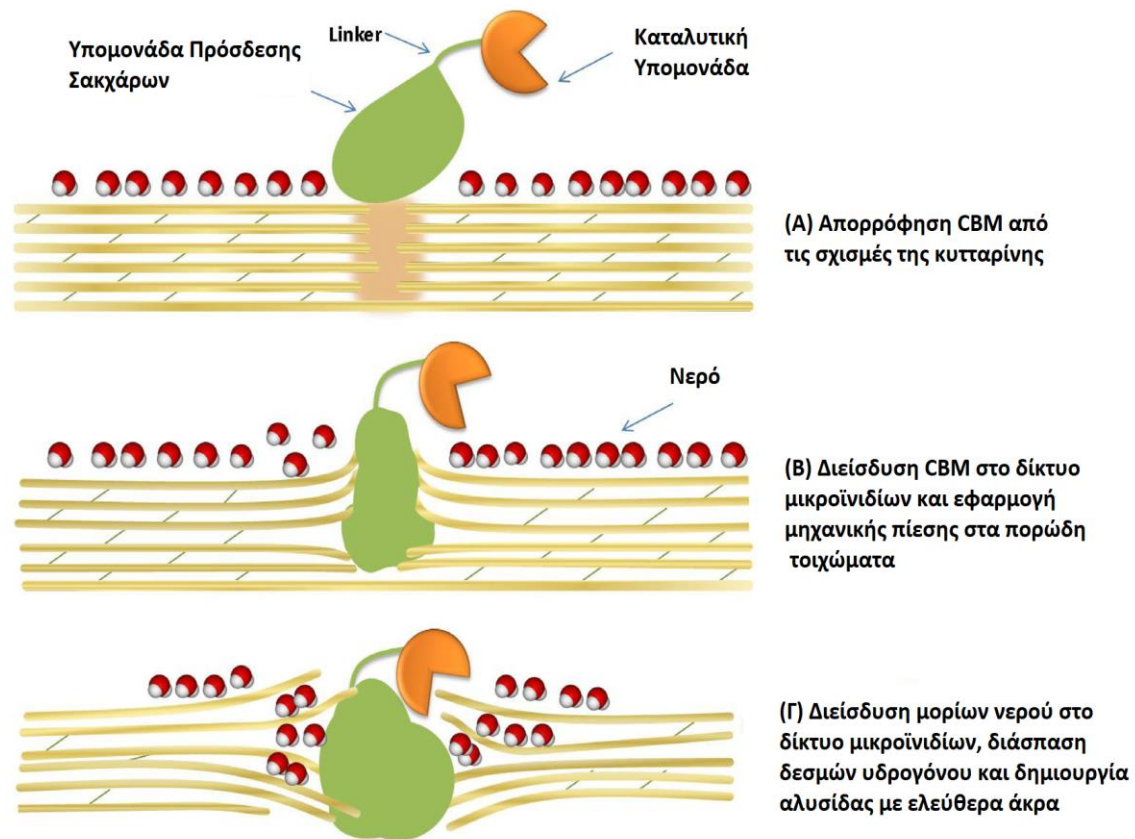


Εικόνα 1.11 Μηχανισμός αμορφογένεσης/αποπολυμερισμού της κυτταρίνης. (Τροποποίηση από [16])

1.3.1.4 Αμορφογένεση

Με τον όρο “αμορφογένεση” περιγράφεται το φαινόμενο της μείωσης του βαθμού κρυσταλλικότητας ή/και της συσσωμάτωσης των ινιδίων και της δημιουργίας μεγαλύτερης διαθέσιμης επιφάνειας αυξάνοντας την εσωτερική επιφάνεια αντίδρασης, ως αποτέλεσμα της διασποράς και διόγκωσης του κυτταρινικού υποστρώματος [35]. Η αμορφογένεση, δηλαδή, αυξάνει την ποσότητα της κυτταρίνης που είναι άμεσα προσβάσιμη στα ένζυμα, ενισχύοντας έτσι τη δραστηριότητα του ινώδους κυτταρινικού υποστρώματος.

Έρευνες έχουν δείξει ότι για να απορροφηθούν οι κυτταρινάσες από την επιφάνεια της αδιάλυτης κυτταρίνης πριν την υδρόλυση, ο όγκος του υποστρώματος που δεν είναι, αρχικά, εύκολα προσβάσιμος, “χαλαρώνει” δομικά, ώστε οι πυκνά πακεταρισμένες περιοχές να υποστούν μια μοριακή αναδιάταξη, αποκαλύπτοντας αλυσίδες κυτταρίνης, μη προσβάσιμες προηγουμένως λόγω των μικροϊνιδίων (αμορφογένεση) (Εικόνα 1.11Α). Στη συνέχεια, όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω, η συνεργιστική δράση μεταξύ των ένδο και έξω-γλουκανασών προάγει την υδρόλυση των διαθέσιμων μορίων σε διαλυτούς ολιγασακχαρίτες (Εικ. 1.11Β), που υδρολύονται περαιτέρω, κυρίως σε κελλοβιόζη (Εικ. 1.11C). Στα περισσότερα εμπορικά συστήματα κυτταρινασών, συνήθως, προστίθεται εξωγενώς μια ποσότητα β-γλυκοζιδάσης για να ενισχύσει τη συνολική αντίδραση υδρολύοντας ολοκληρωτικά την κελλοβιόζη σε γλυκόζη (Εικ. 1.11Δ) [16], [35].



Εικόνα 1.12 Σχηματική αναπαράσταση της αμορφογένεσης των κυτταρινικών ινών λόγω της υπομονάδας πρόσδεσης σακχάρων (CBM) της εξωγλυκανάσης 1 (CBHI) (Τροποποίηση από [16]). Για σαφήνεια, η υπομονάδα πρόσδεσης σακχάρων απεικονίζεται πιο μεγάλη σε σχέση με την καταλυτική υπομονάδα.

Η γενετική μηχανική χρησιμοποιείται εκτεταμένα για την ανάπτυξη καινοτόμων ενζύμων, τον ανασχεδιασμό και την κατασκευή υφιστάμενων ενζύμων και για τη βελτίωση της αποδοτικότητας της παραγωγής. Η μεταγονιδιωματική είναι ένα ιδιαίτερα ισχυρό εργαλείο για την πρόσβαση σε καινοτόμα και πολύ χρήσιμα γονίδια. Στο εμπόριο διατίθεται μια μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων κυτταρινασών εκτός από τις συμβατικές, όπως ενισχυμένα μίγματα κυτταρινασών ή μονοσυστατικές κυτταρινάσες, με εξατομικευμένη σύσταση ανάλογα την επιθυμητή επίδραση στα κυτταρινικά υλικά. Παρόλ' αυτά, η ανάπτυξη νέων και οικονομικά αποδοτικών κυτταρινασών, που διατηρούνται σταθερές και αποτελεσματικές παρουσία και άλλων συστατικών, παρουσιάζει πολλές προοπτικές για μελλοντικές εφαρμογές του ενζύμου, καθώς το υψηλό κόστος επεξεργασίας, σε συνδυασμό με τη μειωμένη αποτελεσματικότητα, συνεχίζουν να αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα για την εκτεταμένη χρήση τους σε πολλές βιομηχανίες.

1.4 Εφαρμογή κυτταρινασών στην κλωστοϋφαντουργική βιομηχανία

Οι κυτταρινάσες, ιδίως οι μικροβιακές, λόγω της πολυπλοκότητας του ενζυμικού τους συστήματος και της τεράστιας δυνατότητας εφαρμογής τους στη βιομηχανία, έχουν υπάρξει αντικείμενο εκτεταμένου

μελέτης και έρευνας τόσο από τον ακαδημαϊκό όσο και από τον ερευνητικό τομέα, πολλά χρόνια. Η έρευνα, σε ενεργή βάση, πάνω στις κυτταρινάσες και τους σχετικούς πολυσακχαρίτες ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1950, λόγω της ιδιαίτερα σημαντικής δυνατότητας τους να μετατρέψουν τη λιγνοκυτταρίνη, την πιο άφθονη και ανανεώσιμη πηγή πάνω στη Γη, σε γλυκόζη και διαλυτά σάκχαρα [31], [35]–[37]. Τις δεκαετίες του 1970 και 1980, εκτεταμένη βασική και εφαρμοσμένη έρευνα έδειξε ότι η βιομετατροπή της λιγνοκυτταρίνης, με τη βοήθεια ενζύμων, σε διαλυτά σάκχαρα ήταν σχετικά δύσκολη και ασύμφορη οικονομικά [35], [36], [38], [39]. Ωστόσο, η συνεχής έρευνα πάνω στις κυτταρινάσες, τις ημικυτταρινάσες και τα σχετικά ένζυμα αποκάλυψε το τεράστιο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον τους και τη δυνατότητα εφαρμογής τους σε διάφορες βιομηχανίες, συμπεριλαμβανομένων των βιομηχανιών των τροφίμων, της ζυθοποιίας και του κρασιού, των ζωοτροφών, της γεωργίας, του χαρτιού, των υφασμάτων και απορρυπαντικών, στην έρευνα και ανάπτυξη, καθώς και σε πολλές ακόμα [7], [36], [40]–[42]. Στη συνέχεια παρουσιάζονται, συνοπτικά, οι εφαρμογές των κυτταρινασών στις διάφορες βιομηχανίες [18].

Στη **γεωργία**, εφαρμόζονται για τον έλεγχο ασθενειών και της ύπαρξης παθογόνων στα φυτά, για τη δημιουργία πρωτόπλαστων φυτών και μυκήτων, για την ενίσχυση της βλάστησης των σπόρων και τη βελτίωση του συστήματος ριζών, για την ανάπτυξη και άνθηση των φυτών, τη βελτίωση της ποιότητας του εδάφους και τη μείωση εξάρτησης από ορυκτά λιπάσματα.

Στη **βιομετατροπή**, οι κυτταρινάσες χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή κυτταρινικών υλικών σε αιθανόλη, άλλους διαλύτες, οργανικά οξέα και μονοκύτταρες πρωτεΐνες και λιπίδια, την παραγωγή ζωοτροφών πλούσιων σε ενέργεια, τη βελτίωση της διατροφικής ποιότητας των ζωοτροφών, της μηρυκαστικής απόδοσης και της πέψης και απορρόφησης των ζωοτροφών.

Στη **ζυθοποιία**, οι κυτταρινάσες βρίσκουν εφαρμογή στη βελτίωση της βύνης και του πολτού της, στη βελτίωση της διαδικασίας στύψης και εξαγωγής του χρώματος των σταφυλιών, του αρώματος των κρασιών, της πρωτογενούς ζύμωσης και ποιότητας της μπίρας και στη βελτίωση του ιξώδους και διαύγασης του μούστου, της ταχύτητας φιλτραρίσματος και της σταθερότητας του κρασιού.

Στη **βιομηχανία τροφίμων**, η χρήση ενζύμων στοχεύει στην απελευθέρωση των αντιοξειδωτικών από τα φρούτα και τα λαχανικά, στη βελτίωση της απόδοσης εξαγωγής σε άμυλο και πρωτεΐνες, στη βελτιωμένη εκχύλιση, συμπίεση και εξαγωγή του χρώματος των φρούτων και λαχανικών, στη βελτίωση της διαύγασης των χυμών φρούτων, της υφής και της ποιότητας των προϊόντων αρτοποιίας, στη βελτίωση της υφής, του αρώματος και των πτητικών ιδιοτήτων των φρούτων και λαχανικών και τον έλεγχο της πικρίας των εσπεριδοειδών.

Στη **βιομηχανία του χαρτιού και του χαρτοπολτού**, οι κυτταρινάσες εφαρμόζονται για τη συμπληρωματική λεύκανση του πολτού, τη βελτίωση της βιομηχανικής πολτοποιήσης, τη μείωση των απαιτήσεων σε ενέργεια και χλώριο, τη βελτίωση της φωτεινότητας της ίνας, των ιδιοτήτων αντοχής, της καθαρότητας του πολτού, τη βελτίωση της αποστράγγισης στη χαρτοβιομηχανία, την παραγωγή βιοαποικοδομήσιμου χαρτονιού, χαρτοπετσετών και χαρτιού υγιεινής.

Στα **απορρυπαντικά**, οι κυτταρινάσες προστίθενται για την καλύτερη δράση καθαρισμού χωρίς την καταστροφή των ινών, τη βελτίωση της φωτεινότητας του χρώματος και την αφαίρεση ακαθαρσιών, την αφαίρεση των κόμπων και χνουδιών από τα βαμβακερά υφάσματα και την αποφυγή της εκ νέου εναπόθεσης σωματιδίων ρύπων (π.χ. από μελάνι) σε αυτά.

Στην **κλωστουφαντουργική βιομηχανία**, οι κυτταρινάσες χρησιμοποιούνται ευρέως για την κατασκευή και το φινίρισμα υλικών που περιέχουν κυτταρίνη, καθώς μπορούν να βελτιώσουν

ορισμένα βασικά βήματα για την παραγωγή του υφάσματος ή ακόμα και να δημιουργήσουν νέα είδη. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία των τζιν και των υφαντικών ινών, στη βελτίωση της ποιότητας, της απορροφητικής ιδιότητας των ινών, της απαλότητας των ενδυμάτων, της σταθερότητας των κυτταρινικών υφασμάτων και στην αφαίρεση περίσσειας βαφής από τα υφάσματα και την αποκατάσταση της φωτεινότητας των χρωμάτων.

Το 1980 ξεκίνησε για πρώτη φορά η εφαρμογή των κυτταρινασών στην επεξεργασία των υφασμάτων με μία μέθοδο που αποκαλείται “biostoning” (ομοιόμορφη παλαιωμένη όψη τζιν μέσω ενζυμικής επεξεργασίας) [43], [44], ενώ πλέον επεκτείνεται στο βιο-φινίρισμα (“biofinishing”) του βαμβακιού και άλλων κυτταρινούχων ινών, με την αφαίρεση των χνουδιών από την επιφάνειάς τους, καθώς και στη χρήση τους στα απορρυπαντικά [26].

Τα νήματα διατάσσονται ως μεγάλες ίσιες αλυσίδες, οπότε παρατηρείται συχνά το φαινόμενο μερικών μικρών ινών που προεξέχουν από το νήμα ή το ύφασμα. Με τη σωστή εφαρμογή της κυτταρινάσης είναι δυνατό να αφαιρεθούν αυτές οι τραχιές προεξοχές της επιφάνειάς και να μειωθεί το χνούδι, μετατρέποντας το ύφασμα σε μαλακότερο, πιο γυαλιστερό και με περισσότερη ένταση χρώματος. Η τεχνική αυτή, γνωστή με την ονομασία “biropolishing”, έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο ένα απαλότερο ύφασμα, αλλά και τη βελτίωση της φωτεινότητας του χρώματος [40].

1.4.1 Ένζυμα στην κλωστοϋφαντουργική βιομηχανία

Η χρήση των ενζύμων στην κλωστοϋφαντουργία είναι ένα παράδειγμα βιομηχανικής βιοτεχνολογίας, που επιτρέπει την ανάπτυξη φιλικών προς το περιβάλλον τεχνολογιών για τη διεργασία της ίνας και στρατηγικών για την βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Γενικά, η χρήση των ενζύμων, όπως των κυτταρινασών, στην επεξεργασία των υφασμάτων παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι παλαιότερων μεθόδων. Ορισμένα από αυτά είναι [26], [45]:

- Εύκολη η χρήση των ενζύμων και δυνατή η αξιοποίηση τους με την προσαρμογή τους στον υπάρχοντα εξοπλισμό και σε διαφορετικά στάδια της υγρής επεξεργασίας των υφασμάτων.
- Ήπιες συνθήκες κατεργασίας γίνονται εφικτές (π.χ. θερμοκρασία και pH).
- Πλήρης βιοδιάσπαση των ενζύμων, οπότε δε συσσωρεύονται στο περιβάλλον.
- Αντικατάσταση του χλωρίου στην κατεργασία και βαφή των ινών από ενζυμικές κατεργασίες συμβάλλοντας στην προστασία του περιβάλλοντος.
- Οικονομικά εφικτή η παραγωγή των ενζύμων σε μεγάλες ποσότητες και δυνατή η ανάκτηση τους μετά το πέρας των διαδικασιών.
- Χρησιμοποίηση των ενζύμων σε διάλυμα, ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός σκόνης και πιθανές αλλεργικές αντιδράσεις που αυτή συνεπάγεται.
- Μείωση του κόστους, με τη μείωση των απαιτούμενων χημικών και ενέργειας, καθώς και των χρόνων επεξεργασίας.
- Αναβάθμιση της ποιότητας δουλειάς και ζωής των εργαζομένων, που έρχονται σε επαφή με τα χρησιμοποιούμενα ως σήμερα τοξικά βοηθητικά - φινιριστικά βαφής.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των υφασμάτων, καθώς και η χρήση τους, καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα [15], [46], [47]:

Πίνακας 1.3 Ένζυμα και οι χρήσεις τους στην κλωστοϋφαντουργία

Ένζυμα	Χρήση	Μικροοργανισμοί
Αμυλάση	Αποκολλάρισμα (desizing)	<i>Bacillus sp.</i> , <i>B. licheniformis</i>
Κυτταρινάσες	Φινίρισμα βαμβακερών υφασμάτων (biopolishing) και επεξεργασία τζιν (biostoning)	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Humicola insolens</i> , <i>Chysosporium lucknowense</i> , <i>Melanocarpus albomyces</i>
Πρωτεάση	Επεξεργασία των ζωικών (μαλλί) ινών και αποκομμίωση του μεταξιού	<i>Aspergillus niger</i> , <i>B. subtilis</i>
Λιπάση	Αφαίρεση λιπαντικών και κεριών	<i>Candida Antarctica</i>
Πηκτινάση	Προεπεξεργασία-πρόπλυση (bioscouring)	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
Λακκάση	Λεύκανση χωρίς χλωρίνη, αποχρωματισμός βαφών	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Trametes hirsuta</i>
Καταλάση	Τερματισμός λεύκανσης	<i>Aspergillus sp.</i>

1.4.2 Κυτταρινικές υφαντές ίνες

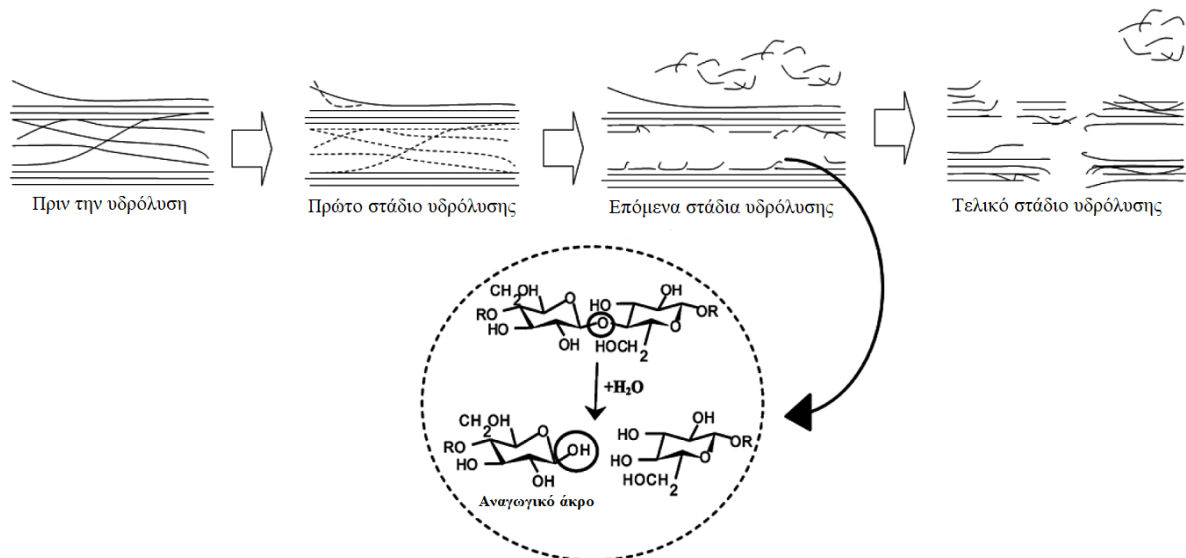
Οι ίνες κυτταρίνης βρίσκονται ανάμεσα στις περισσότερο δημοφιλείς ινώδεις πρώτες ύλες στη βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας. Μάλιστα, το βαμβάκι, που αντιπροσωπεύει μια παγκόσμια παραγωγή 24,8 εκατομμυρίων τόνων το 2020 (26,6 εκατ. τόνοι το 2019) [48], αποτελεί μακράν τη σημαντικότερη φυσική κυτταρινική ίνα, ακολουθούμενο από λινάρι, ραμί, κάνναβη, γιούτα και ίνες που προέρχονται από τα φύλλα και το φλοιό καρπών και φρούτων, όπως η μπανάνα, ο ανανάς και η καρύδα. Ενώ το βαμβάκι (μια ίνα από σπόρο) αποτελείται περισσότερο από 90% κυτταρίνη και μικρές ακαθαρσίες από κερί, πηκτίνες, πρωτεΐνες και άλλες οργανικές και ανόργανες ουσίες, οι ίνες από τα φύλλα και το φλοιό των φυτών συντίθενται από 60-70% κυτταρίνη και περιέχουν σημαντικές ποσότητες λιγνίνης και ημικυτταρίνης [49].

Τον τελευταίο αιώνα έχει καταγραφεί η ανάπτυξη πολλών διαφορετικών διαδικασιών επεξεργασίας των ινών, καθώς και η εξέλιξη των ιδιοτήτων και της ποιότητας τους. Στις αναγεννημένες κυτταρινικές ίνες ανήκουν η βισκόζη, το ραιγιόν, το Iyocell, το modal και άλλες. Οι ιδιότητες των ινών κυτταρίνης διαφέρουν μεταξύ τους και εξαρτώνται από τη δομή και φυσικοχημικές παραμέτρους, όπως το βαθμό πολυμερισμού και το βαθμό κρυσταλλικότητας. Οι αναγεννημένες κυτταρινικές ίνες είναι λιγότερο επιβλαβείς για το περιβάλλον συγκριτικά με το βαμβάκι, κυρίως λόγω των μεγάλων ποσοτήτων λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων που απαιτούνται για την καλλιέργεια του βαμβακιού [50].

Στις περισσότερες κυτταρινικές ίνες της σύγχρονης κλωστοϋφαντουργίας, τα ένζυμα χρησιμοποιούνται εκτενώς για το φινίρισμα των υφασμάτων. Η μετατροπή των κυτταρινικών ινών με ελεγχόμενο τρόπο χωρίς πλεονάζουσες ζημιές, καθίσταται εφικτή χάριν στο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των κυτταρινασών, να εμφανίζουν σχετικά αργό ρυθμό ενζυμικής αντίδρασης. Οι κυτταρινάσες, επομένως παρουσιάζουν πολλές προοπτικές για την εφαρμογή τους σε υφάσματα και απορρυπαντικά [28].

1.4.3 Δράση κυτταρινασών

Η υδρόλυση των βαμβακερών ινών με κυτταρινάση, συνήθως, ξεκινάει από την απορρόφηση του ενζύμου από την ίνα, με την αλληλεπίδραση μεταξύ της υπομονάδας πρόσδεσης σακχάρων του ενζύμου και της κυτταρινικής ίνας. Κατά τη διαδικασία, αυτή, τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος μεταβάλλονται, αλλάζοντας, παράλληλα, τον αριθμό των αναγωγικών άκρων, λόγω της αντίδρασης με την ενδογλουκανάση και εξωγλουκανάση, καθώς και τη δυνατότητα πρόσβασης στην κυτταρίνη, λόγω της κατανάλωσης υποστρώματος και της αποικοδόμησης της κυτταρίνης. Στο πρώτο στάδιο της υδρόλυσης της κυτταρίνης αναμένεται να δημιουργηθούν αναγωγικά άκρα, λόγω της δράσης της ενδογλουκανάσης, που κόβει την κυτταρίνη σε τυχαίες άμορφες περιοχές, χωρίς την απελευθέρωση προϊόντων από την υδρόλυση. Η δράση των κυτταρινασών, όπως και τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος που αλλάζουν κατά την υδρόλυση, αναπαριστώνται στην παρακάτω εικόνα [51].



Εικόνα 1.13 Βασικά στάδια αποικοδόμησης βαμβακερών ινών από κυτταρινάσες. Οι ενδογλουκανάσες κόβουν σε τυχαίες άμορφες περιοχές την κυτταρίνη. (Τροποποίηση από [52])

1.4.3.1 Αφαίρεση ινών και ινιδίων από την επιφάνεια υφάσματος με κυτταρινάσες («Biopolishing»)

Οι κυτταρινάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το φινίρισμα του υφάσματος και του ενδύματος δημιουργώντας προϊόντα υψηλότερης αξίας. Η επεξεργασία με κυτταρινάση για το φινίρισμα υφασμάτων που προέρχονται από κυτταρινικά υλικά, όπως είναι το βαμβάκι, η κάνναβη, το lyocell, το ραιγιον και η βισκόζη, καλείται “biofinishing” ή “biopolishing”. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που

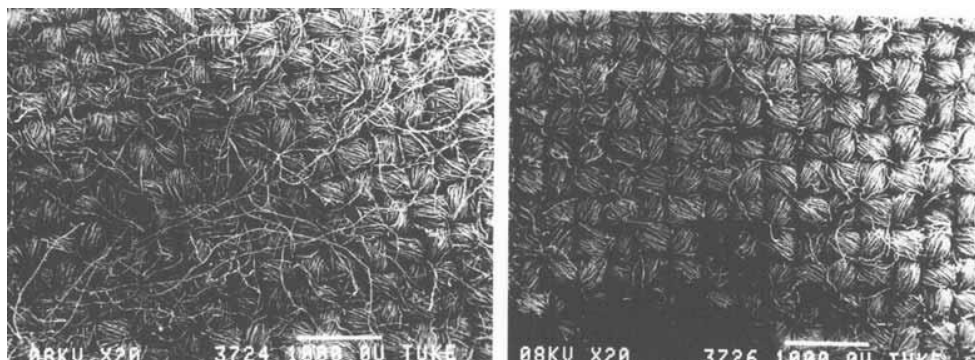
επηρεάζουν την διαδικασία είναι η σύσταση του ενζυμικού παρασκευάσματος (τύπος κυτταρινάσης), ο τύπος της ίνας που επεξεργάζεται και ο μηχανικός εξοπλισμός που χρησιμοποιείται [26].

Τα νήματα που προκύπτουν από μη συνεχείς (περιορισμένου μήκους) ίνες, όπως είναι το βαμβάκι, η βισκόζη και το lyocell, παρουσιάζουν μια τάση να εμφανίζουν χνούδια ή κόμπους (“pilling”) στην επιφάνειά τους, η οποία εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε μικρού μήκους ίνες, την τριχόπτωση και τον τύπο των ινών. Ο όρος «pilling» αναφέρεται σε μικρές μπάλες μπλεγμένων ινών που σχηματίζονται στην επιφάνεια του υφάσματος κατά το πλύσιμο και την παρατεταμένη χρήση ενδυμάτων. Ως αποτέλεσμα, προσδίδουν μια χρησιμοποιημένη εμφάνιση και κάνουν τα χρώματα να φαίνονται θαμπά. Αυτό συμβαίνει λόγω της αυξημένης διάχυτης αντανάκλασης του λευκού φωτός στην επιφάνεια του υφάσματος. Ο όρος “biropolishing” αναφέρεται στην επεξεργασία του υφάσματος με κυτταρινάση, με στόχο την αφαίρεση των ινών και μικροϊνιδίων που προεξέχουν από την επιφάνεια για ένα απαλότερο και φωτεινότερο ύφασμα (Εικόνα 1.14). Η αφαίρεση, ωστόσο, ινών και ινιδίων από την επιφάνεια του υφάσματος έχει μια άμεση επίπτωση στην αύξηση της απώλειας βάρους, που δεν ξεπερνά το 3-5% [28], [53].

Η επεξεργασία με κυτταρινάσες μπορεί να πραγματοποιηθεί στις ίνες, στα υφάσματα ή στα έτοιμα ρούχα, σε διάφορα στάδια, πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά τη βαφή, ακόμα και στο σπίτι με τη χρήση απορρυπαντικών που περιέχουν κυτταρινάση. Η διαδικασία του “biropolishing”, συνήθως πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της υγρής επεξεργασίας, που περιλαμβάνει τα εξής στάδια: αποκολλάρισμα (desizing), διαβροχή-πρόπλυση (scouring), λεύκανση (bleaching), τη βαφή (dyeing) και το φινίρισμα (finishing) [18].

Η χρήση παρασκευασμάτων κυτταρινάσης, που περιέχουν και τα τρία είδη ενζύμου, έχει αποδειχθεί μεν πιο αποτελεσματική όσον αφορά την αφαίρεση των χνούδιών από την επιφάνεια, αλλά προκαλεί μεγαλύτερη βλάβη στο ύφασμα, συγκριτικά με μια κυτταρινάση πλούσια σε ενδογλουκανάση [54]. Η επιλογή, επομένως, της κατάλληλης κυτταρινάσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ευαισθησία της ίνας σε υδρόλυση, η οποία αυξάνεται με την ακόλουθη πορεία: lyocell>βαμβάκι>βισκόζη. Σε υφάσματα που υδρολύονται πιο εύκολα χρησιμοποιούνται, ικανοποιητικά, λιγότερο επιθετικοί συνδυασμοί κυτταρινάσης, όπως η χρήση μόνο ενδογλουκανάσης ή κυτταρινάσης πλούσια σε αυτή.

Εκτός από τη σωστή επιλογή της σύστασης του ενζύμου, η επεξεργασία των βαμβακερών υφασμάτων επηρεάζεται θετικά από την εφαρμογή διατμητικών δυνάμεων (μηχανική ανάδευση) [55], [56], καθώς αυξάνει τη δράση των ενδογλουκανασών έναντι των εξωγλουκανασών, αλλά και από την ταυτόχρονη χρήση τασιενεργών και βοηθητικών ουσιών. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα, αποτελούν το ιστορικό επεξεργασίας του υφάσματος και η παρουσία βαφών στις ίνες [28], [54], [57].



Εικόνα 1.14 Οπτική απεικόνιση μικροσκοπίου βαμβακερού πλεκτού υφάσματος πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την επεξεργασία με κυτταρινάση (μέθοδος «biopolishing») [58].

1.4.3.2 Τεχνητή παλαίωση τζιν ενδυμάτων με κυτταρινάσες («Biostoning»)

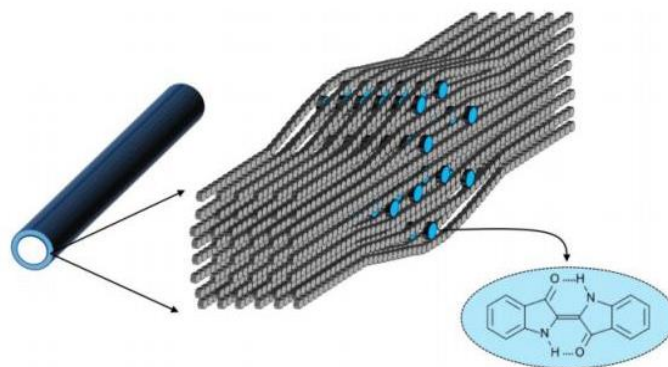
Τα κλασικά παραδοσιακά «μπλου-τζιν» βάφονται με βαφή χρώματος μπλε ίντιγκο και το πετροπλυμένο τελείωμα που δίνει την όψη του ξεθωριασμένου ή φορεμένου, επιτυγχάνεται παραδοσιακά με ελαφρόπετρες. Πλέον, οι ελαφρόπετρες έχουν αντικατασταθεί, στο μεγαλύτερο μέρος τους, με την κατεργασία με κυτταρινάσες, με μια διαδικασία που καλείται «biostoning» και αποτελεί επί του παρόντος την κυρίαρχη διαδικασία για το φινίρισμα των τζιν στη βιομηχανία [57][26], [57].

Η μη ομογενής αφαίρεση της ίντιγκο βαφής με χημικά, άμμο, ελαφρόπετρες (πετροπλύσιμο), τεχνική λέιζερ ή κατεργασία με κυτταρινάσες («biostoning») έχει ως αποτέλεσμα την τεχνητή παλαίωση του υφάσματος, τη φθαρμένη εμφάνιση στα τζιν, επιτυγχάνοντας την επιθυμητή αντίθεση χρώματος άσπρο-μπλε. Η διεργασία αυτή περιλαμβάνει την αφαίρεση του εξωτερικού μέρους της ίνας, υδρολύοντας την βαμμένη επιφάνεια της, ώστε να γίνει ορατό το άσπρο, μη βαμμένο εσωτερικό της. Συγκεκριμένα, οι κυτταρινάσες δρουν στο βαμβακερό ύφασμα και κόβουν τις μικρές άκρες των ινών στην επιφάνεια του νήματος, “χαλαρώνοντας” έτσι τη βαφή, η οποία αφαιρείται εύκολα κατά τη μηχανική τριβή στον κύκλο πλύσης. Η επιφανειακή βαφή των υφασμάτων με χρωστικές χρησιμοποιώντας ρητίνες ή κατιονικές ουσίες επιφέρει παρόμοια αποτελέσματα, συνιστά όμως διεργασία μη φιλική προς το περιβάλλον [18], [28].

Η χρήση κυτταρινάσων έναντι των ελαφρόπετρων παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως:

- αποτρέπει την βλάβη του πλυντηρίου και την καταστροφή των ινών και ενδυμάτων,
- εξαλείφει την ανάγκη απόρριψης χρησιμοποιημένων πετρών,
- συμβάλλει στη βελτίωση της ποιότητας των λυμάτων νερού,
- εξαλείφει την ανάγκη για απομάκρυνση σκόνης από τα τελικά ρούχα, και
- αυξάνει την παραγωγικότητα, καθώς αυξάνεται το φορτίο των ενδυμάτων στο πλυντήριο κατά 50%, αφού δεν χρειάζεται να προστεθούν πλέον πέτρες [13].

Το τελικό εφέ του πετροπλυμένου οφείλεται στη συνδυαστική δράση των υδρολυτικών ενζύμων και διατμητικών δυνάμεων, όπως η μηχανική καταπόνηση και η τριβή στο πλυντήριο και οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με ειδική δράση. Ταυτόχρονα με την ενζυμική δράση, συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται μηχανικά μέσα, ελαφρόπετρες και άλλα μέσα για την αύξηση της φθαρμένης εμφάνισης [15], [59]. Επίσης, το πετροπλυμένο αποτέλεσμα εξαρτάται από τη σύσταση του ενζυμικού μίγματος [57]. Οι κυτταρινάσες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των τζιν προέρχονται από διάφορες πηγές, με τις περισσότερες να προέρχονται από μύκητες, χωρίς βέβαια να αποκλείονται αυτές με βακτηριακή προέλευση [26].



Εικόνα 1.15 Κυτταρινική ίνα με βαφή ίντιγκο [15].

Η χρήση, όμως, των κυτταρινασών για το φινίρισμα των “μπλου-τζιν” επιφέρει δύο σοβαρά μειονεκτήματα: τον επαναχρωματισμό του υφάσματος (“backstaining”) και την ελάττωση της αντοχής. Η επανατοποθέτηση χρώματος στο ύφασμα μειώνει την επιθυμητή αντίθεση ανάμεσα στη μπλε και λευκή ίνα και είναι περισσότερο ορατή στη μέσα πλευρά του υφάσματος και τις τσέπες. Η μείωση αντοχής σχετίζεται άμεσα με την απώλεια βάρους και μπορεί να περιοριστεί με τον έλεγχο του χρόνου κατεργασίας και τη χρήση κατάλληλης κυτταρινάσης [15]. Το πρόβλημα της επανατοποθέτησης χρώματος στο ύφασμα μπορεί να περιοριστεί με τις ακόλουθες διαδικασίες:

- τη χρήση κυτταρινασών με λιγότερο ειδική δράση στην ίντιγκο βαφή ή στο τζιν
- προσαρμόζοντας τη σύνθεση του παρασκευάσματος κυτταρινάσης χωρίς, όμως, να υπάρχει επίπτωση στην αποτελεσματική τριβή
- χρησιμοποιώντας κυτταρινάσες που δεν περιέχουν CBM (υπομονάδα πρόσδεσης σακχάρων) ή όπου αυτή έχει αφαιρεθεί
- την προσθήκη πρωτεάσης κατά την έκπλυση ή στο τέλος του πλυσίματος της κυτταρινάσης
- την προσθήκη χημικών κατά της επαναναπόθεσης χρώματος ή ενός παράγοντα ήπιας λεύκανσης κατά τα στάδια πλύσης ή έκπλυσης, και
- την παρουσία λιπάσης κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας με κυτταρινάση.

1.4.4 Πρόσφατες και μελλοντικές εξελίξεις στη βιώσιμη επεξεργασία κυτταρινικών υφασμάτων μέσω βιοτεχνολογίας

Οι παραδοσιακές διαδικασίες υγρής επεξεργασίας κυτταρινικών υφασμάτων παρουσιάζουν μια μεγάλη πρόκληση για την εφαρμογή βιοτεχνολογίας σε αυτές, λόγω των αρνητικών επιπτώσεων που έχουν στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, οι συμβατικές χημικές διαδικασίες επεξεργασίας κυτταρινικών υφασμάτων περιλαμβάνουν τα εξής βήματα: προ-επεξεργασία, χρωματισμός και τεχνικές φινιρίσματος με σκοπό την απόκτηση των επιθυμητών

τελικών ιδιοτήτων. Η χρήση της βιοτεχνολογίας ως μια φιλική προς το περιβάλλον, πράσινη τεχνολογία συνιστά μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές των σύγχρονων τεχνολογιών στην υγρή επεξεργασία των υφασμάτων.

Η χρήση ενζύμων στα στάδια προεπεξεργασίας και φινιρίσματος των υφασμάτων, αποτελεί διαδικασία βιώσιμη και ασφαλή προς το περιβάλλον, καθώς συμμορφώνεται με τις αρχές της πράσινης χημείας, με αποτέλεσμα τη μείωση της κατανάλωσης χημικών, τη χρήση προϊόντων και διαδικασιών φιλικών προς το περιβάλλον, την καλύτερη διαχείριση ενέργειας και νερού, καθώς την ελαχιστοποίηση των απορριμμάτων (zero waste). Ως εκ τούτου, υπάρχουν, ήδη, πολλά ένζυμα εμπορικά διαθέσιμα για την αναβάθμιση τα εμφάνισης τους προϊόντος, αλλά και βιοϋλικά, όπως βιοπολυμερή, εκχυλίσματα φυτών και φυσικές βαφές, φυτικής ή ζωικής προέλευσης. Τα ανανεώσιμα, αυτά, υλικά, διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, που σχετίζεται με τη λειτουργικότητα των υφασμάτων, όπως την αντιβακτηριακή δραστηριότητα, την προστασία από υπεριώδη ακτινοβολία, την ανθεκτικότητα στη φλόγα, την εντομοαπωθητικότητα και άλλες. Πολλές προοπτικές, επίσης, στη λειτουργικότητα των υφασμάτων παρουσιάζει η βιοσύνθεση με χρήση εκχυλισμάτων φυτών ή μικροοργανισμών, ως ένας νέος τρόπος δημιουργίας νανοσωματίδιων (NPs) μετάλλου (M) και οξειδίων του μετάλλου (MO), MNPs και MONPs, καθώς η μέθοδος, αυτή, είναι οικονομικά αποδοτική, καταναλώνει λιγότερα χημικά, είναι εύκολα εφαρμόσιμη και αβλαβής για το περιβάλλον [60].

1.5 Εφαρμογή κυτταρινασών στη βιομηχανία των απορρυπαντικών

Τα ένζυμα στα απορρυπαντικά χρησιμοποιούνται εδώ και έναν αιώνα στη βιομηχανία. Το πρώτο απορρυπαντικό που περιείχε ένζυμο ως προσθετική ουσία, εισήχθη στην αγορά από τους Röhrl και Haas το 1913, οι οποίοι πρόσθεσαν την πρωτεάση τρυψίνη που λαμβάνεται από το πάγκρεας χοίρων [61]. Παρόλ'αυτά, επειδή η δραστηριότητα και η σταθερότητα της τρυψίνης δεν ήταν ικανοποιητική παρουσία των υπόλοιπων συστατικών των απορρυπαντικών, η προσθήκη ενζύμων στα απορρυπαντικά δεν εδραιώθηκε μέχρις ότου το 1963 η εταιρεία Novo ανέπτυξε την Alcalase[®], μια αλκαλική βακτηριακή πρωτεάση περισσότερο ανθεκτική. Οι αμυλάσες εισήχθησαν στην αγορά την δεκαετία του 1970 για την απομάκρυνση λεκέδων από άμυλο και, σε συνδυασμό με τις πρωτεάσες, χρησιμοποιήθηκαν για την αφαίρεση σαλτσών, στο πλυντήριο πιάτων, αλλά και στο βιομηχανικό και επαγγελματικό καθαρισμό. Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, με την ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας ξεκίνησε και η ανάπτυξη υγρών παρασκευασμάτων ενζύμων για υγρά απορρυπαντικά, με κυρίαρχο παράδειγμα την χρήση κυτταρινασών σε βαμβακερά υφάσματα για την αποφυγή της δημιουργίας χνουδιών και κόμπων στην επιφάνεια τους. Αργότερα, προστέθηκαν και οι λιπάσες στα απορρυπαντικά για την αφαίρεση λιπαρών λεκέδων.

Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα της χρήσης βιολογικών απορρυπαντικών έναντι των συμβατικών χωρίς ένζυμα αναφέρονται παρακάτω:

- αποτελεσματικότητα στην αφαίρεση λεκέδων σε χαμηλότερη θερμοκρασία
- μείωση κατανάλωσης νερού
- μείωση χρήσης χημικών, καθώς τα ένζυμα προκύπτουν από ανανεώσιμες πηγές
- μείωση χρήσης διαλυτών και τοξικών χημικών ενώσεων

- μικρότερη ζημιά σε ευαίσθητα υλικά, όπως μαλλί και μετάξι, και προστασία των χρωμάτων των βαμμένων ρούχων, όπως τζιν, λόγω της πλύσης σε χαμηλή θερμοκρασία.

Προκύπτει, επομένως, ότι η χρήση ενζύμων στα απορρυπαντικά έχει τόσο περιβαλλοντικά όσο και οικονομικά οφέλη [61], [62].

1.5.1 Χαρακτηριστικά κυτταρινασών για χρήση σε απορρυπαντικά

Οι κυτταρινάσες, όπως και τα υπόλοιπα ένζυμα, που χρησιμοποιούνται στα απορρυπαντικά, πρέπει να καλύπτουν ορισμένες απαραίτητες προϋποθέσεις, ώστε να είναι κατάλληλα για τη συγκεκριμένη χρήση. Τα χαρακτηριστικά που είναι απαραίτητα να διαθέτουν τα συμβατά με απορρυπαντικά ένζυμα είναι [1]:

- θερμοσταθερότητα
- δραστικότητα σε ευρύ φάσμα θερμοκρασιών
- σταθερότητα σε αλκαλικό pH
- σταθερότητα σε ανιονικά επιφανειοδραστικά
- πρωτεολυτική σταθερότητα
- σταθερότητα με χηλικούς παράγοντες
- σταθερότητα με χημικούς οξειδωτικούς παράγοντες
- σταθερότητα με λευκαντικούς παράγοντες
- ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος.

Καθώς οι πλύσεις στο σπίτι πραγματοποιούνται, κατά βάση, σε θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 60°C, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα περισσότερα απορρυπαντικά είναι αλκαλικά και περιέχουν οξειδωτικούς παράγοντες, απαιτείται οι κυτταρινάσες που προστίθενται σε αυτά, να είναι σταθερές και δραστικές σε χαμηλές, αλλά και υψηλές θερμοκρασίες, κάτω από αλκαλικές συνθήκες και συμβατές με οξειδωτικά, τασιενεργές ουσίες και τα υπόλοιπα συστατικά των απορρυπαντικών, όπως πρωτεάσες ή λιπάσες [63], [64]. Για παράδειγμα, εδώ και 20 χρόνια, η κυτταρινάση που παράγεται από τον *Humicola insolens* έχει εμπορευματοποιηθεί και χρησιμοποιείται σε σκόνες πλυντηρίων για την αφαίρεση ακαθαρσιών, λόγω των κατάλληλων ιδιοτήτων της, καθώς είναι δραστική σε αλκαλικές συνθήκες (pH 8.5-9.0) και σε θερμοκρασία 50°C [42]. Για τη βελτίωση της σταθερότητας των κυτταρινασών στα υγρά απορρυπαντικά ρούχων χρησιμοποιούνται, κατά κύριο λόγο, ανιονικές και μη ιονικές τασιενεργές ουσίες, κιτρικό οξύ ή υδατοδιαλυτά άλατα, πρωτεάση, κυτταρίνη και ένα μίγμα προπανοδιόλης και βορικού οξέος ή παραγώγου του [28].

1.5.1.2 Ακίνητοποίηση απορρυπαντικών ενζύμων

Τα ένζυμα στη βιομηχανία των απορρυπαντικών μπορεί να ακινητοποιούνται. Κατά την ακινητοποίηση τους, τα ελεύθερα κύτταρα ή ένζυμα, όπως οι κυτταρινάσες περιορίζονται σε ένα ανόργανο/οργανικό υβριδικό φορέα για τη βελτίωση ορισμένων ιδιοτήτων τους. Για παράδειγμα, εμπορικές κυτταρινάσες για τη βελτίωση της ικανότητας τους να αφαιρούν την ίντιγκο βαφή από τα τζιν υφάσματα σε σύγκριση με τις ελεύθερες κυτταρινάσες ακινητοποιήθηκαν σε χημικά τροποποιημένα σωματίδια ελαφρόπετρας. Ως φορέας για την ακινητοποίηση των κυτταρινασών χρησιμοποιήθηκε ZrOCl₂ [65]. Η ακινητοποίηση των κυτταρινασών είναι δυνατό να βελτιώσει την

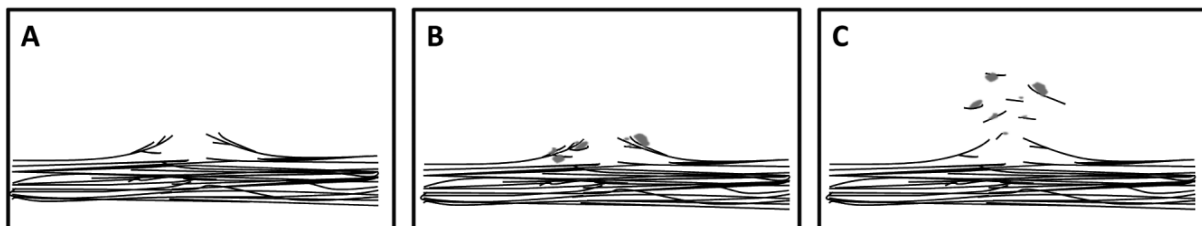
απόδοση του πλυσίματος, παρόλ'αυτά η διεργασία πρέπει να ελεγχθεί και με βάση την οικονομική αποδοτικότητα [66].

1.5.2 Δράση κυτταρινασών στα απορρυπαντικά

Οι περισσότεροι κατασκευαστές απορρυπαντικών χρησιμοποιούν μίγματα κυτταρινασών για το φινίρισμα, τη φροντίδα και τον καθαρισμό των υφασμάτων και για τη διατήρηση της λευκότητας και της έντασης των χρωμάτων των ρούχων. Η προσθήκη της κυτταρινάσης μπορεί να τροποποιήσει τα ινίδια κυτταρίνης των βαμβακερών υφασμάτων ή εκείνων που περιέχουν περιεκτικότητα σε βαμβάκι. Οι επιφάνειες των υφασμάτων χαρακτηρίζονται από τη χημική τους σύσταση, μια συγκεκριμένη γεωμετρία και τραχύτητα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ υγρών και υφασμάτων επιφανειών εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως τη διαβρεξιμότητα των ινών, τη γεωμετρία της επιφάνειας και τα τριχοειδή του ινώδους δικτύου, την ποσότητα και τη χημική φύση του διαβρεχόμενου υγρού, καθώς και τις εξωτερικές δυνάμεις [33].

Μετά από εκτεταμένη χρήση και πολλές πλύσεις τα βαμβακερά υφάσματα τείνουν να δημιουργούν κόμπους και χνούδια στην επιφάνεια τους, λόγω των μικροϊνιδίων της κυτταρίνης. Ταυτόχρονα, τα ενδύματα σταδιακά χάνουν την απαλή τους υφή, τα λευκά γκριζάρουν και τα έντονα χρώματα γίνονται πιο θαμπά. Οι κυτταρινάσες έχουν την δυνατότητα να συνδέονται επιλεκτικά με την κυτταρίνη υδρολύοντας τους β-γλυκοζιτικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα το άνοιγμα της πορώδους δομής της. Καθώς ανοίγουν τα κενά μεταξύ των ινών, οι ίνες ευθυγραμμίζονται και σε συνδυασμό με τη δράση του ενζύμου λειαίνονται οι επιφάνειες των βαμβακερών ινών. Επομένως, οι επαναλαμβανόμενες πλύσεις με ένζυμο προκαλούν μια πιο οργανωμένη δομή της επιφάνειας των υφασμάτων συνεισφέροντας, έτσι, στον καθαρισμό τους. Αυτό επιτυγχάνεται, καθώς, ενώ τα ακάθαρτα σωματίδια συνεχίζουν να εισχωρούν λερώνοντας τους χώρους μεταξύ των ινών, δεν μπορούν να συγκρατηθούν από την τραχύτητα των ινών, οπότε, τελικά, λόγω πλυσίματος, οι ρύποι αφαιρούνται εύκολα από τις λείες βαμβακερές επιφάνειες και απομακρύνονται μέσω των κενών χώρων μεταξύ των ινών με τη βοήθεια του νερού πλύσης [51].

Με τον τρόπο αυτό, οι κυτταρινάσες αφαιρούν τα σωματίδια από ρύπους (π.χ. μελάνι, λάσπη) που έχουν παγιδευτεί στο δίκτυο των μικροϊνιδίων και εμποδίζουν την επανεναπόθεση των λεκέδων και της σκόνης στα ρούχα. Ταυτόχρονα, απομακρύνουν τις ίνες που προεξέχουν, τα χνούδια και τους κόμπους από τα βαμβακερά υφάσματα λειαίνοντας το ύφασμα, βελτιώνοντας, έτσι, τη γενικότερη απόδοση και δράση των απορρυπαντικών [62], [67]. Στην Εικόνα 1.16, παρουσιάζεται ο μηχανισμός απελευθέρωσης των ακαθάρτων σωματιδίων από τις βαμβακερές ίνες, όπως περιγράφηκε παραπάνω.



Εικόνα 1.16 Γενικός μηχανισμός απελευθέρωσης των ακαθάρτων σωματιδίων από τις βαμβακερές ίνες. (Α) Φθαρμένες ίνες. (Β) Ακαθαρσίες προσκολλούνται στις φθαρμένες ίνες. (Γ) Κυτταρινάσες δρουν στα κατεστραμμένα μικροϊνίδια κυτταρίνης, υδρολύοντας και διατηρώντας τα αιωρούμενα στο νερό [52].

Σχετικές έρευνες έχουν δείξει ότι τα οφέλη από τη δράση του ενζύμου που έχει προστεθεί σε απορρυπαντικό είναι αθροιστικά, δηλαδή αυξάνονται μετά από πολλαπλούς κύκλους πλύσης λόγω της αθροιστικής επίδρασης του ενζύμου. Η επίδραση του ενζύμου στο ύφασμα αυξάνεται μετά από κάθε ολοκληρωμένο κύκλο πλύσης, αφού έχει αυξηθεί η έκθεση του στο ένζυμο, μέχρι να φτάσουν ένα πλατό, που εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα. Αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει συσσώρευση ενεργού ενζύμου στο ύφασμα, καθώς το μεγαλύτερο μέρος της ενεργότητας χάνεται κατά τη διαδικασία της ξέπλυσης και του στεγνώματος [51]. Επομένως, οι θετικές επιδράσεις του ενζύμου αυξάνονται με επαναλαμβανόμενες πλύσεις του ενζύμου σε σύγκριση με μία πλύση μεγαλύτερης διάρκειας και όχι το ίδιο το ένζυμο πάνω στο ύφασμα, καθώς τα οφέλη που αυτό επιφέρει αυξάνονται σε κάθε κύκλο πλύσης [52]. Η ανανέωση των χρωμάτων και το αποτέλεσμα αφαίρεσης των χνουδιών που οφείλονται στη δράση της κυτταρινάσης είναι αναγκαία οφέλη για τα υφάσματα και δεν επιτυγχάνονται εύκολα με τη χρήση άλλων απορρυπαντικών συστατικών [52].

1.5.3 Εμπορικές κυτταρινάσες

Οι μικροοργανισμοί αποτελούν την πιο συχνή πηγή κυτταρινασών, καθώς έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν εξωκυτταρικά ένζυμα, σε μεγάλες ποσότητες, ακόμα και όταν καλλιεργούνται σε φθηνά υλικά, όπως αγροβιομηχανικά απορρίμματα και παραπροϊόντα [66]. Επομένως, αφενός, οι συμβατές με απορρυπαντικά κυτταρινάσες είναι δυνατό να αποκτηθούν από τους μύκητες σε μεγάλες ποσότητες και πιο εύκολα συγκριτικά με τα φυτά και τα ζώα [68], και αφετέρου λόγω του γενετικού υλικού των μικροβιακών ειδών κλωνοποιούνται εύκολα σε βακτηριακά είδη για την υπερπαγωγή κυτταρινασών, καθώς οι μικροβιακές κυτταρινάσες είναι λιγότερο δομικά πολύπλοκες σε σχέση με τις βακτηριακές [42], [68]. Οι μικροβιακές κυτταρινάσες που προέρχονται, κατά βάση, από τα γένη: *Aspergillus* [69]–[74], *Trichoderma* (*T. longibrachiatum*, *T. reesei*, *T. viride*, and *T. Harzianum*) [75]–[78], *H. Insolens* [56], *Bacillus* [52], [79], [80], αλλά και από τα είδη *Peniophora* [81] και *Thermoascus* [82], έχουν μελετηθεί εκτενώς για την εφαρμογή τους στα απορρυπαντικά και πολλές από αυτές έχουν εμπορευματοποιηθεί.

Στην αγορά υπάρχουν πολλές κυτταρινάσες διαθέσιμες από διαφορετικές εταιρείες. Για παράδειγμα το Celluzyme® και το Carezyme®, με προέλευση το μύκητα *Humicola* που παράγονται από τη *Novozymes*, είναι δύο κυρίαρχες μάρκες που προστίθενται σε μίγματα απορρυπαντικών, που προορίζονται για πλύσεις βαμβακερών υφασμάτων ή με ορισμένη περιεκτικότητα από βαμβάκι. Σκοπός είναι να τροποποιήσουν την ίνα του υφάσματος, ώστε να βελτιώσουν τη φωτεινότητα χρώματος, την απαλότητα και την αφαίρεση σωματιδιακών ακαθαρσιών [61], [83]. Ένα ακόμη ένζυμο που προστίθεται στα οικιακά απορρυπαντικά, είναι το Puradax, μια ενδογλουκανάση που απομονώθηκε από ένα είδος *Bacillus* από μια αλκαλική λίμνη.

Η πιο πρόσφατη καινοτομία στη βιομηχανία των απορρυπαντικών είναι η χρήση ενός συνδυασμού ενζύμων, έτσι ώστε να αυξηθεί η αποδοτικότητα του καθαρισμού λεκέδων και της φροντίδας του υφάσματος. Για παράδειγμα, το SaniZyme® είναι ένα υγρό απορρυπαντικό τεσσάρων ενζύμων, που περιέχει λιπάση, κυτταρινάση, αμυλάση και πρωτεάση. Πρόκειται για ένα υγρό απορρυπαντικό, με βακτηριοστατικές ιδιότητες, για την αφαίρεση αίματος, πρωτεϊνών, βλεννογόνων, λιπών, λιπιδίων και υδατανθράκων από όλους τους τύπους ενδοσκοπικού εξοπλισμού και χειρουργικών οργάνων. Ένα ακόμη παράδειγμα είναι το Getinge Clean MIS Detergent®, η σύσταση του οποίου, επίσης περιέχει ένζυμο πρωτεάσης, λιπάσης, αμυλάσης, κυτταρινάσης, επιφανειοδραστικές ουσίες, παράγοντες δέσμευσης και αναστολείς οξειδωσης, σχεδιασμένο ειδικά για τον καθαρισμό

πολύπλοκων επεμβατικών οργάνων [83]. Παρότι γνωστές μάρκες ενζύμων, όπως το Carezyme[®], Celluzyme[®], και SaniZyme[®], είναι διαθέσιμες στην αγορά για τον καθαρισμό των υφασμάτων και ρούχων, δεν καλύπτουν όλες τις ανάγκες της βιομηχανίας. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται ορισμένα εμπορικά παρασκευάσματα κυτταρινασών που χρησιμοποιούνται στα απορρυπαντικά [84]–[86].

Πίνακας 1.4 Εμπορικές κυτταρινάσες που χρησιμοποιούνται σε απορρυπαντικά

Εμπορικό Όνομα	Παραγωγός	Προέλευση
Celluzyme [®]	Novozymes	<i>Humicola insolens</i>
Carezyme [®]	Novozymes	<i>Humicola insolens</i>
Celluclean [®]	Novozymes	<i>Bacillus spp.</i>
Puradax	Genencor	<i>Bacillus spp.</i>
Revitalenz	DuPont	
Rocksoft™ Antarctic	Dyadic	
Rocksoft™ Antarctic LTC	Dyadic	
UTA-88	Hunan Youtell Biochemica	
UTA-90	Hunan Youtell Biochemica	
Retrocell Recop	EpyGen Biotech	
Retrocell ZircoN	EpyGen Biotech	

1.5.4 Κατηγορίες ενζύμων στα απορρυπαντικά

Εκτός από τις κυτταρινάσες, οι υπόλοιπες βασικές κατηγορίες ενζύμων που περιέχουν τα απορρυπαντικά, περιλαμβάνουν τις πρωτεάσες, τις λιπάσες και τις αμυλάσες. Στα απορρυπαντικά προστίθενται, επίσης, μαννάσες και πηκτινάσες [1], [69].

1.5.4.1 Πρωτεάσες

Οι αλκαλικές πρωτεάσες διασπούν τους πρωτεϊνικούς δεσμούς στους λεκέδες πρωτεϊνικής προέλευσης και υδρολύουν τις πρωτεΐνες σε διαλυτά πολυπεπτίδια ή ελεύθερα αμινοξέα. Οι πρωτεάσες συνιστούν τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ένζυμα στα απορρυπαντικά. Αφαιρούν λεκέδες, όπως το αίμα, τα αυγά, το γρασίδι, τον ανθρώπινο ιδρώτα με την εφαρμογή του σε απορρυπαντικά ρούχων, αλλά και πρωτεϊνικούς λεκέδες από φαγητά στα μαχαιροπίρουνα, στα πιάτα και στα υπόλοιπα γυάλινα είδη με την προσθήκη τους σε απορρυπαντικά πλυντηρίου πιάτων. Οι πρωτεάσες κατηγοριοποιούνται με βάση την προέλευσή τους (μικροβιακές, ζωικές και φυτικές), τον καταλυτικό μηχανισμό (εξωπεπτιδάσες και ενδοπεπτιδάσες), το βέλτιστο pH (όξιμες, αλκαλικές ουδέτερες πρωτεάσες) και τις καταλυτικές περιοχές.

Η πρωτεόλυση των πρωτεϊνών οδηγεί στην αύξηση της διαλυτότητας των λεκέδων, την ενίσχυση των ιδιοτήτων αφρισμού, την προώθηση της γαλακτωματοποίησης, τη μείωση της επιφανειακής τάσης

και της επαναεναπόθεσης των αποδομημένων πρωτεϊνικών υλικών, βελτιώνοντας, έτσι, τον καθαρισμό των ινών. Οι πρωτεάσες, καθώς και άλλα απορρυπαντικά ένζυμα κοκκοποιούνται και περικλείονται σε κάψουλες στα απορρυπαντικά σε μορφή σκόνης και διατηρούνται σταθερές απουσία νερού. Αντίθετα, στα υγρά απορρυπαντικά πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλοι παρεμποδιστές, ώστε να αποτρέπεται η πέψη των πρωτεασών από τον εαυτό τους ή της αποικοδόμησης των υπόλοιπων ενζύμων. Για το σκοπό, αυτό, χρησιμοποιείται γλυκερίνη, προπυλενογλυκόλη και πολυαιθυλενογλυκόλη σε συνδυασμό με βορικό οξύ [61]. Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται ορισμένα παραδείγματα εμπορικών προϊόντων πρωτεάσης που χρησιμοποιούνται στα απορρυπαντικά [62], [85], [88].

Πίνακας 1.5 Εμπορικές πρωτεάσες που χρησιμοποιούνται σε απορρυπαντικά

Εμπορικό Όνομα	Παραγωγός	Προέλευση
Alcalase®	Novozymes	<i>Bacillus licheniformis</i> .
Durazym®	Novozymes	<i>Bacillus spp.</i> GMO
Esperase®	Novozymes	<i>Bacillus halodurans</i>
Everlase™	Novozymes	<i>Bacillus</i> GMO
Flavourzyme™	Novozymes	<i>Aspergillus oryzae</i>
Neutrase®	Novozymes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Protamex™	Novozymes	<i>Bacillus spp.</i>
Savinase®	Novozymes	<i>Bacillus</i> GMO
Purafect® Prima	Genencor	<i>Bacillus lentus</i>
Properase®	Genencor	<i>Bacillus clausii</i>
Excellase®	Genencor	<i>Bacillus spp.</i>

*GMO=γενετικά τροποποιημένος οργανισμός

1.5.4.2 Αμυλάσες

Οι α-αμυλάσες ενισχύουν την καθαριστική δράση των απορρυπαντικών καταλύοντας τους α-γλυκοζιτικούς δεσμούς από τους ρύπους με βάση το άμυλο σε μικρού μοριακού βάρους σάκχαρα. Οι αμυλάσες διακρίνονται σε άλφα και βήτα ανάλογα με τον τρόπο που καταλύουν τους δεσμούς των μορίων αμύλου. Προστίθενται στα απορρυπαντικά ρούχων και πιάτων για την αφαίρεση λεκέδων, που προέρχονται από μακαρόνια, ζυμαρικά, πατάτες, σάλτσες, κρέμες, πουτίγκα και σοκολάτα [89]. Εμποδίζει, επίσης, το διογκωμένο άμυλο να προσκολληθεί στην επιφάνεια των ρούχων ή γυάλινων ειδών, που δρα ως κόλλα για τα σωματίδια ρύπων. Στη συνέχεια, αναφέρονται ορισμένα προϊόντα α-αμυλάσης που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία [85], [88], [90].

Πίνακας 1.6 Εμπορικές αμυλάσες που χρησιμοποιούνται σε απορρυπαντικά

Εμπορικό Όνομα	Παραγωγός	Προέλευση
----------------	-----------	-----------

BAN	Novozymes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Termamyl	Novozymes	<i>Humicola spp.</i>
Stainzyme	Novozymes	<i>Bacillus spp.</i>
Duramyl	Novozymes	<i>Bacillus spp.</i>
Fungamyl	Novozymes	<i>Aspergillus spp.</i>
Maxamyl	Gist-brocades	<i>Bacillus spp.</i>
Solvay amyl-ase	Solvay	<i>Bacillus licheniformis</i>

1.5.4.3 Λιπάσες

Οι λιπάσες διασπούν τους εστερικούς δεσμούς των λιπών (τριγλυκερίδια) στην ελαιώδη-υδατινή διεπιφάνεια και καταλύουν την υδρόλυση τους σε περισσότερο υδρόφιλα μονο- και διγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Είναι εξαιρετικοί βιοκαταλύτες, καθώς έχουν την ικανότητα να καταλύουν ετερογενείς αντιδράσεις σε υδατικές-απολικές διεπιφάνειες [91]. Οι λιπάσες χρησιμοποιούνται στα απορρυπαντικά ρούχων και πιάτων για την αφαίρεση λιπαρών λεκέδων, όπως βούτυρο, μαργαρίνη, λίπη, λάδι, σούπες, το ανθρώπινο σμίγμα και ορισμένα καλλυντικά. Οι λιπαροί λεκέδες ήταν πάντα δύσκολοι στην αφαίρεση τους από τα υφάσματα και τα γυάλινα είδη, αφενός εξαιτίας της μεγάλης υδροφοβικότητας τους και αφετέρου λόγω της τάσης να χρησιμοποιούνται χαμηλές θερμοκρασίες κατά την πλύση. Παραδείγματα λιπασών που έχουν εμπορευματοποιηθεί και χρησιμοποιούνται στα απορρυπαντικά αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα [85], [88].

Πίνακας 1.7 Εμπορικές λιπάσες που χρησιμοποιούνται σε απορρυπαντικά

Εμπορικό Όνομα	Παραγωγός	Προέλευση
Lipolase	Novozymes	<i>Humicola lanuginosa</i>
Lipolase Ultra	Novozymes	Παραλλαγή Lipolase κατασκευασμένη από πρωτεΐνες
Lipo Prime	Novozymes	Παραλλαγή Lipolase κατασκευασμένη από πρωτεΐνες
Lumafast	Genencor	<i>Pseudomonas mendocina</i>
Lipomax	Gist Brocades	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
Lipex	Novozymes	<i>Thermomyces lanuginosus</i>

1.5.4.4 Μαννάσες και πηκτινάσες

Οι μαννάσες και οι πηκτινάσες προστίθενται, επίσης, στη σύνθεση των απορρυπαντικών με σκοπό τη υδρόλυση λεκέδων με αντίστοιχη προέλευση. Οι μικροβιακές μαννάσες προστίθενται στα απορρυπαντικά με σκοπό την αφαίρεση ακαθαρσιών με βάση τη μαννάνη από τα ρούχα και τα γυάλινα είδη. Συγκεκριμένα, υδρολύουν την αδιάλυτη μαννάνη σε μικρότερα υδατοδιαλυτά

πολυμερή μαννόσης που μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο πλυντήριο κατά το κύκλο περιστροφής, το οποίο είναι ωφέλιμο για τα απορρυπαντικά.

Οι πηκτινάσες είναι μια ομάδα ετερογενών ενζύμων και προστίθενται στα απορρυπαντικά, καθώς υδρολύουν την πηκτίνη από τους λεκέδες αντίστοιχης προέλευσης, που προκαλούνται από φρούτα, λαχανικά, σάλτσες, μαρμελάδες και ζελέ, ώστε να αφαιρούνται πιο εύκολα από τα υφάσματα κατά την πλύση. Στη συνέχεια, αναφέρονται ορισμένα προϊόντα μαννάσης και πηκτινάσες που περιέχονται σε απορρυπαντικά [84].

Πίνακας 1.8 Εμπορικές μαννάσες και πηκτινάσες που χρησιμοποιούνται σε απορρυπαντικά

Εμπορικό Όνομα	Παραγωγός
Mannaway®	Novozymes
Effectenz™	Dupont
XPect®	Novozymes

1.5.5 Συστατικά Απορρυπαντικών

Τα καθαριστικά προϊόντα που υπάρχουν στην αγορά, περιλαμβάνουν ένα μίγμα διαφόρων δραστικών συστατικών, το οποίο ποικίλλει ανάλογα με το σκοπό του προϊόντος. Ένα απορρυπαντικό περιέχει μία ή περισσότερες επιφανειοδραστικές ουσίες, που συνδυάζονται με άλλα συστατικά για την ενίσχυση της καθαριστικής του ικανότητας, καθώς η αφαίρεση των ρύπων είναι δύσκολη, λόγω της ισχυρής δέσμευσης των ακαθαρσιών στο ύφασμα, της δυσκολίας διείσδυσης και τα απορρόφησης των τασιενεργών μορίων στη διεπιφάνεια των ρύπων και του υφάσματος [92]. Κάθε απορρυπαντικό ένζυμο πρέπει να είναι σταθερό και συμβατό με όλα τα συστατικά των απορρυπαντικών, όπως τις επιφανειοδραστικές ουσίες, τους οξειδωτικούς και λευκαντικούς παράγοντες. Στον παρακάτω πίνακα καταγράφεται η γενική σύσταση ενός τυπικού απορρυπαντικού που περιέχει ένζυμα [61], [85], [88], [92]–[96].

Πίνακας 1.9 Τυπική σύσταση ενός ενζυμικού απορρυπαντικού

Συστατικά	Παράδειγμα	Ρόλος	Προσεγγιστική Συγκέντρωση (%)
Ενισχυτικά πρόσθετα (Builders)	Τριπολυφωσφορικό νάτριο, νιτριλοτριοξικό οξύ, κιτρικό νάτριο, EDTA, πολυκαρβοξυλικά	Ενισχύουν την καθαριστική αποτελεσματικότητα των επιφανειοδραστικών	38

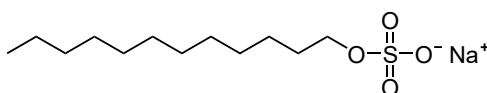
Τασιενεργά/ επιφανειοδραστικά	Αλκυκυλοβενζολοσουλφονικό νάτριο, SDS, Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X-100	Απομακρύνουν τις ακαθαρσίες από τα υφάσματα και αποτρέπουν την επανατοποθέτησή τους	25
Παράγοντες λεύκανσης	Υποχλωριώδες και υπερανθρακικό νάτριο, υπεροξειδίο του υδρογόνου, τετραένυδρο υπερβορικό νάτριο, και χλώριο	Βοηθούν τα υφάσματα να φαίνονται πιο λευκά και φωτεινά, διευκολύνουν στην αφαίρεση λεκέδων	25
Παράγοντες αντιεναπόθεσης ακαθαρσιών	Καρβοξυμεθυλο-κυτταρινικό νάτριο, CMC, πολυακρυλικό νάτριο / πολυαιθυλενογλυκόλη	Εμποδίζουν την επανατοποθέτηση ακαθαρσιών στα υφάσματα	2
Ρυθμιστές αφρού/Σαπουνί	Σαπούνι (καρβοξυλικά άλατα νατρίου)	Ρυθμίζουν το σχηματισμό σαπουνάδας κατά την πλύση	3
Αποσκληρυντικά νερού	Θειικό νάτριο, Ζεόλιθος	Προστατεύουν από τα άλατα	2.5
Συγκολλητική ουσία (binder)	Μεταπυριτικό νάτριο	Προστατεύει τα εξαρτήματα του πλυντηρίου από διάβρωση	1
Ένζυμα	Πρωτεάση, λιπάση, αμυλάση, κυτταρινάση	Καθαρίζουν τις δύσκολες ακαθαρσίες και αναβαθμίζουν την εμφάνιση του ενδύματος	1
Παράγοντες οπτικής φωτεινότητας (φθορίζουσες βαφές)	Τριαζινο-στιλβένια, κουμαρίνες, ιμιδαζολίνη, διαζόλη, τριαζόλη	Λάμπουν μπλε-λευκό σε υπεριώδες φως, κάνουν τα υφάσματα να φαίνονται πιο άσπρα, φωτεινά και καθαρά	0.5
Αλκαλικοί παράγοντες	Υδροξειδίο του νατρίου, ανθρακικό νάτριο	Προσδίδουν αρνητικό φορτίο στους ρύπους και τα υποστρώματα	Ίχνη
Διαλύτες	Αλκοόλη, ακετόνη	Ρυθμίζουν το ιξώδες	Ίχνη
Αρώματα	Έλαια λεμονόχορτου, λεβάντας	Καλύπτουν τη μυρωδιά των χημικών και των ακαθαρσιών και προσθέτουν ευχάριστο άρωμα στα ρούχα	Ίχνη
Μαλακτικά υφάσματος	Άλατα ιμιδαζολινίου	Προσδίδουν απαλότητα	Ίχνη

1.5.5.1 Επιφανειοδραστικές ουσίες

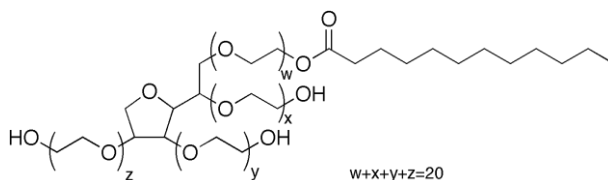
Οι επιφανειοδραστικές ουσίες αποτελούν τα περισσότερο απαραίτητα συστατικά στα απορρυπαντικά και τα οικιακά καθαριστικά, καθώς η λειτουργία τους είναι να αφαιρούν τους ρύπους από τις στερεές επιφάνειες και τα υφάσματα και να τους διατηρούν σε εναιώρημα στο διάλυμα πλύσης, ώστε να αποτρέπουν την επανατοποθέτησή τους στις επιφάνειες και τα ρούχα. Αυτό επιτυγχάνεται, επειδή ένα τασιενεργό είναι αμφίφιλο μόριο, δηλαδή αποτελείται από ένα μέρος υδροφοβικό, αδιάλυτο σε νερό, και ένα υδροφιλικό, διαλυτό σε νερό, με αποτέλεσμα αυτά τα μόρια να δρουν στις διεπιφάνειες μεταξύ αέρα και νερού ή λαδιού και νερού, μειώνοντας έτσι την επιφανειακή τάση στις διεπιφάνειες και αυξάνοντας την απωστική δύναμη μεταξύ των ακαθαρσιών που υπήρχαν εξ αρχής, των ακαθαρσιών που προέκυψαν από την ενζυμική υδρόλυση και του υφάσματος. Η επιλογή της τασιενεργής ουσίας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος του υφάσματος, τη θερμοκρασία πλύσης, το επιθυμητό επίπεδο αφρού, τη μορφή του απορρυπαντικού (υγρό ή σκόνη), τη βιοαποικοδομησιμότητα, την οικοτοξικότητα και άλλους [61], [88].

Τα επιφανειοδραστικά διακρίνονται σε κατιονικά, ανιονικά, μη ιοντικά και αμφοτερικά. Τα κατιονικά επιφανειοδραστικά είναι χημικές ενώσεις με ένα θετικά φορτισμένο άζωτο και τουλάχιστον ένα υδροφοβικό μακράς αλυσίδα υποκαταστάτη. Χρησιμοποιούνται, συχνά, στα απορρυπαντικά ως μαλακτικά των υφασμάτων. Τα ανιονικά επιφανειοδραστικά, όπως το σαπούνι έχουν μία ομάδα νατρίου, καλίου ή αμμωνίου, όπως στο στεατικό νάτριο. Ένα διαδεδομένο παράδειγμα είναι το δωδεκυλο-θειικό νάτριο (SDS). Χρησιμοποιούνται ευρέως, σχεδόν σε όλα τα απορρυπαντικά, κυρίως λόγω του χαμηλού κόστους παρασκευής τους και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά για τον καθαρισμό του χρώματος και ελαιωδών ουσιών. Τα μη ιοντικά επιφανειοδραστικά δεν ιονίζονται στο διάλυμα, με αποτέλεσμα να αποφεύγουν την απενεργοποίηση της σκληρότητας του νερού. Δύο παραδείγματα είναι η πολυαιθυλενο-γλυκολική μονολαουρική σορβιτάνη (Tween 20) και η Οκτυλφαινοξυπολυαιθοξυαιθανόλη (Triton X-100). Τα αμφοτερικά περιλαμβάνουν κατιονικές και ανιονικές ομάδες. Το βασικό τους χαρακτηριστικό είναι η εξάρτηση από το pH του διαλύματος στο οποίο είναι διαλυμένα [92], [97]. Παρακάτω παρουσιάζονται οι χημικοί τύποι ορισμένων διαδεδομένων επιφανειοδραστικών ουσιών.

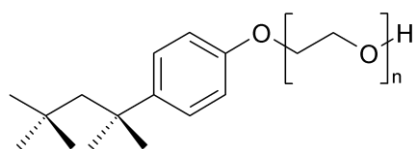
A.



B.



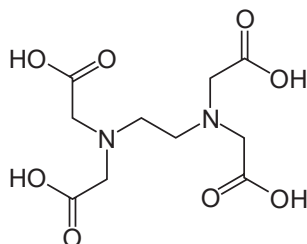
Γ.



Εικόνα 1.17 Χημικοί τύποι επιφανειοδραστικών ουσιών: Α. SDS, Β. Tween 20, Γ. Triton X-100.

1.5.5.2 Ενισχυτικά πρόσθετα απορρυπαντικών

Τα ενισχυτικά πρόσθετα των απορρυπαντικών (builders) είναι τα δεύτερα σημαντικότερα συστατικά των απορρυπαντικών, καθώς μαλακώνουν το νερό δεσμεύοντας τα σκληρά μεταλλικά στοιχεία του νερού, εμποδίζουν τα ιόντα σκληρότητας νερού, ενισχύουν την καθαριστική δράση και αυξάνουν την αποτελεσματικότητα των επιφανειοδραστικών, παρέχουν κατάλληλα επίπεδα αλκαλικότητας, διασπείρουν και κρατούν σε αιώρηση τους ρύπους, ώστε να μην επανατοποθετηθούν στα ενδύματα [92]. Ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ενισχυτικά που προστίθεται στα απορρυπαντικά είναι το EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ), καθώς βελτιώνει την αφαίρεση ρύπων συνδυάζοντας τα απαραίτητα κατιόντα για τη σκληρότητα του νερού (Εικόνα 1.18).



Εικόνα 1.18 Χημικός τύπος EDTA

Επομένως, για να θωρηθεί μια κυτταρίνα κατάλληλη για την εφαρμογή της στα απορρυπαντικά πρέπει, μεταξύ άλλων, να είναι σταθερή και δραστική παρουσία EDTA. Ορισμένες έρευνες έχουν δείξει ότι οι συμβατές με απορρυπαντικά κυτταρίνες από τα είδη *Aspergillus* δεν καταστέλλονται από το EDTA [69], [72], ενώ έχει παρατηρηθεί ότι κυτταρίνες από τα είδη *Trichoderma* δεν είναι σταθερές παρουσία EDTA, επομένως δεν είναι κατάλληλες για χρήση σε απορρυπαντικά [75], [76]. Η μείωση της σταθερότητας παρουσία EDTA πιθανόν να υποδεικνύει μια αντίδραση μεταξύ των καταλυτικών ανόργανων ομάδων του ενζύμου με το EDTA, σχηματίζοντας ένα ανενεργό σύμπλοκο [81].

1.5.6 Μαλακτικά

Η εμφάνιση των μαλακτικών ρούχων στην αγορά ως ξεχωριστή κατηγορία προϊόντων ακολούθησε την εμφάνιση των συνθετικών απορρυπαντικών ρούχων με επιφανειοδραστικές ουσίες, μετά από τον δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο. Πριν από αυτό χρησιμοποιούνταν απορρυπαντικά ρούχων με βάση το σαπούνι, που περιείχαν άλατα ασβεστίου και μαγνησίου των λιπαρών καρβοξυλικών, τα οποία εναποτίθενται στα υφάσματα προσδίδοντας τους απαλότητα. Όμως, τα απορρυπαντικά με επιφανειοδραστικές ουσίες διέθεταν καλύτερη καθαριστική ικανότητα σε σχέση με αυτά με βάση το

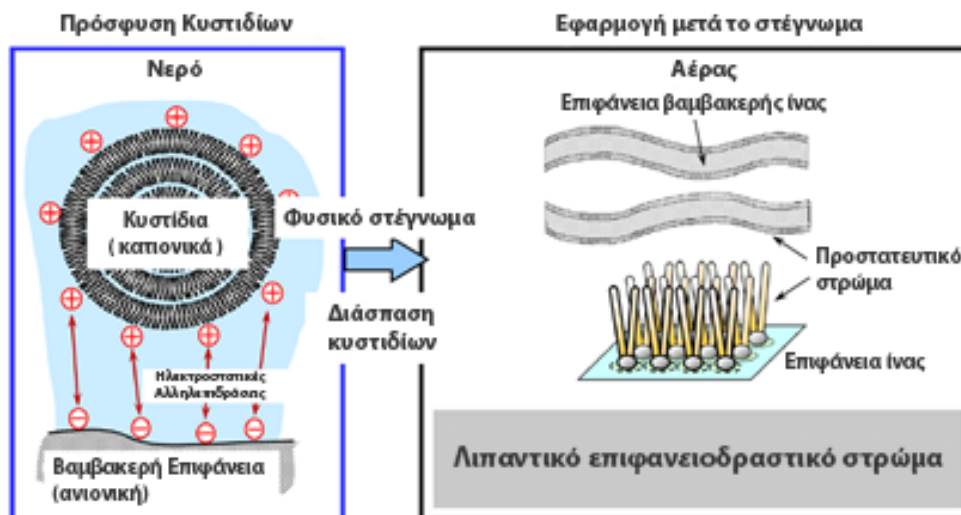
σαπούνι, αλλά αφαιρούσαν τα φυσικά έλαια και τα κεριά που δρούσαν ως λιπαντικά στις φυσικές ίνες. Ως εκ τούτου, τα συνθετικά απορρυπαντικά, είχαν ως αποτέλεσμα πολύ καθαρά, αλλά σκληρά και άβολα στη χρήση υφάσματα [98]. Επομένως, έγινε αναγκαία η χρήση μαλακτικών μετά το πλύσιμο με τα νέα απορρυπαντικά, ώστε τα υφάσματα να μην έχουν τραχιά υφή [99].

Τα μαλακτικά ρούχων αποτελούνται κατά βάση από νερό και προσδίδουν απαλότητα και μαλακή υφή στα ρούχα. Τα συμπυκνωμένα μαλακτικά περιέχουν περίπου 10% w/w κατιονικά επιφανειοδραστικά, τα οποία εξασφαλίζουν σταθερότητα και δρουν ως φορείς των ελαίων και των αρωμάτων στα βαμβακερά ρούχα. Στα εμπορικά μαλακτικά, η συγκέντρωση των κατιονικών επιφανειοδραστικών, πολλές φορές, μειώνεται στο μισό και στη θέση τους προστίθενται φιλικόι προς το περιβάλλον πολυσακχαρίτες [100].

Η επεξεργασία με μαλακτικά βελτιώνει την αίσθηση απαλότητας του υφάσματος, προσδίδει ευλυγισία και ευελιξία, βοηθάει στην μείωση των τσακίσεων και προσδίδει αντιστατικές ιδιότητες στο ύφασμα. Ταυτόχρονα, όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις λόγω της χρήσης των μαλακτικών παρατηρείται μειωμένη σταθερότητα του υφάσματος στο χέρι, κιτρίνισμα των λευκών, μεταβολές της απόχρωσης των χρωματιστών και ξεχείλωμα του ρούχου.

1.5.6.1 Μηχανισμός δράσης των μαλακτικών

Τα μαλακτικά χρησιμοποιούνται στον τελευταίο κύκλο ξέπλυσης της συνολικής πλύσης, στη διάρκεια του οποίου δρουν, κατά κύριο λόγο, στην επιφάνεια των ινών κυτταρίνης. Τα μικρά μόρια του μαλακτικού, επίσης, διεισδύουν στις ίνες, προσδίδουν εσωτερική πλαστικότητα στα πολυμερή από τα οποία αποτελούνται οι ίνες και μειώνουν τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, T_g . Ο μαλακτικός μηχανισμός αποδίδεται στη μείωση της τριβής μεταξύ των ινών. Σύμφωνα με το μηχανιστικό μοντέλο, σε υδατικό, θερμό περιβάλλον τα τεταρτοταγή κατιονικά του μαλακτικού σχηματίζουν γαλακτώματα σε δομή κυστιδίων, που προσφροφώνται στις επιφάνειες των ινών, οι οποίες φορτίζονται αρνητικά μέσω ηλεκροστατικών δυνάμεων. Κατά το στέγνωμα, οι κύστες διασπώνται και οι επιφάνειες των ινών καλύπτονται από λιπαντικά επιφανειοδραστικά στρώματα. Θεωρείται ότι η διαδικασία, αυτή, προκαλεί τη μείωση της τριβής μεταξύ των ινών, αφήνοντας τα ρούχα μαλακά και απαλά [101], [102]. Η απόδοση του μαλακτικού θεωρείται ότι σχετίζεται με την ποσότητα των επιφανειοδραστικών που προσροφάται από τα υφάσματα κατά τη διάρκεια του κύκλου εναπόθεσης [100]. Η φυσική διάταξη των μορίων του μαλακτικού στην επιφάνεια της ίνας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, και εξαρτάται από τον ιοντικό χαρακτήρα του μορίου του μαλακτικού, αλλά και από το σχετικά υδρόφοβο χαρακτήρα της επιφάνειας της ίνας στην απορρόφηση των μαλακτικών κατά την διαδικασία πλύσης. Σε βέλτιστες συνθήκες, περισσότερο από το 80% του μαλακτικού απορροφάται στην επιφάνεια του υφάσματος, με αποτέλεσμα τις επιθυμητές μαλακτικές και αντιστατικές ιδιότητες [102].



Εικόνα 1.19 Ηλεκτροστατική επίδραση των κατιονικών κύστεων με τις αρνητικά φορτισμένες ίνες (αριστερά) και διάλυση κύστεων για την κάλυψη της επιφάνειας της ίνας με λιπαντικά επιφανειοδραστικά στρώματα (δεξιά) (Τροποποίηση από [101]).

Κατά την πλύση, εκτός από την χρήση ενός ξεχωριστού προϊόντος με μαλακτική δράση, που ακολουθεί την πλύση με απορρυπαντικό, είναι δυνατό να επιτευχθεί η μείωση της σκληρότητας του υφάσματος μέσω του απορρυπαντικού, στο οποίο έχουν προστεθεί μαλακτικά συστατικά. Η προσέγγιση, όμως, αυτή αποτελεί μια πρόκληση, καθώς τα μαλακτικά συστατικά πρέπει να είναι συμβατά με τα καθαριστικά συστατικά του απορρυπαντικού και ταυτόχρονα αποτελεσματικά κατά την πλύση, αλλά και την ξέπλυση [99].

1.5.6.2 Κατιονικά μαλακτικά

Στα μαλακτικά προϊόντα χρησιμοποιούνται τεταρτοταγείς χημικές ενώσεις για τη βελτίωση της απαλότητας, τη μείωση της στατικής συσσώρευσης, τη μείωση των τσακίσεων και την πρόσδοση ευχάριστου αρώματος στο ρούχο [102]. Οι χημικές ουσίες, που χρησιμοποιούνται προκειμένου να προσδοθούν τα χαρακτηριστικά, αυτά, στα υφάσματα, ορίζονται συμβατικά ως «μαλακτικά».

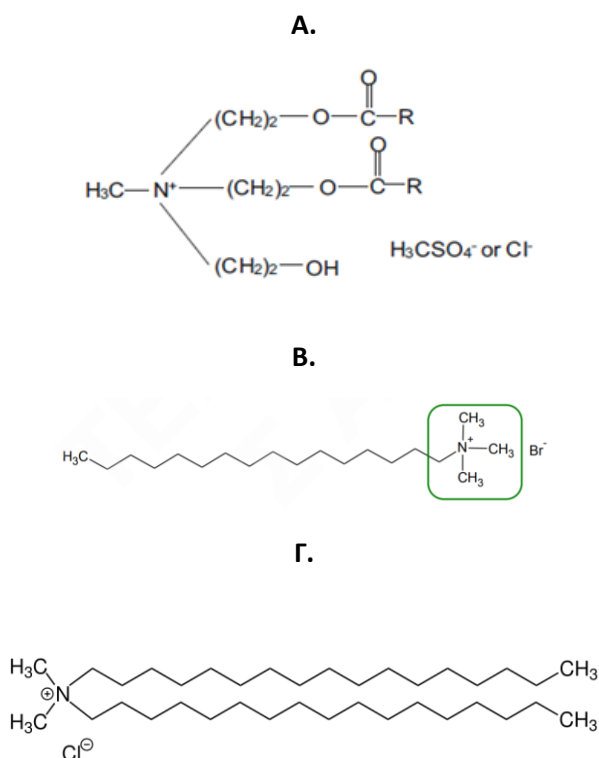
Οι επιθυμητές ιδιότητες που πρέπει να έχει ένα μαλακτικό είναι:

- Συμβατότητα με άλλες χημικές ουσίες
- Ευκολία στο χειρισμό
- Καλές ιδιότητες εξάντλησης
- Σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες
- Να μην επιδρά στις αποχρώσεις και τη σταθερότητα των χρωμάτων
- Βιοδιασπώμενο και μη τοξικό.

Ανάλογα με το φορτίο του μητρικού μορίου, τα μαλακτικά διακρίνονται σε κατιονικά, ανιονικά και μη ιοντικά. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, για τις πειραματικές μεθόδους χρησιμοποιήθηκε μαλακτικό προϊόν με περιεκτικότητα σε κατιονικά. Τα κατιονικά επιφανειοδραστικά προτιμώνται, συνήθως, στη σύσταση των μαλακτικών, καθώς προσδίδουν μαλακή και μεταξένια αίσθηση στα περισσότερα είδη υφασμάτων σε χαμηλές δόσεις, έχουν καλές λιπαντικές ιδιότητες και συχνά

επιδρούν θετικά στην διατήρηση της υγρασίας, βελτιώνουν την αντοχή και την αντίσταση στην τριβή και τη διόγκωση και βελτιώνουν τις αντιστατικές ιδιότητες, ιδιαίτερα στα συνθετικά υφάσματα. Ωστόσο, δεν είναι συμβατά με ανιονικά προϊόντα, η ελεύθερη αμίνη μπορεί να προκαλέσει κιτρίνισμα των λευκών ή να επηρεάσει την απόχρωση και τη φωτεινότητα, να αντιδράσει με το υπολειμματικό χλώριο από τα λευκαντικά, να επηρεάσει τις απορρυπαντικές ιδιότητες προς την αντίθετη κατεύθυνση και να προκαλέσει μαλάκωμα των ινών που έχουν βαφεί με χρωστικές θείου.

Τα τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα («quat actives») είναι η πιο συνήθης κατηγορία κατιονικών επιφανειοδραστικών που χρησιμοποιούνται στα μαλακτικά. Συνήθως έχουν μοριακό βάρος μικρότερο από 1,000 και περιέχουν, κυρίως, 2 μακριές αλκυλικές αλυσίδες. Η τεχνολογία των δραστικών τεταρτοταγών ενώσεων έχει υποστεί αρκετές αλλαγές αναλόγως των αναγκών της αγοράς. Στην κατηγορία, αυτή, ανήκουν, για παράδειγμα, το στεατυλ ή διστεατυλ χλωρίδιο του διμεθυλαμμωνίου (DSDMAC), σέτυλ, διμεθυλ-βενζυλοχλωρίδια του αμμωνίου ή θειικό μεθύλιο και άλλες. Οι παράμετροι, βάσει των οποίων η τεχνολογία εξελίσσεται, περιλαμβάνουν ένα συνδυασμό του κόστους και της ικανότητας βιοαποικοδόμησης για την βελτίωση κάθε νέας γενιάς τεχνολογίας [99]. Στη συνέχεια παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα διαδεδομένων κατιονικών επιφανειοδραστικών ουσιών.



Εικόνα 1.20 Παραδείγματα μαλακτικών τεταρτοταγών ενώσεων: Α. τεταρτοταγής εστέρας της τριαιθαμνολαμίνης [99], Β. Βρωμιούχο δεκαεξυλο-τριμεθαλαμμώνιο (HTAB), Γ. διστεάτυλ χλωρίδιο του διμεθυλαμμωνίου (DSDMAC).

Οι εστερικές τεταρτοταγείς ενώσεις κυριαρχούν στην αγορά ως συστατικά των μαλακτικών, καθώς συνδυάζουν μικρό κόστος και εξαιρετική ικανότητα βιοαποικοδόμησης. Από την άλλη, οι σιλικόνες, ενώ έχουν άριστη μαλακτική δράση, δεν παρουσιάζουν, προς το παρόν, ικανοποιητική αναλογία

κόστους/ απόδοσης, ώστε να είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν σαν βασικό μαλακτικό συστατικό στις οικιακές πλύσεις.

1.5.7 Επίδραση επιφανειοδραστικών ουσιών στις κυτταρινάσες

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, τόσο τα απορρυπαντικά προϊόντα, όσο και τα μαλακτικά περιέχουν επιφανειοδραστικές ουσίες για την ενίσχυση της δράσης τους. Τα απορρυπαντικά περιέχουν, συνήθως, ανιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες και ένα μικρότερο ποσοστό σε μη ιοντικές, ενώ τα μαλακτικά κατιονικές. Τα επιφανειοδραστικά μπορεί να έχουν ριζική επίδραση στην δράση και την σταθερότητα των υδρολυτικών ενζύμων.

Γενικά, ισχύει ότι τα μη ιονικά επιφανειοδραστικά θεωρούνται πιο αβλαβή ως προς τα ένζυμα σε σχέση με τα ανιονικά και κατιονικά. Η διαφορά αποδίδεται στη διαφορά στον τρόπο σύνδεσης. Ενώ ένα μη ιονικό επιφανειοδραστικό συνδέεται με το ένζυμο μόνο μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ένα ιονικό επιφανειοδραστικό μπορεί να συνδεθεί με ένα συνδυασμό ηλεκτροστατικών δυνάμεων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Αυτός ο τύπος σύνδεσης είναι πιο δυνατός και μπορεί να οδηγήσει σε δομικές αλλαγές, ακόμα και σε πολύ μικρή συγκέντρωση επιφανειοδραστικού, συχνά αρκετά μικρότερη από την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση, η οποία εκφράζει την ευκολία σχηματισμού μικκυλιακών συσσωματωμάτων [103].

Έρευνα σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις του κατιονικού επιφανειοδραστικού CTAB με την κυτταρινάση από τον *Aspergillus niger* αποκάλυψε το ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης και η σύνδεση υποδεικνύει δύο είδη σύνδεσης. Το ένα αφορά ένα συνδυασμό ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ενώ το άλλο καθοδηγείται, κυρίως, από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις [104]. Γενικά, τα επιφανειοδραστικά C_n TAB θεωρούνται ως αναστολείς της δράσης των κυτταρινασών. Ωστόσο, άλλη έρευνα έδειξε ότι το C_{16} TAB μπορεί να ενισχύσει αποτελεσματικά την ενζυμική υδρόλυση κυτταρινικού υλικού σε συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων [105]. Το SDS, καθώς και άλλα ανιονικά επιφανειοδραστικά προκαλούν αλλαγές στη διαμόρφωση της κυτταρινάσης, μέσω ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα τη μείωση της ενζυμικής δράσης [106]. Οι επιζήμιες επιδράσεις, ωστόσο, των ανιονικών επιφανειοδραστικών είναι δυνατό να υπερνικηθούν σε ένα μεγάλο μέρος τους με την προσθήκη μη ιονικών επιφανειοδραστικών. Τα μη ιονικά επιφανειοδραστικά δεν έχουν τόσο αρνητικές επιδράσεις στην κυτταρινάση. Μάλιστα, έχει καταγραφεί ότι η παρουσία μη ιονικών μπορεί να επηρεάσει θετικά την υδρολυτική ικανότητα των κυτταρινασών, όταν χρησιμοποιείται λιγνοκυτταρινικό υπόστρωμα [107].

1.5.8 Γενετική μηχανική των κυτταρινασών που χρησιμοποιούνται στα απορρυπαντικά

Η γενετική μηχανική, σε συνδυασμό με την κατευθυνόμενη εξέλιξη και τον ορθολογικό σχεδιασμό μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την βελτίωση της δραστικότητας, της σταθερότητας και της αποτελεσματικότητας, αλλά και τη μείωση του κόστους παραγωγής των συμβατών με απορρυπαντικά κυτταρινασών. Με τις προηγμένες τεχνολογίες στη βιοτεχνολογία, οι βιομηχανίες αναζητούν πράσινες τεχνολογίες και οικονομικά αποδοτικούς τρόπους παραγωγής απορρυπαντικών. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η χρήση δραστικών σε ψυχρές θερμοκρασίες ενζύμων στη σύσταση

απορρυπαντικών ρούχων και πιάτων [1]. Τα πλεονεκτήματα της εφαρμογής πρωτεϊνικής μηχανικής για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη ενζύμων κατάλληλων για εφαρμογή σε απορρυπαντικά είναι τα εξής [1]:

- Βελτιωμένη σταθερότητα στους διαλύτες
- Βελτιωμένη θερμική σταθερότητα
- Δραστικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες
- Δραστικότητα σε αλκαλικές συνθήκες
- Αύξηση εξειδίκευσης υποστρώματος

Πειράματα από τους Wang et al. το 2014 είχαν ως αποτέλεσμα την ετερόλογη έκφραση γονιδίων κυτταρινάσης στον μύκητα *T. Reesei*. Η αλκαλική κυτταρινάση που κατασκευάστηκε είχε τη δυνατότητα να αφαιρεί αποτελεσματικά τα ινίδια από την επιφάνεια τζιν υφασμάτων [57]. Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί η βελτιωμένη σταθερότητα της Cel145 κυτταρινάσης από το μύκητα *Humicola insolens* στη σύσταση απορρυπαντικού, που επιτεύχθηκε μέσω πρωτεϊνικής μηχανικής. Μέσω μεταλλαξιγένεσης δημιουργήθηκαν μεταλλάξεις στην κρυσταλλική δομή της κυτταρινάσης, ώστε να προκύψει ένζυμο με σημαντική σταθερότητα στη σύνθεση των απορρυπαντικών, ενώ προηγουμένως, το τασιενεργό C12-Las αδρανοποιούσε την κυτταρινάση Cel145 από τον *H. Insolens* [108]. Επόμενες έρευνες, μάλιστα, έδειξαν ότι μεταθέτοντας το γονίδιο *stcel* στον μύκητα *H.insolens*, επιτυγχάνονται υψηλά επίπεδα παραγωγής της κυτταρινάσης [109].

Εκτός από τις κυτταρινάσες, και άλλα ένζυμα μελετώνται από την πρωτεϊνική μηχανική για την εφαρμογή τους σε απορρυπαντικά, όπως η πρωτεάση σουμπτιλίσίνη, λόγω της συμβατότητας με τα απορρυπαντικά, της θερμοσταθερότητας, της δραστικότητας σε αλκαλικές συνθήκες και σε ένα εύρος θερμοκρασιών (20–60 °C). Ένα υβρικό ένζυμο δημιουργήθηκε από την Antarctic *Bacillus* TA39 πρωτεάση (S39), αντικαθιστώντας τα 12 εύκαμπτα αμινοξέα με τη μεσόφιλη ακολουθία της σουμπτιλίσίνης (T_{opt} 55 °C), με αποτέλεσμα την αύξηση της δράσης σε θερμοκρασία δωματίου, την εξειδίκευση του συνθετικού υποστρώματος, και ένα ευρύτερο προφίλ υποστρώματος [110]. Επίσης, μία καινοτόμος εστεράση από το είδος *Enterobacter* με μικρή θερμοσταθερότητα (πάνω από 45 °C) υποβλήθηκε σε τυχαία μετάλλαξη και επιτεύχθηκε 3.4 φορές αύξηση της θερμοσταθερότητας της. Η ανάλυση μοντελοποίησης μέσω της ομολογίας αποκάλυψε ότι το υδρόφοβο Ala αντικαταστάθηκε από το υδρόφιλο Asp που αύξησε την αλληλεπίδραση και τη διαλυτότητα [111]. Επομένως, η συνεχής έρευνα στη γενετική και πρωτεϊνική μηχανική είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό και την κατασκευή οικονομικών ενζύμων, όπως κυτταρινασών, συμβατών με τα απορρυπαντικά και με τις επιθυμητές ιδιότητες.

Η έκκριση κυτταρινασών, όπως και για τα υπόλοιπα ένζυμα, είναι δυνατό να ρυθμιστεί κατά τη μεταγραφή από τεχνητούς ή φυσικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, μέσω της μεταβολικής μηχανικής με κατάλληλη χρήση είτε φυσικών είτε τεχνητών μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να προκληθεί η υπερπαραγωγή πρωτεϊνών από τον *T.reesei*. Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να επιτευχθεί με σύγχρονα εργαλεία, όπως η CRISPR-Cas9 που βασίζεται στην επεξεργασία του γονιδιώματος και στη συνθετική βιολογία, και έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν τα επίπεδα χρωματίνης, αναπτύσσοντας, έτσι, βελτιωμένα στελέχη μυκήτων που υπερπαραγωγή κυτταρινάσες [112]. Επίσης, ελέγχοντας τη νηματοειδή μορφολογία των μυκήτων είναι εφικτή η μέγιστη παραγωγή κυτταρινασών. Οι παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάζουν την μορφολογία περιλαμβάνουν την ένταση της ανάδευσης και τα επίπεδα αερισμού, την τιμή του pH, τη θερμοκρασία, την ωσμωτικότητα, την παρουσία στερεών μικροσωματιδίων και άλλους [113]. Υπάρχουν, επομένως πολλές και διαφορετικές γενετικές μέθοδοι που μπορούν να εφαρμοστούν για την παραγωγή

κυτταρινασών για απορρυπαντικά τροποποιώντας το γενετικό τους υλικό διευκολύνοντας, έτσι, την οικονομική παραγωγή κυτταρολυτικών ενζύμων.

1.6 Παρασκευάσματα κυτταρινάσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία

Τα εμπορικά ενζυμικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, είναι το Celluclean® Classic και το Carezyme® Premium της εταιρείας Novozymes και το Revitalenz® 200 της εταιρείας DuPont.

Το ένζυμο Celluclean® ή BaCel5 (κυτταρινάση τύπου 5, E.C. 3.2.1.4) είναι μια καθαριστική αλκαλική ενδογλουκανάση του είδους *Bacillus*. κατάλληλη και για πλύσεις χαμηλής θερμοκρασίας, που χρησιμοποιείται στα απορρυπαντικά ρούχων, κυρίως, για την αποφυγή επανατοποθέτησης των λεκέδων στα καθαρά ρούχα κατά την πλύση. Ο όρος “αλκαλική ενδογλουκανάση” υποδεικνύει μια ενδογλουκανάση με βέλτιστο pH μεγαλύτερο του 7 που διατηρεί περισσότερο από το 70% της μέγιστης δράσης της σε pH 10. Τα είδη *Bacillus* είναι γνωστό ότι παράγουν αλκαλικές κυτταρινάσες, οι οποίες παρουσιάζουν βέλτιστο pH σε ουδέτερες και αλκαλικές συνθήκες, και είναι συμβατές, συνήθως, με πρωτεάσες τύπου σουμπτιλίσίνης, που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές στην βιομηχανία των απορρυπαντικών.

Η BaCel5 περιέχει δύο υπομονάδες πρόσδεσης σακχάρων (CBM) σε σειρά, που θεωρούνται ιδιαίτερα επιλεκτικές ως προς τη σύνδεση τους στην άμορφη κυτταρίνη. Η απορρυπαντική δράση της κυτταρινάσης, αυτών, περιγράφεται ως εξαιρετική, καθώς τα στοχεύει και υδρολύει τις μικρές ίνες, οι οποίες παγιδεύουν τις ακαθαρσίες, μετατρέποντας τα ρούχα σε πιο λευκά με μεγαλύτερη ένταση χρώματος [114], [115]. Παράλληλα, δεν καταστρέφει την ίνα μειώνοντας την αντοχή του υφάσματος, ακόμα και μετά από αυξημένο αριθμό κύκλων πλύσης. Παρόλα αυτά, παρουσιάζει μειωμένη δράση όσον αφορά την ικανότητα να αφαιρεί τα χνούδια από την επιφάνεια του υφάσματος, πιθανόν λόγω της προτίμησης να δρα αποδυναμώνοντας τις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης, διατηρώντας χαμηλή δράση απέναντι στην κρυσταλλική κυτταρίνη [51], [52], [64].

Το Carezyme® ή HiCel45 (κυτταρινάση τύπου 45, EC 3.2.1.4) είναι μια κυτταρινάση του *H. insolens* που χρησιμοποιείται ευρέως στα απορρυπαντικά ρούχων για τη διατήρηση και την αποκατάσταση της απαλότητας και των χρωμάτων στα βαμβακερά υφάσματα, με υψηλή απόδοση ακόμα και για πλύσης χαμηλής θερμοκρασίας. Ο μύκητας *H. insolens* αποτελεί έναν από τους πιο ευρέως ερευνημένους κυτταρολυτικούς μικροοργανισμούς, ο οποίος παράγει ένα ολοκληρωμένο κυτταρολυτικό ενζυμικό σύστημα και αποικοδομεί αποτελεσματικά την κρυσταλλική κυτταρίνη. Τα οφέλη του ενζύμου είναι ικανότητα να αφαιρεί τα χνούδια («anti-pilling») από την επιφάνεια, καθώς κόβει τις μακρύτερες από τις ίνες που προεξέχουν από την επιφάνεια του υφάσματος και δημιουργούν κόμπους, η λείανση του υφάσματος και η ανανέωση των χρωμάτων. Έχει, δηλαδή, την ικανότητα να απομακρύνει τα χνούδια και τους κόμπους και να ενισχύει την καθαρότητα των χρωμάτων [114], [116]. Ένα μειονέκτημα του ενζύμου αποτελεί η πιθανή καταστροφή του υφάσματος αν δεν χρησιμοποιηθεί το ένζυμο με ελεγχόμενο τρόπο [26].

Το Revitalenz® 200 διαθέτει δράση εξωκυτταρινάσης που χρησιμοποιείται ως πρόσθετο συστατικό στα απορρυπαντικά ρούχων, ώστε να συμβάλλει στην καλύτερη απόδοση τους ενισχύοντας την

φωτεινότητα των χρωμάτων των ρούχων και αφήνοντας την επιφάνεια τους απαλή και καινούρια. Συγκεκριμένα, στόχος του είναι να υδρολύσει αποτελεσματικά τα χνούδια που δημιουργούνται στα βαμβακερά υφάσματα, προσδίδοντας τους μια ξεθωριασμένη και θαμπή όψη, και να αποτρέψει τον εκ νέου σχηματισμό τους, ακόμα και για απορρυπαντικά που περιέχουν πρωτεάσες [117], [118].

2. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

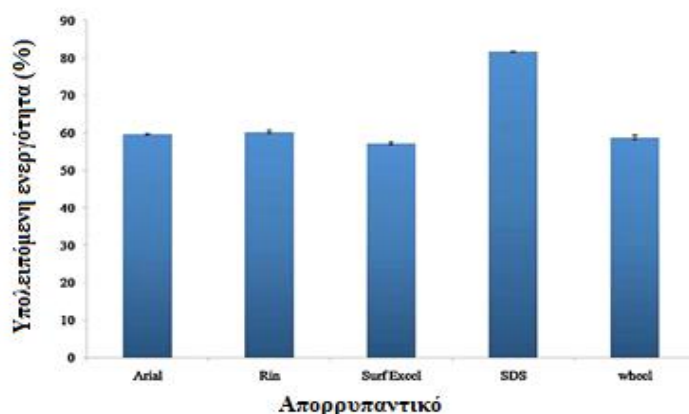
Η έρευνα για ένζυμα με ιδανικές ιδιότητες για εμπορευματοποίηση πραγματοποιείται συνεχώς μέχρι και σήμερα. Οι κυτταρινάσες εφαρμόζονται ευρέως σε πολλές βιοτεχνολογικές βιομηχανίες, όπως στην επεξεργασία υφασμάτων και στην προσθήκη τους σε απορρυπαντικά. Ο ανασταλτικός παράγοντας που περιορίζει την χρήση κυτταρινασών σε βιομηχανική κλίμακα είναι σίγουρα το υψηλό κόστος παραγωγής, αλλά και οι εξειδικευμένες συνθήκες, όπως η σταθερότητα σε ένα συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών, η παρουσία οργανικών διαλυτών ή απορρυπαντικών που απαιτούνται για την βιομηχανική διεργασία και μπορεί να αναστείλουν τη δράση του ενζύμου. Επομένως, υπάρχει μια αυξανόμενη ζήτηση για ιδιαίτερα σταθερές και ενεργές κυτταρινάσες. Στη συνέχεια, αναφέρονται κάποιες σύγχρονες έρευνες σχετικά με την αναζήτηση κυτταρινασών, αλλά και άλλων ενζύμων, που διαθέτουν τις κατάλληλες ιδιότητες και τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, ώστε να παρουσιάζουν προοπτικές για την εφαρμογή τους σε απορρυπαντικά, αλλά και γενικότερα στην επεξεργασία των υφασμάτων. Σημειώνεται, ότι η πειραματική διαδικασία των ερευνών αναφέρεται για σαφήνεια, αλλά και σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

2.1 Έρευνα για συμβατές με απορρυπαντικά κυτταρινάσες

2.1.1 Ενδογλουκανάση από τον μύκητα *Thermoascus aurantiacus*

Η έρευνα που ακολουθεί αφορά τον καθαρισμό και τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων της ενδο-β-1,4-γλουκανάσης που παράγεται από το στέλεχος RBB-1 του *Thermoascus aurantiacus*, ο οποίος είναι γνωστό ότι παράγει και τα τρία είδη κυτταρινασών, συμπεριλαμβανομένων και των ενδογλουκανασών με ιδιαίτερα χρήσιμες ιδιότητες. Κατά την πειραματική διαδικασία, το αραιωμένο διάλυμα ενζύμου, 0.5 mL, αναμίχθηκε με 0.5 mL υποστρώματος 2% w/v CMC σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (0.05M, pH 4.6) στους 60°C. Η σταθερότητα της ενδογλουκανάσης παρουσία εμπορικών απορρυπαντικών, όπως Ariel, Rin, Wheel, Surf Excel αλλά και SDS διερευνήθηκε επώζοντας το ένζυμο με τα απορρυπαντικά (14 mg/mL) σε θερμοκρασία 60°C για 60 λεπτά. Η ενεργότητα θεωρήθηκε μέγιστη (100%) απουσία απορρυπαντικού.

Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, η μέγιστη σταθερότητα, σε ποσοστό 62%, παρουσιάζεται από το ένζυμο παρουσία του απορρυπαντικού Rin, ενώ παρουσία του Ariel, Wheel, Surf Excel εμφανίζει υπολειπόμενη ενεργότητα 61%, 60% και 59%, αντίστοιχα. Παρουσία του εργαστηριακού απορρυπαντικού SDS, η ενδογλουκανάση διατήρησε το 84% της αρχικής της ενεργότητας. Επομένως, το ένζυμο είναι σχετικά σταθερό παρουσία εμπορικών απορρυπαντικών και διατηρεί περίπου το 60% της αρχικής του ενζυμικής δράσης μετά από επώαση μιας ώρας σε αλκαλικές συνθήκες. Η μείωση της ενεργότητας του πιθανόν να οφείλεται στην αδρανοποίηση του σε υψηλότερα pH λόγω της παρουσίας απορρυπαντικού, καθώς η ενδογλουκανάση παρουσιάζει βέλτιστο pH στο 4.0 [82].



Εικόνα 2.1. Επίδραση εμπορικών απορρυπαντικών στην σταθερότητα της ενδογλουκανάσης του *T. Aurantiacus* (Τροποποίηση από [82]).

2.1.2 Θερμοσταθερή ενδογλουκανάση από το στέλεχος HZN11 του *Trichoderma harzianum*

Στην επόμενη έρευνα, μία θερμοσταθερή ενδογλουκανάση που παράχθηκε από το στέλεχος HZN11 από τον *Trichoderma harzianum* καθαρίστηκε και χαρακτηρίστηκε. Κατά την πειραματική μέθοδο, η ενδογλουκανάση επώαστηκε, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 50 °C, με υπόστρωμα CMC σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού pH 6.0 (50mM) και τα αναγωγικά σάκχαρα που απελευθερώθηκαν από την αντίδραση μετρήθηκαν με τη μέθοδο του DNS. Προσδιορίστηκε η επίδραση διαφόρων μεταλλικών ιόντων και προσθετικών, όπως EDTA, σε συγκεντρώσεις 1-10mM, οι σχετικές ενεργότητες της ενδογλουκανάσης παρουσία διαφόρων απορρυπαντικών, όπως SDS, και εμπορικών απορρυπαντικών (Tide, Ariel, Surf Excel), επιφανειοδραστικών και οξειδωτικών παραγόντων, σε συγκεντρώσεις 0.1-1%, η σταθερότητα της παρουσία οργανικών διαλυτών, σε συγκεντρώσεις 10-30%, η εξειδίκευση της σε υποστρώματα, όπως 1% CMC, filter paper.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα μεταλλικά ιόντα, όπως τα Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} και Co^{2+} ενεργοποίησαν το ένζυμο, ενώ τα Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} περιόρισαν τη δράση του. Η δράση της ενδογλουκανάσης ενισχύθηκε από τα προσθετικά DTT και β-μερκαπτοαιθανόλη που υποδεικνύει την παρουσία ομάδων θειόλης στα ενεργά κέντρα και την επανεργοποίηση του ενζύμου, ενώ περιορίστηκε από το ιωδοακεταμίδιο και το p-CMB που υποδεικνύει τη σύνδεση με -SH ομάδες, καθώς και το N-βρωμοηλεκτρίμιδιο που υποδεικνύει την παρουσία υπολειμμάτων τριπτοφάνης στα ενεργά κέντρα. Η ενδογλουκανάση παρουσίασε καλή σταθερότητα παρουσία 1% απορρυπαντικών, όπως το SDS, τετραβορικό νάτριο, Tide, Ariel και Surf Excel διατηρώντας το 90, 85, 68, 71 και 76% της ενεργότητας της, αντίστοιχα. Παρουσία 1% επιφανειοδραστικών, όπως tween-20, tween-40, tween-80 και triton X-100, η ενδογλουκανάση διατήρησε περισσότερο από το 80% της ενεργότητας της. Παρουσία 1% οξειδωτικών παραγόντων, όπως το υπερβορικό νάτριο, το υποχλωριώδες νάτριο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, η ενδογλουκανάση διατήρησε το 64, 73, 40% της ενεργότητας της, αντίστοιχα. Το ένζυμο διατήρησε περισσότερο από το 75% της σχετικής τους ενεργότητας στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, όπως η γλυκερόλη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, η ακετόνη, η προπανόλη, ο πετρελαϊκός αιθέρας, η ισοπροπανόλη, το βενζόλιο, το κυκλοεξάνιο, το εξάνιο, η βουτανόλη και το τολουόλιο, ακόμα και σε περιεκτικότητα 30%. Η σταθερότητα του ενζύμου στους

οργανικούς διαλύτες αποδίδεται στην ιδιότητα του να σχηματίζει πολλαπλούς δεσμούς υδρογόνου με το νερό, με αποτέλεσμα δομική ευκαμψία και κινητικότητα.

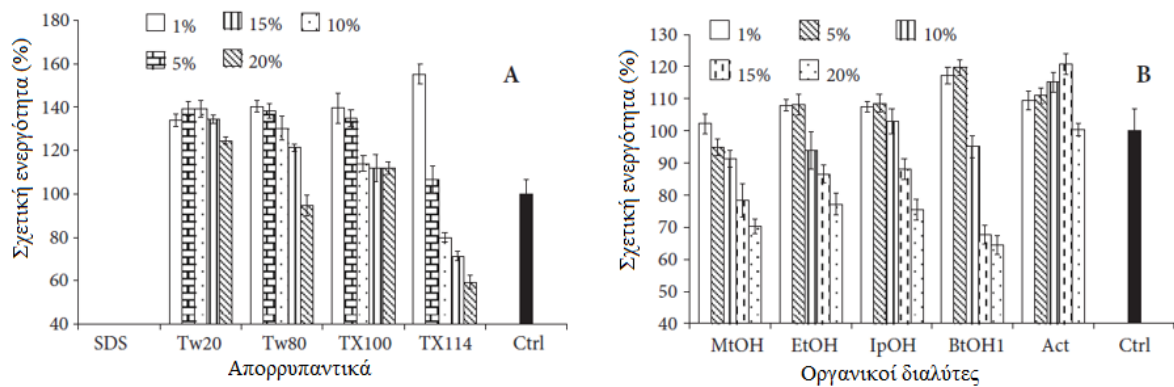
Η ενδογλουκανάση παρουσίασε υψηλότερη εξειδίκευση υποστρώματος με το CMC, και με το filter paper και την μικροκρυσταλλική κυτταρίνη σε μικρότερο βαθμό. Επίσης, η ενεργότητα της ενδογλουκανάσης αυξήθηκε με αύξηση του υποστρώματος και στη συνέχεια υπέστη κορεσμό, λόγω του κορεσμού των ενεργών κέντρων. Μελέτες σχετικά με την αναστολή του ενζύμου έχουν δείξει ότι η κελλοβιόζη εμφανίζει συναγωνιστική αναστολή έναντι της ενδογλουκανάσης, παρουσία CMC [77].

2.1.3 Ανθεκτική στα απορρυπαντικά και τους οργανικούς διαλύτες ενδογλουκανάση από το είδος *Peniophora*

Μια καινοτόμος εξωκυτταρική ενδογλουκανάση από ένα βασιδιομύκητα NDVN01H του είδους *Peniophora* καθαρίστηκε και χαρακτηρίστηκε. Η εύρεση της ενεργότητας της ενδογλουκανάσης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DNS για τη μέτρηση των απελευθερωμένων σακχάρων, με την προσθήκη 1.5 mL 1% w/v διαλύματος DNS στο μίγμα της αντίδρασης. Το μίγμα της αντίδρασης περιλάμβανε 0.5 mL κατάλληλα αραιωμένου ενζύμου (0.53 μg για κάθε αντίδραση) και 1mL 1% w/w CMC σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 10mM, pH 5, και επώαστηκε σε θερμοκρασία 50 °C για 10 min. Η απορρόφηση του διαλύματος μετρήθηκε στα 575 nm σε UV-2500 φωτόμετρο.

Η επίδραση των μεταλλικών ιόντων, απορρυπαντικών και οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα της ενδογλουκανάσης διερευνήθηκε με επώαση 0.32 μg της κυτταρινάσης σε θερμοκρασία 37 °C για 30 min, παρουσία 2-10 mM διαφόρων μεταλλικών ιόντων, EDTA, και β-μερκαπτοαιθανόλης, ή παρουσία 1%-20% w/v διαφορετικών ή παρουσία 1%–20% v/v διαφορετικών διαλυτών.

Από τα αποτελέσματα, προέκυψε ότι η προσθήκη Ni²⁺ αύξησε την ενεργότητα του ενζύμου 47%-68%, που υποδεικνύει την χρήση δισθενών κατιόντων νικελίου για βέλτιστη δράση. Επίσης, η προσθήκη Ag⁺ και Cu²⁺, περιόρισε τελείως την ενζυμική δράση. Τα μεταλλικά ιόντα K⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, και Zn²⁺ είχαν μικρή επίδραση, ενώ τα Na⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ και το EDTA οδήγησαν σε μέτρια αναστολή. Η αναστολή του ενζύμου παρουσία EDTA υποδεικνύει ότι πιθανόν αυτό να περιέχει ανενεργές ομάδες που σχηματίζουν ανενεργά σύμπλοκα με το EDTA. Η αύξηση της δράσης της ενδογλουκανάσης παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης υποδεικνύει την απουσία ομάδων θειόλης. Όπως φαίνεται στην εικόνα, τα Tween 20, Tween 80 και Triton X-100 σε περιεκτικότητα 1%–20% w/v και το Triton X-114 σε 1%–5% w/v αύξησαν την ενεργότητα της ενδογλουκανάσης έως και 55%, ενώ η δράση του ενζύμου περιορίστηκε από το Triton X-114 (10%-20% w/v) και εμποδίστηκε τελείως από το SDS. Σχετικά με την επίδραση των οργανικών διαλυτών η ενδογλουκανάση παρουσίασε μεγάλη ανθεκτικότητα, καθώς η προσθήκη ακετόνης αύξησε την ενεργότητα κατά 21%, η προσθήκη άλλων διαλυτών σε περιεκτικότητα 1%-5% v/v αύξησε την ενεργότητα έως και 20%, ενώ η προσθήκη περιεκτικότητας 10%-20% οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας μέχρι 36% [81].

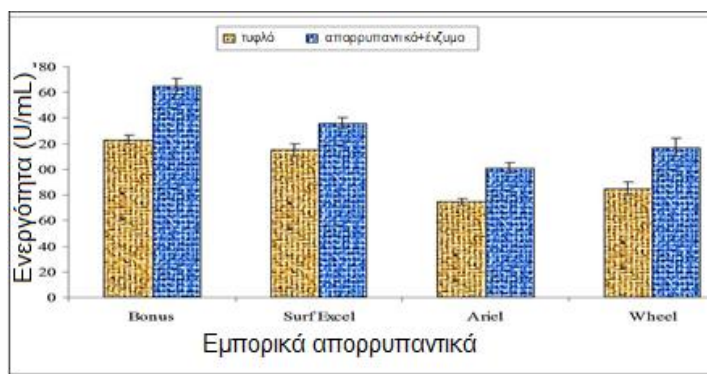


Εικόνα 2.2 Επίδραση απορρυπαντικών (A) και οργανικών διαλυτών (B) στην ενεργότητα της ενδογλουκανάσης (Τροποποίηση από [81]).

2.1.4 Συμβατή με απορρυπαντικά ενδογλουκανάση από αγροτοβιομηχανικό υπόλειμμα του *Trichoderma harzianum* μετά από ζύμωση στερεάς κατάστασης

Στην έρευνα που ακολουθεί, μια ενδογλουκανάση του *Trichoderma harzianum* από αγροβιομηχανικά απόβλητα καθαρίστηκε, χαρακτηρίστηκε και διερευνήθηκε η εφαρμογή της στην βιομηχανία των απορρυπαντικών. Για την διερεύνηση συμβατότητας της ενδογλουκανάσης με τα απορρυπαντικά χρησιμοποιήθηκαν τα απορρυπαντικά (σε σκόνη) Ariel, Bonus, Surf Excel και Wheel. Το μίγμα της αντίδρασης, που αποτελούνταν από 1.10 mL διαλύματος απορρυπαντικού, 3.0 mL υποστρώματος (καθαρό διάλυμα ενζύμου 0.5% διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος σε pH 6) και 0.9 mL ενδογλουκανάση, επώασθη σε θερμοκρασία 50 °C για 15 λεπτά. Για τη διερεύνηση της ικανότητας της ενδογλουκανάσης να αφαιρεί τους λεκέδες, χρησιμοποιήθηκαν δύο τεμάχια (10 × 10 cm) λευκού υφάσματος που λερώθηκαν τοπικά με ανεξίτηλο μπλε μελάνι. Στη συνέχεια, τα δύο τεμάχια βυθίστηκαν σε απορρυπαντικό διάλυμα με ένζυμο και σε απορρυπαντικό διάλυμα χωρίς ένζυμο. Η καθαριστική ικανότητα της ενδογλουκανάσης παρατηρήθηκε μετά από περίοδο επώασης (10-15 λεπτά) σε θερμοκρασία 50 °C και αφού τα υφάσματα ξεπλύθηκαν με νερό 2 φορές.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.3, τα απορρυπαντικά Bonus και Surf Excel παρουσίασαν μέγιστη συμβατότητα στους 50 °C. Το τυφλό δείγμα εμφάνισε πολύ χαμηλές τιμές ενζυμικής ενεργότητας σε σχέση με το διάλυμα με ενδογλουκανάση. Η Εικόνα 2.4 δείχνει ότι το απορρυπαντικό διάλυμα με το ένζυμο αφαίρεσε τελείως το λεκέ από μελάνι από το λευκό ύφασμα, ενώ το σκέτο διάλυμα απορρυπαντικού άφησε σημάδι. Παρατηρήθηκε, επίσης ότι η προσθήκη ενδογλουκανάσης βελτίωσε την ποιότητα του υφάσματος με τη βελτίωση της υφής του και της λευκότητας. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η συγκεκριμένη ενδογλουκανάση παρουσιάζει πολλές προοπτικές για την βιομηχανία των απορρυπαντικών ως κατάλληλη προσθετική ουσία στα απορρυπαντικά για τη βελτίωση του πλυσίματος και της διατήρησης της ποιότητας του υφάσματος [76].



Εικόνα 2.3. Συμβατότητα καθαρής ενδογλουκανάσης με εμπορικές μάρκες απορρυπαντικών (Τροποποίηση από [76]).



Εικόνα 2.4 Ικανότητα αφαίρεσης λεκέδων της ενδογλουκανάσης. Το μεσαίο δείγμα (Sample 1) επεξεργάστηκε με απορρυπαντικό διάλυμα, ενώ το δεξί δείγμα (Sample 2) με απορρυπαντικό διάλυμα με προσθήκη καθαρής ενδογλουκανάσης παρουσίασε παντελής αφαίρεση του λεκέ από μελάνι, σε σχέση με το τυφλό δείγμα (Control) (Τροποποίηση από [76]).

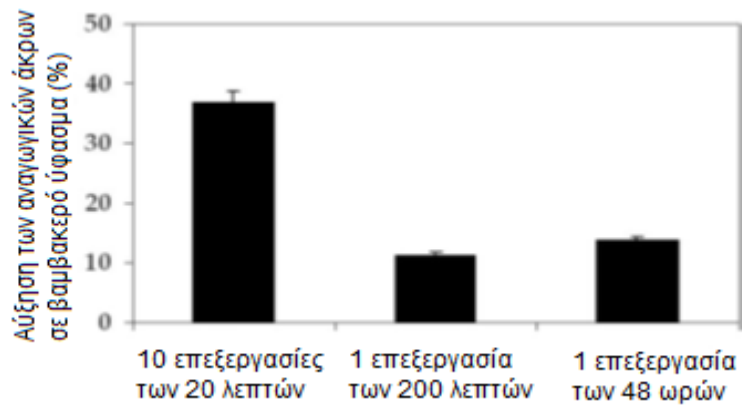
2.1.5 Επεξεργασία βαμβακερών ινών με αλκαλική κυτταρινάση του είδους *Bacillus*

Είναι γνωστό πολλά χρόνια ότι το είδος *Bacillus* παράγει αλκαλικές κυτταρινάσες, που παρουσιάζουν βέλτιστο pH σε ουδέτερες ή αλκαλικές συνθήκες. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την επεξεργασία βαμβακερών ινών με κυτταρινάση του είδους *Bacillus*, ως κυτταρινάση χρησιμοποιήθηκε η αλκαλική ενδογλουκανάση BaCel5 που προμηθεύτηκε από την εταιρεία Novozymes με το εμπορικό όνομα Celluclean® (325.4 EGU/g), ενώ ως κυτταρινικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν μη αποχρωματισμένα βαμβακερά υφαντά υφάσματα.

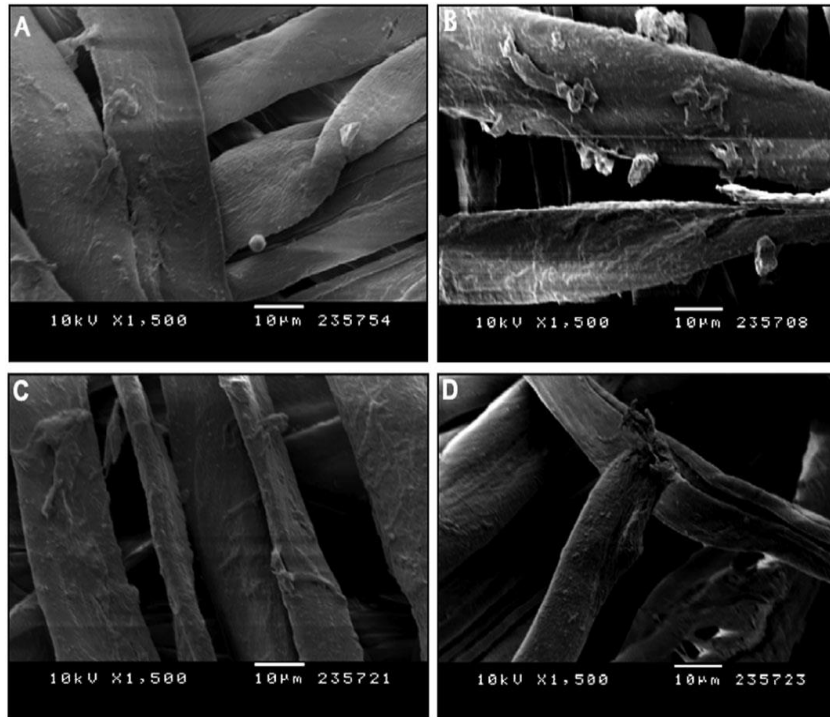
Τα βαμβακερά υφάσματα (4g) επεξεργάστηκαν με την κυτταρινάση, με δοσολογία 1 και 0.5 mg πρωτεΐνης/L, σε 800 mL απορρυπαντικού, σε αναλογία 1:200 υφάσματος/υγρού, σε θερμοκρασία 40°C, σε ειδική συσκευή για πειράματα με απορρυπαντικά, Detergent Tester, με ανάδευση 120 rpm. Για την εκτίμηση της προσβασιμότητας των κυτταρινικών ινών, πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές επεξεργασίες με το ένζυμο, μία ενιαία για 80 λεπτά και 4 διαδοχικές 20 λεπτών η κάθε μία, προσθέτοντας νέο ένζυμο στην αρχή κάθε φοράς. Τα βαμβακερά δείγματα αναλύθηκαν μέσω της απορρόφησης ιωδίου (iodine adsorption test, ISV) και πραγματοποιήθηκε ανάλυση με

φθορίζουσα χρωστική ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC). Για το χαρακτηρισμό της επιφάνειας του βαμβακερού υφάσματος, ορισμένα δείγματα επεξεργάστηκαν σε 10 διαδοχικούς κύκλους πλύσης, 20 λεπτών ο καθένας, κάποια δείγματα πλύθηκαν για 200 λεπτά, ενώ άλλα για 48 h, στις ίδιες συνθήκες με προηγούμενως. Τα δείγματα αναλύθηκαν με μετρήσεις του αναγωγικού άκρου και χρήση SEM. Μετά την ενζυμική επεξεργασία, όλα τα δείγματα ξεπλύθηκαν με μη ιονισμένο νερό σε 3 κύκλους πλύσης 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου και αφέθηκαν να στεγνώσουν.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η διαδοχική επεξεργασία με το ένζυμο προκαλεί το σχηματισμό μικρών ινών στο βαμβακερό ύφασμα, που επιβεβαιώνεται και από την ανάλυση με SEM. Παρότι παρατηρήθηκε απελευθέρωση των μικρών ινών στα 20 λεπτά, αυξήθηκε η διαθέσιμη επιφάνεια για την υδρόλυση της κυτταρίνης. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι είναι πιθανό το ένζυμο να προτιμάει να επιτίθεται σε νέες περιοχές του υφάσματος, από ότι να συνεχίζει να δρα απελευθερώνοντας μικροϊνίδια που είχαν κοπεί από τους προηγούμενους κύκλους πλύσης. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι οι αλλαγές στην επιφάνεια του υφάσματος προέκυψαν μετά από τις επαναλαμβανόμενες πλύσεις με ένζυμο και όχι με τη μία πλύση μεγαλύτερης διάρκειας. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι η ενδογλουκανάση έχει την ιδιότητα/προτίμηση να υδρολύει τις μικρές ίνες. Από την έρευνα προέκυψε, επομένως, ότι οι βαμβακερές ίνες μπορούν να μετατραπούν σε μικροϊνίδια, χωρίς την απελευθέρωση κυταρρινικού υλικού (μείωση δημιουργίας σακχάρων) με τη χρήση ενδογλουκανάσης σε μικρή συγκέντρωση και με σύντομες επεξεργασίες. Η BaCel5, τελικά, ενισχύει την φροντίδα του υφάσματος χωρίς αυτό να καταστρέφεται [52].



Εικόνα 2.5 Ποσοστά αναγωγικών άκρων για τους αναγραφόμενους χρόνους επώασης (1mg πρωτεΐνης/L, 40°C, 125 rpm) (Τροποποίηση από [52]). .



Εικόνα 2.6 Φωτογραφίες από SEM των βαμβακερών υφασμάτων. (Α) Τυφλό δείγμα χωρίς επεξεργασία με ένζυμο, (Β) Επεξεργασία με ένζυμο 10 διαδοχικές φορές, 20 λεπτών, (Γ) Επεξεργασία 200 λεπτά, (Δ) Επεξεργασία 48 ώρες (1mg πρωτεΐνης/L, 40°C, 125 rpm).

2.1.6 Βελτίωση της ικανότητας καθαρισμού βαμβακερών υφασμάτων λόγω της επεξεργασίας τους με κυτταρινάσες

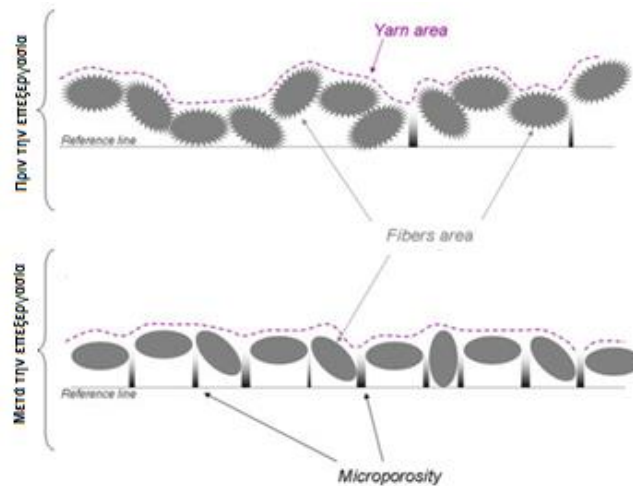
Στην επόμενη έρευνα, εξετάστηκε η βελτίωση της καθαριότητας βαμβακερών υφασμάτων μέσω τοπογραφικών αλλαγών τους, λόγω της επεξεργασίας τους με κυτταρινάσες κατά τη διάρκεια κύκλων πλύσης-στεγνώματος (wash-dry). Κατά την πειραματική διαδικασία, υφασμάτινα (υφαντά) τεμάχια ελέγχου (50 cm×50 cm) πλύθηκαν σε θερμοκρασία 23°C με νερό και διαλύματα 0.12 και 0.2 ppm κυτταρινάσης, σε πλυντήριο για 20 λεπτά, με ανάδευση (40rpm). Στη συνέχεια, τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν όλη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Η διερεύνηση της επίδρασης της επεξεργασίας με ένζυμο στον καθαρισμό του υφάσματος έγινε μέσω τριών παραμέτρων, του μικροπορώδους, της πραγματικής επιφάνειας των ινών (yarn area) και της αρχικής επιφάνειας προς την πραγματική (fiber area).

Η επίδραση του πλυσίματος για τα δείγματα που πλύθηκαν 4 φορές παρουσία ενζύμου ήταν θετική, 4.33 και 5.44% βελτίωση της καθαριότητας, για συγκέντρωση ενζύμου 0.12 και 0.2 ppm, αντίστοιχα. Μετά από 8 κύκλους πλυσίματος, η επίδραση της δράσης του ενζύμου υψηλότερης συγκέντρωσης ήταν ακόμα αισθητή (4.77%), ενώ η καθαριστική ικανότητα μειώθηκε στο 1.2% για τη χαμηλότερη συγκέντρωση.

Προκύπτει, επομένως, ότι τα αποτελέσματα από τη δράση του ενζύμου είναι αθροιστικά, και όχι το ίδιο το ένζυμο, καθώς τα οφέλη που επιφέρει αυξάνονται σε κάθε κύκλο πλύσης μέχρι να φτάσουν σε ένα πλατό, το οποίο εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα. Η επίδραση της επεξεργασίας με ένζυμο μπορεί να εξεταστεί με δύο προοπτικές. Από τη μία πλευρά, λαμβάνοντας

υπόψη την επίδραση της μηχανικής καταπόνησης λόγω πλύσης στο πλυντήριο σε συνδυασμό με τη δράση του ενζύμου, ενώ από την άλλη υπολογίζοντας μόνο την δράση του ενζύμου.

Όπως φαίνεται και από το παρακάτω σχήμα, η ικανότητα καθαρισμού του υφάσματος βελτιστοποιείται με τη δράση του ενζύμου, καθώς ανοίγουν κενά μεταξύ των ινών, οι οποίες ευθυγραμμίζονται, λειαίνοντας τις επιφάνειες των βαμβακερών ινών. Επομένως, οι επαναλαμβανόμενες πλύσεις με ένζυμο προκαλούν μια πιο οργανωμένη δομή της επιφάνεια των υφασμάτων συνεισφέροντας, έτσι, στον καθαρισμό τους. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, τα ακάθαρτα σωματίδια συνεχίζουν να εισχωρούν λερώνοντας τους χώρους μεταξύ των ινών, αλλά δεν μπορούν να συγκρατηθούν από την τραχύτητα των ινών. Στη συνέχεια, λόγω πλυσίματος, οι ρύποι αφαιρούνται εύκολα από τις λείες βαμβακερές επιφάνειες και απομακρύνονται μέσω των κενών χώρων μεταξύ των ινών με τη βοήθεια του νερού πλύσης [51].



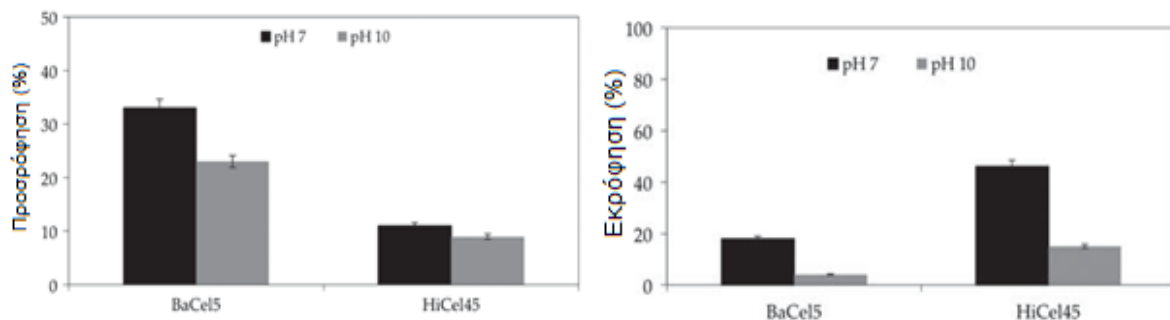
Εικόνα 2.7 Επίδραση του ενζύμου μετά από 4 κύκλους πλύσης με διάλυμα ενζύμου σε συγκέντρωση 0.12 και 0.2 ppm (Τροποποίηση από [51]).

2.1.7 Επίδραση των απορροφητικών ιδιοτήτων δύο απορρυπαντικών κυτταρινασών σε κυτταρίνη

Στην επόμενη έρευνα μελετήθηκε η επίδραση των ιδιοτήτων απορρόφησης δύο απορρυπαντικών κυτταρινασών σε κυτταρινικό υπόστρωμα. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά ενζυμικά παρασκευάσματα Carezyme[®] και Celluclean[®], καθώς και αποχρωματισμένα υφαντά βαμβακερά υφάσματα. Για την εκτίμηση των απορροφητικών ιδιοτήτων, τα βαμβακερά υφάσματα (1g) επεξεργάστηκαν με τα ένζυμα σε 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού-φωσφορικού pH 7 ή ανθρακικού νατρίου pH 10, 0.1 M, χρησιμοποιώντας ένζυμο δοσολογίας 150 mg πρωτεΐνης/L σε αναλογία 1:50 υφάσματος/υγρού, σε θερμοκρασία 40°C. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση, 125 grm, και διήρκεσε, αρχικά, 4 ώρες. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η πρωτεΐνη στο δείγμα για τον υπολογισμό του ποσοστού απορρόφησης και το υγρό με το ένζυμο αραιώθηκε (1:2) με ρυθμιστικό διάλυμα. Το μίγμα επωάστηκε τουλάχιστον για μια ώρα ακόμα και μετρήθηκε η πρωτεΐνη από το υπερκείμενο. Η μέτρηση των σακχάρων που απελευθερώθηκαν στο υγρό με το ένζυμο πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DNS. Συγκεκριμένα, 0.25 mL δείγματος αναμίχθηκαν με 0.75 mL DNS, το μίγμα υπέστη βρασμό για 5 λεπτά, ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 640 nm. Προκειμένου να διερευνηθεί η μηχανιστική

αντίληψη των επιδράσεων των κυτταρινασών, δεν ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθεί απορρυπαντικό ως μέσω αντίδρασης.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η κυτταρινάση BaCel5 προσδένεται μη αναστρέψιμα στην κυτταρίνη σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος, ενώ η HiCel45 δεν προσδένεται μόνιμα στην κυτταρίνη, καθώς εμφάνισε μικρή απορρόφηση. Η απορρόφηση της HiCel45 ήταν εξίσου χαμηλή και στις δύο τιμές pH, υποδεικνύοντας ότι η δράση της ενδογλουκανάσης επιτυγχάνεται, μάλλον, μέσω γρήγορης απορρόφησης/εκρόφησης και ότι η δέσμευση της κυτταρινάσης από την κυτταρίνη είναι ιδιαίτερα αναστρέψιμη. Χαμηλές τιμές πρωτεΐνης απορροφήθηκαν από το ύφασμα στο πρώτο στάδιο της υδρόλυσης, και υψηλές τιμές μετά το στάδιο της αραίωσης. Τα χαμηλά επίπεδα απορρόφησης δείχνουν ότι το ένζυμο δρα στις περιοχές της κυτταρίνης που είναι περισσότερο διαθέσιμες, χωρίς να μένει στερεωμένο στην κυτταρίνη μέσω της υπομονάδας πρόσδεσης σακχάρων. Για την κυτταρινάση BaCel5 προέκυψαν υψηλές τιμές απορρόφησης και στις δύο τιμές pH με χαμηλή αναστρεψιμότητα. Οι υπομονάδες πρόσδεσης σακχάρων αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες αλυσίδες πολυσακχαριτών, προσδένοντας, αυτά, τα υποστρώματα στην καταλυτική μονάδα του ενζύμου.

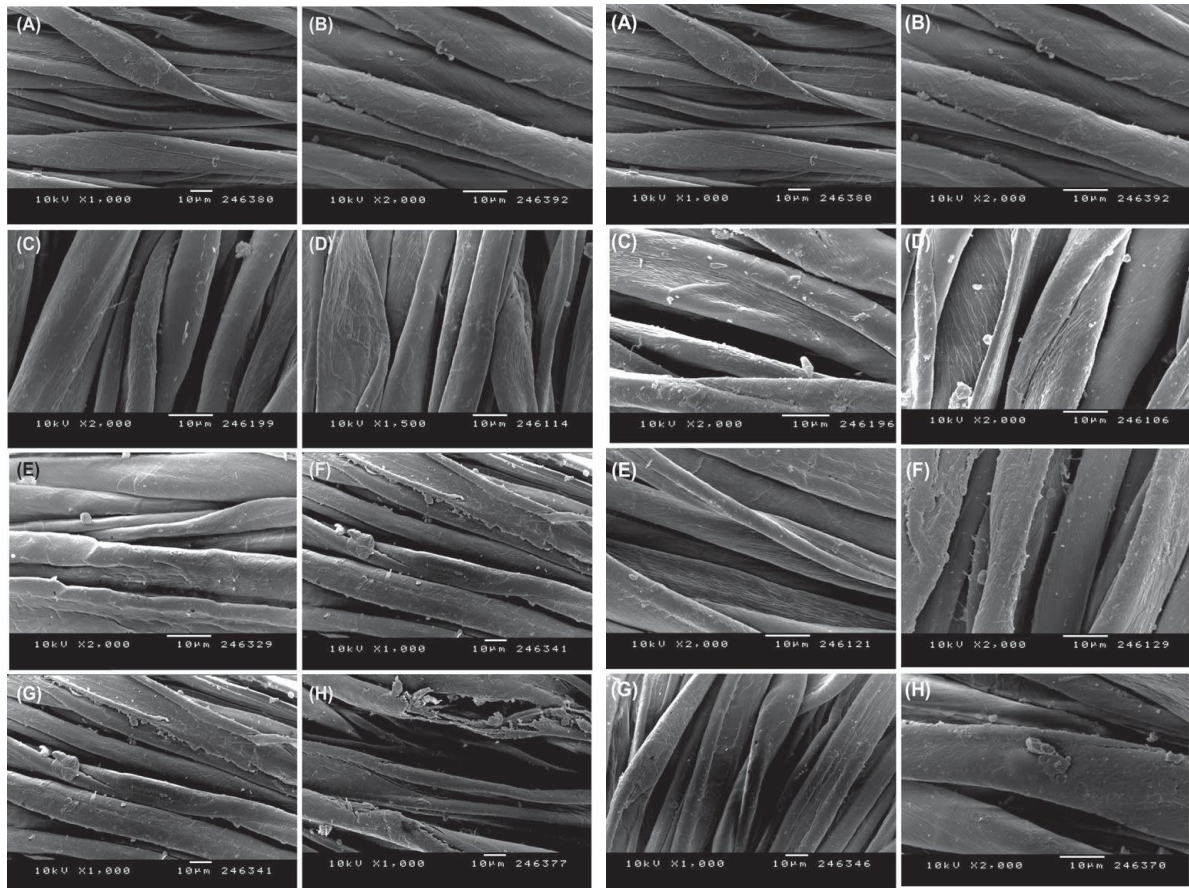


Εικόνα 2.8. Ποσοστό προσρόφησης (αριστερά) και εκρόφησης (δεξιά) της πρωτεΐνης για την HiCel45 και BaCel5 (150 mg πρωτεΐνης/L, 40°C; 125 rpm; 4 h, 1h).

Η μη αναστρέψιμη αλληλεπίδραση βαμβακιού-ενζύμου είναι δυνατό να προκαλέσει αρνητικές επιδράσεις του ενζύμου σε εφαρμογές απορρυπαντικών, καθώς υψηλές τιμές απορρόφησης πρέπει να προκύπτουν μόνο όταν η ενζυμική επεξεργασία πραγματοποιείται κατά την πλύση και αφαιρείται στη συνέχεια από την επιφάνεια των ινών με την ξέπλυση. Από τα παραπάνω, προκύπτει ότι σε μικρής διάρκειας επεξεργασίες μόνο η BaCel5 επιτυγχάνει την υδρόλυση της επιφάνειας του υφάσματος, ενώ σε μεγαλύτερη διάρκεια, η δράση του ενζύμου και η μηχανική ανάδευση οδηγούν στην απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης στο νερό πλύσης. Επομένως, η κυτταρινάση BaCel5 αρχικά προωθεί τη δημιουργία αναγωγικών άκρων και στη συνέχεια αφήνει εκτεθειμένα, αυτά, τα μικροϊνίδια, ώστε να είναι προσβάσιμα για διαλυτοποίηση [56].

Από τις απεικονίσεις με χρήση SEM προέκυψε ότι η μορφολογία της επιφάνειας των βαμβακερών ινών άλλαξε κατόπιν ενζυματικής επεξεργασίας. Με την BaCel δεν παρουσιάζεται καταστροφή στην επιφάνεια του υφάσματος, ενώ με την HiCel45 δημιουργήθηκαν τρύπες μετά από 3 ώρες. Η BaCel5 απελευθερώνει αναγωγικά σάκχαρα από την επιφάνεια της ίνας με μικρό ρυθμό, μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η HiCel5 δημιουργεί ανοίγματα στην επιφάνεια, απελευθερώνοντας, έτσι ολιγομερή υδρολυτικά προϊόντα στο νερό πλύσης, αφαιρώντας παράλληλα

ακαθαρσίες και βελτιώνοντας την φωτεινότητα και την απαλότητα, αλλά καταστρέφοντας το ύφασμα σε υψηλούς ρυθμούς. Η καταστροφή του υφάσματος μπορεί να αποφευχθεί ελέγχοντας την δράση της ενδογλουκανάσης, που σχετίζεται άμεσα με τις δυνάμεις ανάδευσης.



Εικόνα 2.9 Απεικονίσεις SEM των βαμβακερών υφασμάτων, με επεξεργασία με HiCel5 (αριστερά) και BaCel5 (δεξιά), στις ακόλουθες συνθήκες: (A,B) Χωρίς ενζυματική επεξεργασία, (C,D) επεξεργασία για 20 λεπτά, (E,F) επεξεργασία για 3 ώρες, (G) επεξεργασία για 48 ώρες, (H) επεξεργασία για 5 ώρες (300 mg πρωτεΐνης/L, 40°C; 125 και 40 grm, αντίστοιχα). Σημειώνεται ότι τα A,C,E,G αναφέρονται σε κυκλική ανάδευση, ενώ τα B,D,E,H σε κατακόρυφη.

2.1.8 Θερμοσταθερή και ανθεκτική στους οργανικούς διαλύτες αλκαλική κυτταρινάση από τον *Bacillus vallismortis* RG-07

Η έρευνα που ακολουθεί αποτελεί την πρώτη περίπτωση στην οποία ένα βακτήριο, που παράγει κυτταρινάση ανθεκτική και σταθερή στη θερμότητα και τους διαλύτες, απομονώνεται από δείγμα εδάφους. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με 500μL από 1% υπόστρωμα CMC σε 1.0M ρυθμιστικό φωσφορικού, pH 7.0, 100μL ενζύμου και 400 μL απιονισμένου νερού, σε θερμοκρασία 65°C για χρόνο επώασης 1 ώρα και στη συνέχεια υπέστησαν φωτομέτρηση στα 620 nm.

Η *Bacillus vallismortis* RG-07 κυτταρινάση ενεργοποιήθηκε από το Ca^{2+} , Mg^{2+} και Na^+ (10mM) καθώς παρουσίασε μέγιστη σχετική ενεργότητα 184.4, 175.1, 141.4% και σταθερότητα 160.3, 130.3, 125.3%, αντίστοιχα, αλλά αναστάλθηκε από όλα τα άλλα μεταλλικά ιόντα. Η αναστολή της δράσης της

κυτταρινάσης από το ιόν Hg^+ , πιθανόν να σχετίζεται με τη σύνδεση του με ομάδες θειόλης, υπόλειμμα τριπτοφάνης ή καρβοξυλικές ομάδες κατάλοιπων αμινοξέων στο ένζυμο, ενώ η αναστολή από τα Co^{2+} και Cu^{2+} ιόντα, μπορεί να οφείλεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των εξωγενών κατιόντων και των κατιόντων που σχετίζονται με την πρωτεΐνη.

Η κυτταρινάση εμφάνισε εξαιρετική σταθερότητα παρουσία όλων των οργανικών διαλυτών που εξετάστηκαν (30% v/v), για χρόνο επώασης 48 ώρες. Με εξαίρεση του βενζενίου, της προπανόλης και της αιθανόλης, η παρουσία των υπόλοιπων διαλυτών ενίσχυσε την δράση της κυτταρινάσης. Επίσης, μετά από επώαση του ενζύμου με EDTA και β-μερκαπτοαιθανόλη (10mM) το ένζυμο διατήρησε το 110% και 167% της ενεργότητας του, ενώ τα IAA (ιωδοξικό οξύ) και PCMB (p-χλωρομερουσιβενζοϊκό) ανέστειλαν την δράση, καθώς συνδέονται με τις SH ομάδες με διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης. Ωστόσο, η β-μερκαπτοαιθανόλη και η DTT (διθειοθρεϊτόλη) μπορούν να μειώσουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, εάν η οξειδωση των πρωτεϊνικών ενζύμων πραγματοποιηθεί κατά τον καθαρισμό και την αποθήκευση. Η σταθερότητα της κυτταρινάσης εξετάστηκε παρουσία μη ιονικών επιφανειοδραστικών (1% v/v), όπως τα tween-40, tween-60, tween-80 και tritone-100 και το απορρυπαντικό SDS (1% v/v), τα οποία ανέστειλαν ελαφρώς την δράση, καθώς η σχετική ενεργότητα μετρήθηκε 89.6, 93, 87, 92.5 και 95.7%, αντίστοιχα. Παρόλ'αυτά, σε σύγκριση με άλλες έρευνες η κυτταρινάση θεωρείται σταθερή παρουσία SDS, αφού διατηρεί το 95% της ενεργότητας της. Παρουσία εμπορικών απορρυπαντικών μικρής συγκέντρωσης (0.1% w/v), το ένζυμο ήταν σταθερό, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (1.0% w/v) οδήγησαν σε μείωση της ενεργότητας του. Το ένζυμο εμφάνισε μέγιστη σταθερότητα παρουσία του ariel μετά από επώαση στους 65°C για 1 ώρα, με σχετική ενεργότητα 89%, ενώ παρουσία surf excel, tide, fena και henko παρουσίασε 80%, 75.5, 68.4 και 55.9% σχετικές ενεργότητες. Μεταξύ των οξειδωτικών παραγόντων που διερευνήθηκαν, η ενεργότητα της κυτταρινάσης ενισχύθηκε από την παρουσία 0.1% w/v υποχλωριώδους νατρίου και H_2O_2 , με 127.2 και 118.7% σχετικές ενεργότητες αντίστοιχα, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (0.5 και 1.0% w/v) η σταθερότητα μειώθηκε, με εξαίρεση το υποχλωριώδες νάτριο για συγκέντρωση 0.5% w/v (115.4%) [119].

2.1.9 Κυτταρινάση από το θερμόφιλο μύκητα *Bacillus sp.* SMIA-2

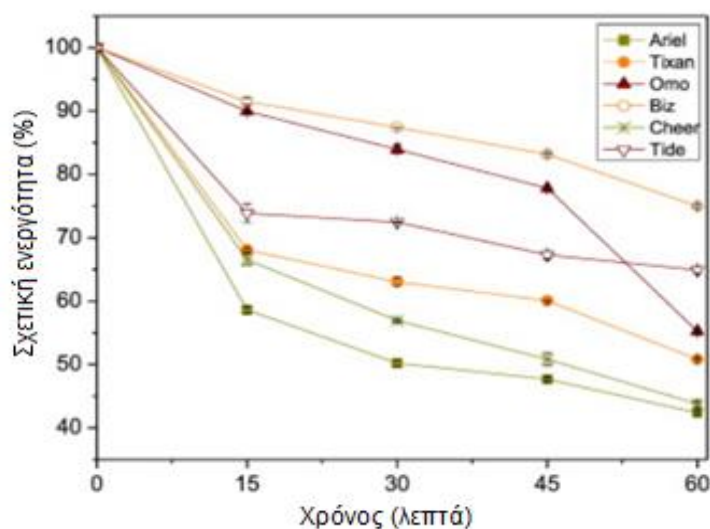
Η επόμενη έρευνα αφορά την παραγωγή κυτταρινάσης από τον θερμόφιλο μύκητα *Bacillus sp.* SMIA-2, καθώς και την αξιολόγηση των ιδιοτήτων της με σκοπό την πιθανή εφαρμογή στη βιομηχανία των απορρυπαντικών. Για το λόγο, αυτό, εξετάστηκε η επίδραση ορισμένων επιφανειοδραστικών και οξειδωτικών παραγόντων, καθώς και η σταθερότητα του ενζύμου παρουσία εμπορικών απορρυπαντικών. Κατάλληλη συγκέντρωση ενζύμου επώαστηκε με 0.25% w/v και 0.5% w/v θειικό δωδεκύλιο νάτριο, γραμμικό σουλφονικό αλκυλοβενζόλιο, RENEX-60, RENEX-95, triton X-100 και υπεροξειδίο του υδρογόνου στους 40°C για 15 και 30 λεπτά.

Για την εκτίμηση της σταθερότητας του ενζύμου σε απορρυπαντικά, κατάλληλη συγκέντρωση ενζύμου επώαστηκε, για μία ώρα στους 40°C, με διάλυμα αραιωμένου απορρυπαντικού με απιονισμένο νερό τελικής συγκέντρωσης $7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, που προηγουμένως είχε θερμανθεί στους 100°C για 15 λεπτά για την απενεργοποίηση των ενζύμων που ενδεχομένως υπήρχαν στη σύσταση των απορρυπαντικών. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου, μέσω της μέτρησης των αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο του DNS, στα 540nm. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 0.5 mL από 1% υπόστρωμα διαλύματος Avicel σε 10mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου (pH 7.5) και 0.5mL κατάλληλης συγκέντρωσης ενζυμικού διαλύματος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκεκριμένη κυτταρινάση διατήρησε περισσότερο από το 70% της ενεργότητας της, μετά από 30 λεπτά επώαση στους 40°C, παρουσία των απορρυπαντικών Ultra Biz, Omo, and Tide. Επιπλέον, διατήρησε περισσότερο από 75% της ενεργότητας της, μετά από 30 λεπτά επώαση στους 40°C, παρουσία θειικού δωδεκυλίου νατρίου, RENEX-60, RENEX-95 και περισσότερο από 60% παρουσία γραμμικού σουλφονικού αλκυλοβενζολίου. Όμως, η ενεργότητα της κυτταρινάσης αναστάλθηκε δραστικά παρουσία των TritonX-100 και H₂O₂ [80].

Υπολειπόμενη ενεργότητα (%)		
	Χρόνος επώασης (Λεπτά)	
	15	30
Ανασταλείς/επιφανειοδραστικά		
Control	100.0 ± 0.11	100.0 ± 0.09
Sodium dodecyl sulfate 0.25%	97.1 ± 0.11	95.1 ± 0.30
Sodium dodecyl sulfate 0.5%	91.8 ± 0.21	87.7 ± 0.07
Renex-95 0.25%	98.5 ± 0.13	93.5 ± 0.09
Renex-95 0.5%	88.1 ± 0.27	83.9 ± 0.04
Renex-60 0.25%	86.1 ± 0.00	75.5 ± 0.02
Renex-60 0.5%	80.3 ± 0.24	77.1 ± 0.03
Linear alkylbenzene sulfonate 0.25%	72.0 ± 0.03	64.8 ± 0.21
Linear alkylbenzene sulfonate 0.5%	66.7 ± 0.10	61.1 ± 0.13
Triton x-100 0.25%	31.7 ± 0.09	27.1 ± 0.10
Triton x-100 0.5%	22.0 ± 0.11	21.4 ± 0.13
H ₂ O ₂ 0.25%	6.4 ± 0.08	4.0 ± 0.02
H ₂ O ₂ 0.5%	4.3 ± 0.04	2.6 ± 0.01

Εικόνα 2.10 Επίδραση διαφόρων αναστολών και επιφανειοδραστικών στην ενεργότητα της κυτταρινάσης από τον *Bacillus sp.* SMIA-2 (Τροποποίηση από [80]).



Εικόνα 2.11 Συμβατότητα της κυτταρινάσης με τα εμπορικά απορρυπαντικά Ariel, Tixan, Omo, Biz, Cheer και Tide (Τροποποίηση από [80]).

2.2 Έρευνα κυτταρινασών για την επεξεργασία υφασμάτων

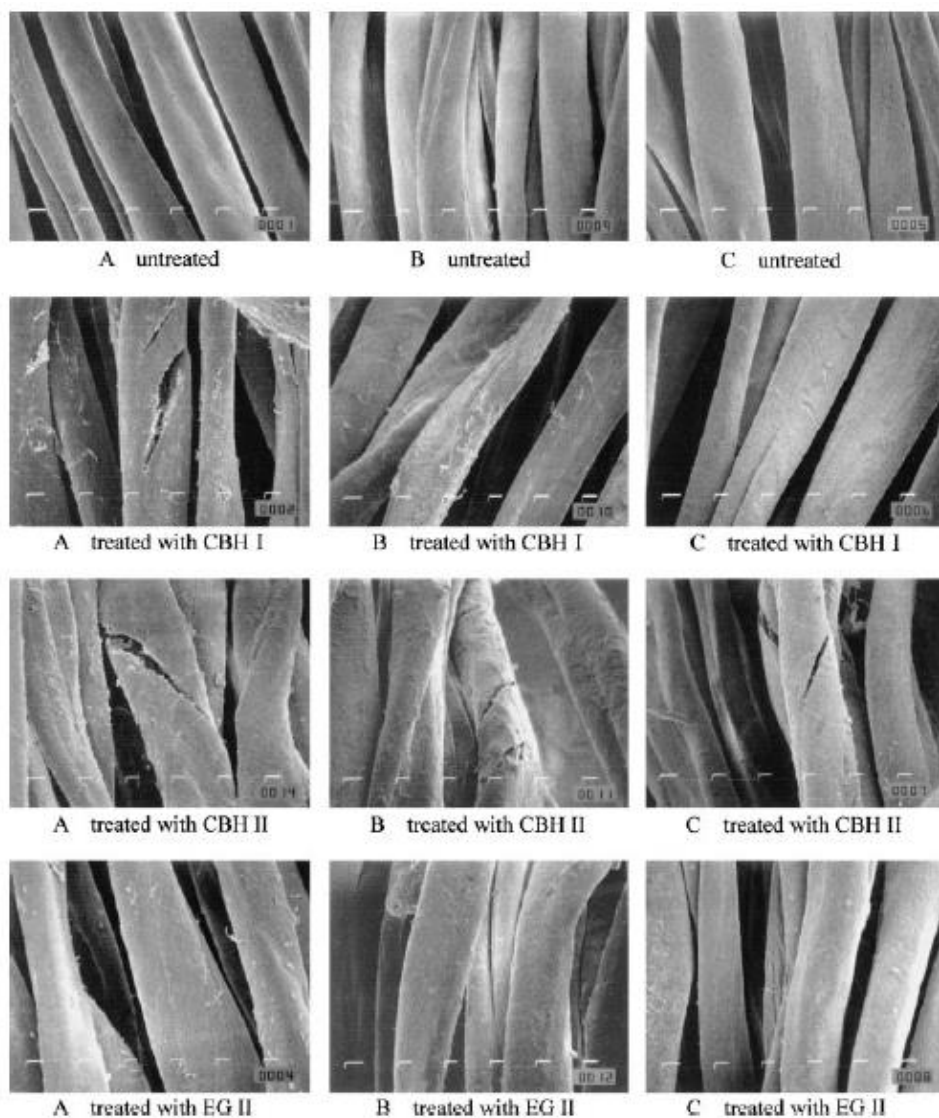
2.2.1 Δράση κυτταρινασών σε βαμμένο βαμβάκι

Έρευνες έχουν δείξει ότι η βαφή των βαμβακερών υφασμάτων με μετέπειτα επεξεργασία τους με εμπορικές κυτταρινάσες, όπως η ενδογλουκανάση Cellusoft L (Novozymes) περιορίζει τη δράση της κυτταρινάσης ως προς την απώλεια βάρους και την ενζυμική υδρόλυση. Επίσης, η βαφή των βαμβακερών υφασμάτων επηρεάζει τη δράση εξαγνισμένων μονοσυστατικών κυτταρινασών αναφορικά με τη σακχαροποίηση, καθώς και τη μορφολογία της επιφάνειας του υφάσματος.

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν βαμβακερά υφαντά υφάσματα, που είχαν προηγουμένως επεξεργαστεί με όλες τις συμβατικές μεθόδους (αποκολλάρισμα, πρόπλυση, λεύκανση, μερσερισμός), η βαφή C. I. Reactive Blue 19, η εμπορική ενδογλουκανάση Cellusoft L, καθώς και εξαγνισμένες κυτταρινάσες από τον *T.reesei*. Η αλλαγές στη μορφολογία του υφάσματος μετά την επεξεργασία του με διάφορες μεθόδους παρατηρήθηκαν μέσω μικρογραφιών ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε, ότι για τη μη βαμμένη βαμβακερή ίνα, η επεξεργασία με εξωκυτταρινάσες (CBH I, CBH II) προκάλεσε το σχηματισμό βαθιών ρωγμών και πολλών ινιδίων στην επιφάνεια της ίνας. Από την άλλη, η ενδοκυτταρινάση (EGII) προκάλεσε μόνο λίγα ινίδια και καθόλου ρωγμές. Για τα ανοιχτής απόχρωσης τζιν ($DS=0.5 \times 10^{-3}$), η CBH II προκάλεσε παρόμοιες, αλλά λιγότερες ρωγμές και παρόμοια ινίδια στην επιφάνεια του βαμβακερού υφάσματος, ενώ η CBH I προκάλεσε πολλά ινίδια και καθόλου ρωγμές, όπως και η ενδογλουκανάση. Για τα τζιν σκούρας απόχρωσης ($DS=2.8 \times 10^{-3}$), η δράση της CBH II αναστάλθηκε, αλλά όχι τελείως, ενώ η δράση CBH I αναστάλθηκε εξαιρετικά από τη βαφή, καθώς δεν προκάλεσε καθόλου ινίδια και ρωγμές. Η EG II αναστάλθηκε λιγότερο σε σχέση με τις εξωκυτταρινάσες από τη βαφή, καθώς προκάλεσε λίγα ινίδια, αλλά καθόλου ρωγμές.

Είναι γνωστό ότι τα ακατέργαστα μίγματα κυτταρινασών είναι πολυσυστατικά και υδρολύουν την κυτταρίνη με συνεργιστική δράση. Από την άλλη, οι ενδοκυτταρινάσες έχουν την ικανότητα να διαχωρίζονται από το υπόστρωμα, επομένως δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από στερεο-εμπόδια, όπως οι βαφές που συνδέονται ομοιοπολικά στην κυτταρίνη. Αντίθετα, η δράση των εξωγλουκανασών, και κυρίως της CBH II καταστέλλεται σημαντικά λόγω της βαφής, καθώς οι εξωγλουκανάσες δρουν προοδευτικά και δεν αποκόβονται από την κυτταρίνη, οπότε μπορεί να σταματήσουν την καταλυτική τους δράση και να κολλήσουν, σε περίπτωση που συναντήσουν ένα τροποποιημένο μόριο γλυκόζης [54].



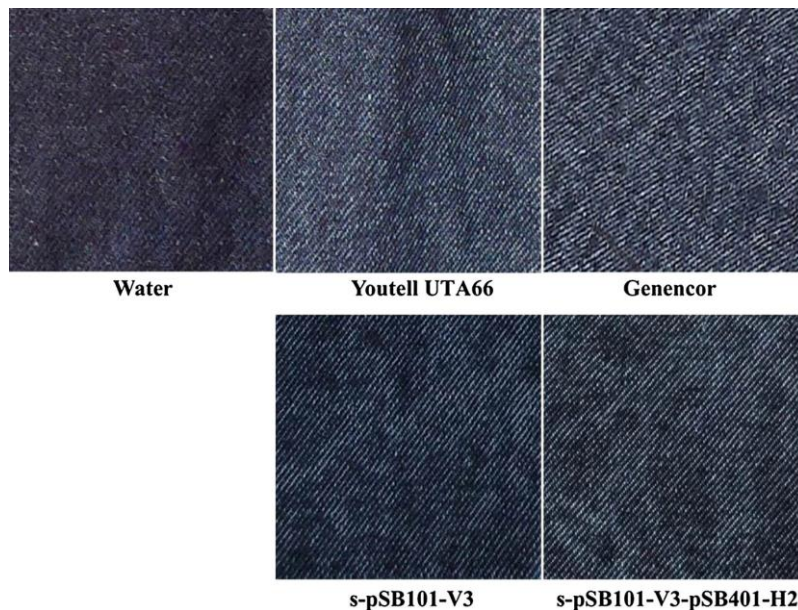
Εικόνα 2.12 Μικρογραφίες SEM της επιφάνειας ινών βαμβακιού που έχει επεξεργαστεί με κυτταρινάση για 72h. Α. Μη βαμμένο βαμβάκι, Β. Βαμμένο βαμβάκι με $DS=0.5 \times 10^{-3}$, C. Βαμμένο βαμβάκι με $DS=2.8 \times 10^{-3}$.

2.2.2 Αφαίρεση ινιδίων από την επιφάνεια τζιν υφασμάτων με κυτταρινάσες

Οι κυτταρινάσες που προέρχονται από το μύκητα *T. reesei* παρουσιάζουν τη μέγιστη ενζυμική τους δράση σε όξινες συνθήκες, ενώ σε ουδέτερες και αλκαλικές σχεδόν εξαφανίζεται περιορίζοντας έτσι τις βιομηχανικές εφαρμογές τους. Επομένως, έχουν γίνει πολλές και πετυχημένες έρευνες για την έκφραση ετερόλογων αλκαλικών κυτταρινασών στον μύκητα για τη βελτίωση του κυτταρολυτικού του προφίλ. Το 2014, οι Wang et. al, σχεδίασαν και κατασκεύασαν μια συλλογή προωθητών για την έκφραση γονιδίων και τη συν-έκφραση τους στον *T.reesei*. Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε η συν-έκφραση μιας αλκαλικής ενδογλουκανάσης, καθώς και μια αλκαλικής κελλοβιο-ϋδρολάσης και παρατηρήθηκε υψηλότερη ενζυμική δράση τόσο στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης, όσο και στην αφαίρεση μικροϊνιδίων από την επιφάνεια τζιν υφάσματος σε σύγκριση με τη δράση από την έκφραση μόνο της ενδο ή έξω γλουκανάσης.

Σε εξειδικευμένη συσκευή προστέθηκαν 0.5 kg από τζιν ύφασμα σε 50 L νερού και 0.33 IU/mL (CMC δόση) δόση ενζύμου. Η θερμοκρασία ορίστηκε στους 40°C για 90 min υπό ανάδευση. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εμπορικές ουδέτερες κυτταρινάσες από Youtell (Κίνα), Genencor (Αμερική) και μίγμα από την επώαση στελεχών του *T. reesei*.

Σκοπός της διεργασίας αφαίρεσης των ινιδίων από την επιφάνεια των τζιν ενδυμάτων (“biostoning”) είναι η απόκτηση μιας ευδιάκριτης, αλλά περισσότερο ομοιόμορφης παλαιωμένης όψης. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται ότι η επεξεργασία των τζιν υφασμάτων με κυτταρινάσες οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την πλύση με νερό που δημιουργεί γραμμές/λεκέδες. Επίσης, η επεξεργασία με κυτταρινάσες που προέκυψαν από τη συνέκφραση της αλκαλικής ενδογλουκανάσης και εξωγλουκανάσης (s-pSB101-V3-pSB401-H2) είχε ως αποτέλεσμα καλύτερη εμφάνιση του υφάσματος, συγκριτικά με την επεξεργασία με εμπορικές κυτταρινάσες, σε pH 8, καθώς και από την επεξεργασία με s-pSB101-V3 (ενδογλουκανάση) μόνο. Προκύπτει, επομένως, ότι η συνέκφραση της αλκαλικής ενδογλουκανάσης και κελλοβιοϋδρολάσης στα στελέχη του *T. reesei* παράγει ένα πιο αποτελεσματικό σύστημα ενζύμων για την αφαίρεση των ινιδίων από την επιφάνεια του υφάσματος, καθώς τα δύο ένζυμα δρουν συνεργιστικά για να τροποποιήσουν την εμφάνιση του υφάσματος [57].



Εικόνα 2.13 Σύγκριση της εμφάνισης του τζιν μεταξύ των εμπορικών ουδέτερων κυτταρινασών και του μίγματος κυτταρινασών που διερευνάται.

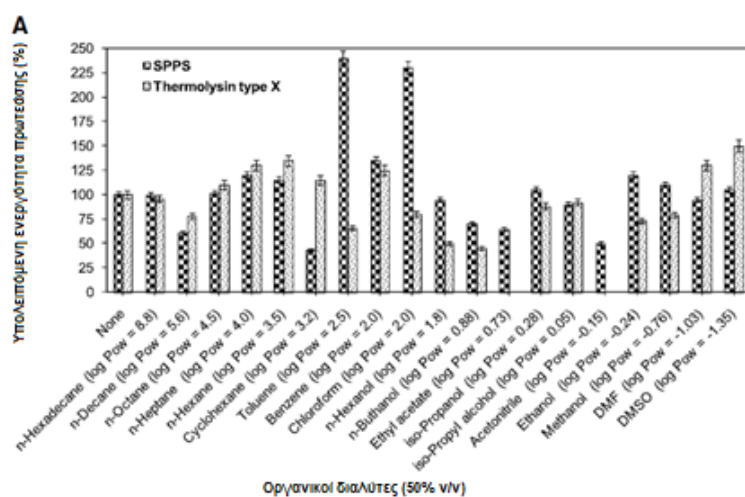
2.3 Έρευνα για συμβατά με απορρυπαντικά υπόλοιπα ένζυμα

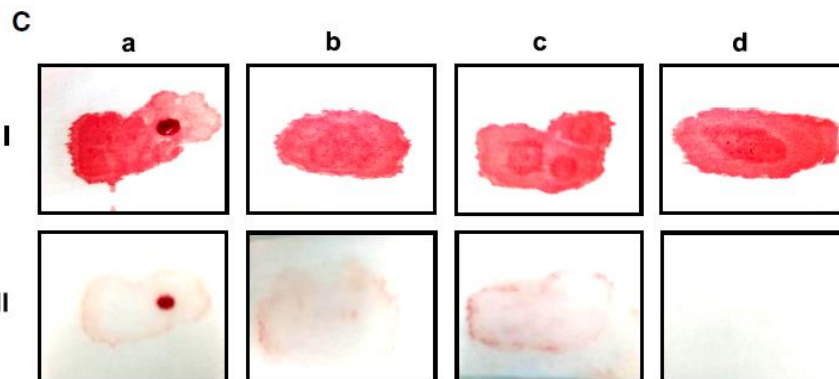
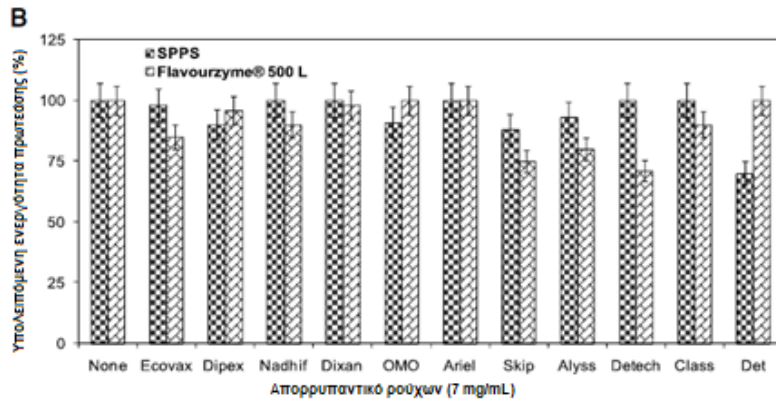
2.3.1 Θερμοσταθερή πρωτεάση από το στέλεχος *Pleurotus sajor-caju* του CTM10057

Η πρωτεάση (SPPS) που εξετάστηκε στη συνέχεια προέκυψε από τον βασιδιομυκήτα CTM10057, ο οποίος υπερπαραγάγει την πρωτεάση και αναγνωρίστηκε ως *Pleurotus sajor-caju* (μανιτάρι στρειδιών). Η ενεργότητα της πρωτεάσης μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο στα 660 nm, με χρήση καζεΐνης ως υπόστρωμα, στους 70°C και ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-NaOH (100mM) μαζί με CaCl₂ σε pH 9.5

(2mM). Η ενεργότητα της στο απορρυπαντικό διάλυμα μετρήθηκε σε 450 nm χρησιμοποιώντας N, N-διμεθυλιωμένη καζείνη ως υπόστρωμα στους 40°C και pH 9. Για τη μελέτη του βιομηχανικού ενδιαφέροντος της καζείνης εξετάστηκε η επίδραση αναστολών και μεταλλικών ιόντων στη σταθερότητα του ενζύμου μετά από μία ώρα στους 40°C, καθώς και των οργανικών διαλυτών σε 50% v/v, κατόπιν επώασης 72h στους 37°C, η συμβατότητα της SPPS με εμπορικά απορρυπαντικά, επώαζοντας το ένζυμο (500 U/mL) με τα απορρυπαντικά παρασκευάσματα (7 mg/mL), για μία ώρα στους 40°C, αφού προηγουμένως απενεργοποιήθηκαν τα ενδογενή ένζυμα των απορρυπαντικών με επώαση μίας ώρα στους 65°C. Εκτιμήθηκε, επίσης, η απόδοση καθαρισμού της πρωτεάσης λευκού βαμβακερού ρούχου λεκιασμένο με αίμα, σε σύγκριση με τη Flavourzyme® 500L σε 500 U/mL, ως προσθετική ουσία στο απορρυπαντικό Dixan (7 mg/mL).

Η σταθερότητα της πρωτεάσης επηρεάστηκε ελαφρώς από το EDTA και το EGTA, καθώς ανέστειλαν την ενεργότητα της μόνο κατά 91% (1mM) και 80% (2mM), αντίστοιχα, που είναι σημαντικό, καθώς οι χηλικοί παράγοντες δρουν ως αποσκληρυντικά νερού, διευκολύνοντας την αφαίρεση λεκέδων. Τα μεταλλικά ιόντα (2mM) Ca^{2+} , Mg^{2+} και Fe^{2+} ενεργοποίησαν την πρωτεάση, ενώ τα Cd^{2+} , Ni^{2+} και Hg^{2+} την ανέστειλαν. Από την εικόνα ... προκύπτει ότι η SPPS σε σύγκριση με την Θερμολυσίνη X είναι σταθερή τόσο σε υδρόφοβους όσο και σε υδρόφιλους οργανικούς διαλύτες, και ιδιαίτερα παρουσία ακετονιτριλίου. Η πρωτεάση SPPS σε σχέση με την εμπορική Flavourzyme® 500L, παρουσίασε εξαιρετική σταθερότητα και συμβατότητα με τα εμπορικά απορρυπαντικά, καθώς διατήρησε το 100% της αρχικής της ενεργότητας με το Dixan, Nadhif, Detch, και Class. Σχετικά με την καθαριστική ικανότητα της πρωτεάσης προστιθέμενη σε απορρυπαντικό Dixan, προέκυψε ότι είναι πολύ αποτελεσματική, αφού αφαίρεση παντελώς τον λεκέ από αίμα σε σύγκριση με χρήση του ενζύμου Flavourzyme® 500L. Συνεπώς, η SPPS παρουσιάζει πολλές προοπτικές για την προσθήκη της στη σύσταση απορρυπαντικών [120].





Εικόνα 2.14 **A** Επίδραση διαφορετικών διαλυτών στις σταθερότητες των ενζύμων SPPS και Θερμολυσίνης τύπου X. **B** Σταθερότητα των πρωτεασών SPPS και Flavourzyme® 500L παρουσία εμπορικών απορρυπαντικών. **C** Έλεγχος καθαριστικής ικανότητας της SPPS παρουσία εμπορικού απορρυπαντικού Dixan. Ύφασμα με λεκέ από αίμα πλύθηκε με: (a) νερό βρύσης, (b) απορρυπαντικό Dixan, (c) Dixan με Flavourzyme® 500L και (d) Dixan με SPPS, I:μη επεξεργασμένα υφάσματα και II:επεξεργασμένα υφάσματα.

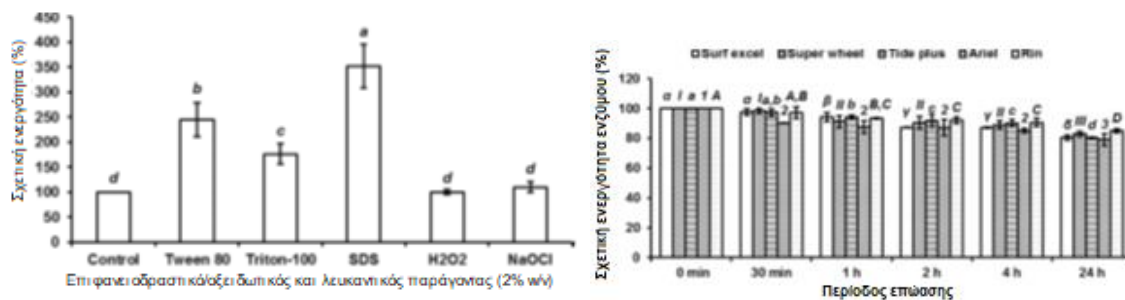
2.3.2 Συμβατή με απορρυπαντικά αλκαλική πρωτεάση από το είδος *Scorulariopsis*

Πρόσφατες έρευνες σχετικά με τον καθαρισμό και το χαρακτηρισμό της αλκαλικής πρωτεάσης που παράγεται από το είδος *Scorulariopsis*, απέδειξαν τη χρήση της ως πρόσθετο συστατικό στη σύνθεση των απορρυπαντικών. Η πρωτεάση, αυτή, παρουσιάζει σταθερότητα, μέγιστη ενζυμική δράση σε αλκαλικές συνθήκες (pH 9-11), καθώς και βέλτιστη θερμοκρασία στους 50°C. Διερευνήθηκε η επίδραση μεταλλικών ιόντων, χηλικοποιητών και αναστολέων στην ενεργότητα της πρωτεάσης. Επίσης, προσδιορίστηκε, η επίδραση επιφανειοδραστικών, οξειδωτικών/λευκαντικών παραγόντων και η παρουσία εμπορικών απορρυπαντικών στη σταθερότητα της, καθώς και η σταθερότητα αποθήκευσης της πρωτεάσης για 40 μέρες σε θερμοκρασία δωματίου και 4 και -20°C. Τέλος, διερευνήθηκε η ικανότητα της αλκαλικής πρωτεάσης να αφαιρεί λεκέδες.

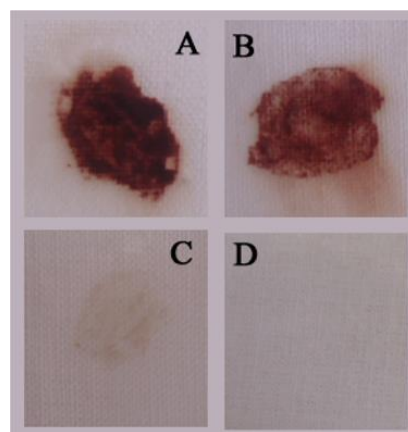
Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η δράση της πρωτεάσης ενεργοποιήθηκε από τα μεταλλικά ιόντα Mn^{2+} και Co^{2+} , δεν επηρεάστηκε από τα Ba^{2+} , Na^+ , K^+ και Fe^{2+} , μειώθηκε μέτρια από τα Ca^{2+} και Fe^{3+} και μειώθηκε κατά 40% από τα Hg^{2+} και Zn^{2+} . Οι αναστολείς, διάφορα προσθετικά των απορρυπαντικών (EDTA), καθώς και οι οξειδωτικοί παράγοντες δεν ενεργοποίησαν το ένζυμο, ούτε επηρέασαν την ενεργότητα του. Τα επιφανειοδραστικά (SDS, Tween-80 και Triton X-100) ενεργοποίησαν τη δράση του ενζύμου, το οποίο διατήρησε τη σταθερότητα του παρουσία τους,

επομένως κρίθηκε κατάλληλο για προσθήκη στη σύσταση απορρυπαντικών. Μετά από χρόνο επώασης 20 ημερών, η πρωτεάση παρέμεινε σχεδόν 100% σταθερή, ενώ μετά από 40 μέρες παρατηρήθηκε μείωση 9,10 και 14% για τις θερμοκρασίες 4, 28 και -20°C, αντίστοιχα. Η μείωση της ενεργότητας του ενζύμου πιθανόν να οφείλεται στην μερική μετουσίωση που μπορεί να προκλήθηκε από τους αναστολείς πρωτεάσης.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η σταθερότητα της πρωτεάσης σε διάφορα εμπορικά απορρυπαντικά παρουσία των υπολοίπων συστατικών τους. Στους 60°C, μετά από 4 ώρες η ενεργότητα του ενζύμου διατηρήθηκε στο 90% σε όλα τα απορρυπαντικά, ενώ μετά από 24 ώρες επώαση η ενεργότητα μειώθηκε στο 80-85%. Σε θερμοκρασία 90°C και για επώαση μιας μέρας, η ενζυμική δράση μειώθηκε στο 50% για ορισμένα απορρυπαντικά. Επιπλέον, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα το διάλυμα απορρυπαντικού με αραιωμένο το εξεταζόμενο ένζυμο αφαίρεσε τελείως τους λεκέδες από αίμα από το λευκό ύφασμα. Επομένως, για όλους τους παραπάνω λόγους η αλκαλική πρωτεάση από το είδος *Scopulariopsis* εμφανίζει εξαιρετική συμβατότητα με τα απορρυπαντικά και αποτελεί μια υποψήφια επιλογή ως προσθετική ουσία σε αυτά [40].



Εικόνα 2.15 Επίδραση επιφανειοδραστικών (SDS, Tween-80, Triton X-100) και οξειδωτικών/ λευκαντικών παραγόντων (H₂O₂, NaClO) κατόπιν επώασης 50°C για 30 λεπτά. Το δείγμα ελέγχου ήταν χωρίς επιφανειοδραστικούς/οξειδωτικούς/λευκαντικούς παράγοντες (αριστερά). Σταθερότητα αλκαλικής πρωτεάσης σε διάφορα απορρυπαντικά. Το ένζυμο στο απορρυπαντικό επώαστηκε σε διάφορα χρονικά διαστήματα στους 60°C (δεξιά) (Τροποποίηση από [40]).

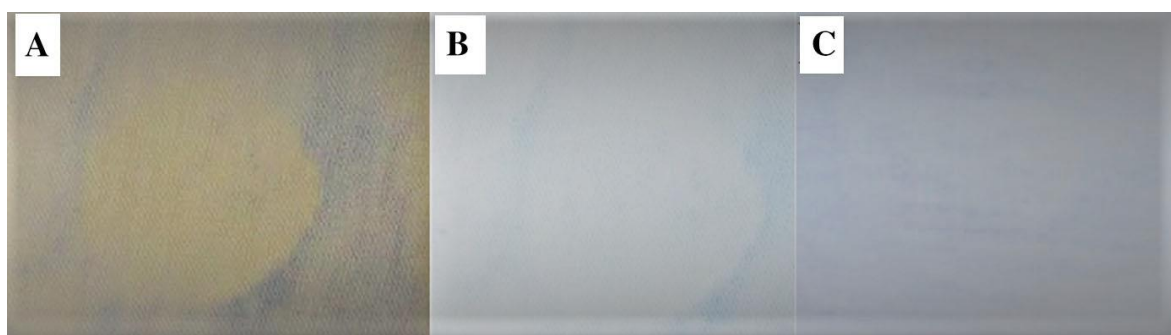


Εικόνα 2.16 Καθαριστική ικανότητα της αλκαλικής πρωτεάσης του είδους *Scopulariopsis*. Μη επεξεργασμένο ύφασμα ως δείγμα ελέγχου (A), ύφασμα πλυμένο με νερό βρύσης (B), ύφασμα πλυμένο με νερό βρύσης και απορρυπαντικό μίγμα (C), ύφασμα πλυμένο με νερό βρύσης, Super Wheel και ένζυμο (D).

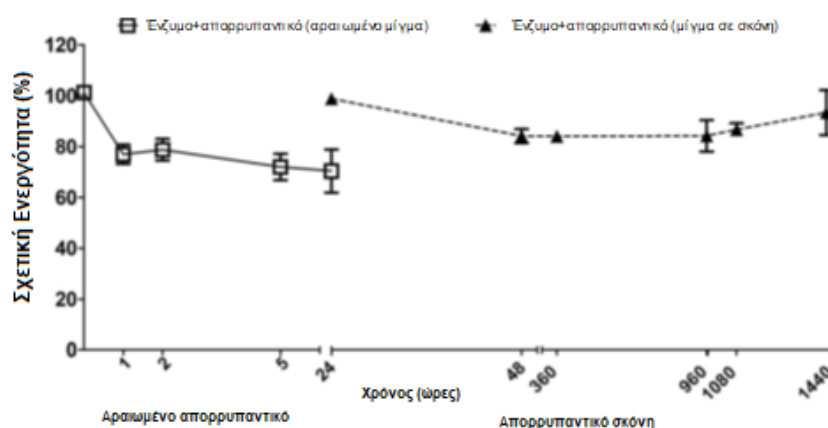
2.3.3 Κερατινάσες από τον *Corioloopsis byrsina*

Στην παρακάτω έρευνα διευρενήθηκαν τα ένζυμα που αποικοδομούν την κερατίνη που εκκρίνονται από το μύκητα *Corioloopsis byrsina*, καθώς και η χρήση τους ως προσθετική ουσία στη σύσταση των απορρυπαντικών. Για το σκοπό αυτό, εκτιμήθηκε η επίδραση των αναστολών στην ενεργότητα της πεπτιδάσης, με επώαση του ενζύμου για 5 λεπτά, η συμβατότητα με εμπορικά απορρυπαντικά και η απόδοση καθαρισμού, και πραγματοποιήθηκαν και έλεγχοι σταθερότητας.

Κατά την επώαση με τους αναστολείς, η καζεΐνολυτική δράση του ενζύμου αναστάλθηκε μόνο από το PMSF (90% αναστολή), ενώ η κερατινολυτική δράση του αναστάλθηκε από το PMSF και EDTA, 85 και 55% αναστολή για pH 7.5. Από την αξιολόγηση της καθαριστικής απόδοσης της κερατινάσης σε σύγκριση με ένα εμπορικό απορρυπαντικό, μέσω της ικανότητας αφαίρεσης πρωτεϊνικού λεκέ (λεκές από αυγό) προέκυψε παρόμοια απόδοση του απορρυπαντικού με την αρχική του σύσταση και του απορρυπαντικού με την κερατινάση. Εξετάζοντας την σταθερότητα του ενζύμου όταν αυτό αναμιγνύεται με απορρυπαντικό αραιωμένο σε νερό ή αποθηκεύεται σε μορφή σκόνης για μεγάλο χρονικό διάστημα προέκυψε ότι η υπολειπόμενη ενεργότητα διατηρήθηκε πάνω από 70%, τόσο για το υγρό μίγμα που διατηρήθηκε 24 ώρες στους 25°C, όσο και για το μίγμα σκόνης που διατηρήθηκε 60 μέρες στους 25°C [121].



Εικόνα 2.17 . Καθαριστική απόδοση για την αφαίρεση λεκέδων από αυγό. (A) Απορρυπαντικό που διαθέτει ανενεργά ένζυμα, (B) απορρυπαντικό που διαθέτει ενεργά ένζυμα και (C) ένζυμο από τον *C. Byrsina* + απορρυπαντικό με ανενεργά ένζυμα.

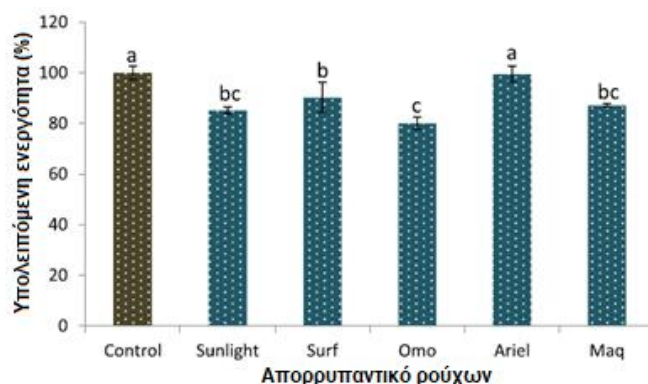


Εικόνα 2.18 Εκτίμηση σταθερότητας της κερατινάσης στους 25°C σε συνδυασμό με εμπορικό απορρυπαντικό (Soft/Brazil). Ένζυμο + απορρυπαντικό μίγμα διαλυμένο σε νερό επώαστηκε 1, 2, 5, 24 ώρες. Ένζυμο + απορρυπαντικό μίγμα σε σκόνη επώαστηκε για 24, 48, 360, 1080 και 1440 ώρες. Στις αντιδράσεις

χρησιμοποιήθηκε 1% καζεΐνη ως υπόστρωμα, ρυθμιστικό διάλυμα CAPS 0.1 M, pH 10.0 (Τροποποίηση από [121]).

2.3.4 Θερμοσταθερή αλκαλική κερατινάση από τον *Bacillus sp.* CSK2

Στην έρευνα που ακολουθεί διερευνώνται τα χαρακτηριστικά και οι πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία των απορρυπαντικών της αλκαλικής κερατινάσης που παράγεται από τον *Bacillus sp.* CSK2 από τα φτερά των κοτών. Η κερατινάση εμφάνισε αναστολή παρουσία μιγμάτων χηλικών παραγόντων (5mM), EDTA και 1,10-φαινανθρολίνη, ενώ διατήρησε το $89 \pm 6.22\%$ της αρχικής της ενεργότητας όταν επεξεργάστηκε με PMSF για 60 λεπτά στους 37°C. Μεταξύ των αναγωγικών παραγόντων (5mM), η-μερκαπτοαιθανόλη είχε θετική επίδραση στην υπολειπόμενη ενεργότητα του ενζύμου ($111 \pm 0.54\%$), ενώ το θειογλυκολικό νάτριο, η διθειοθρεϊτόλη και το θειώδες νάτριο επηρέασαν τη σταθερότητα του ενζύμου με υπολειμματικές ενεργότητες $64 \pm 2.70\%$, $69 \pm 0.09\%$ και $78 \pm 3.61\%$, αντίστοιχα. Η κερατινάση, επίσης ήταν εξαιρετικά σταθερή ($103 \pm 3.52\%$) παρουσία 1% (v/v) υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ο οργανικός διαλύτης DMSO (1% v/v) ενεργοποίησε την δράση του ενζύμου ($114 \pm 5.86\%$), ενώ το ακετονιτρίλιο και η προπανοδιόλη (1% v/v) είχαν αρνητικό αποτέλεσμα στην σταθερότητα του. Η μελέτη της κερατινάσης έδειξε αξιοσημείωτη σταθερότητα μετά την προεπεξεργασία με μη ιονικά τασιενεργά (5mM), triton X-100 ($99 \pm 2.16\%$) και tween-80 ($182 \pm 1.98\%$), ενώ το ανιονικό τασιενεργό SDS προκάλεσε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας στα 5mM, κατόπιν επώασης μιας ώρας σε 37°C. Σχετικά με την επίδραση των μεταλλικών ιόντων, η παρουσία όλων των ιόντων (5mM) είχε αρνητικό αντίκτυπο στη σταθερότητα της κυτταρινάσης και ιδιαίτερα τα Al^{3+} ($13 \pm 1.35\%$) and Fe^{3+} ($12 \pm 0.36\%$). Για την εκτίμηση της σταθερότητας του ενζύμου στα εμπορικά απορρυπαντικά, τα απορρυπαντικά αραιώθηκαν σε νερό βρύσης σε τελική συγκέντρωση 7.0mg/mL και τα υπάρχοντα ένζυμα σε αυτά απενεργοποιήθηκαν με θερμική επεξεργασία στους 100°C για 30 λεπτά. Το διάλυμα του ενζύμου αναμίχθηκε με το προθερμασμένο διάλυμα απορρυπαντικού σε αναλογία 4:1 και επώαστηκαν για 60 λεπτά στους 40°C. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ακατέργαστη κερατινάση διατήρησε εξαιρετική σταθερότητα σε διάφορα απορρυπαντικά ρούχων με υπολειπόμενες ενεργότητες 85.19 ± 1.33 , 90.33 ± 5.95 , 80.16 ± 2.39 , 99.49 ± 3.11 και 87.19 ± 0.26 (%) για τα απορρυπαντικά Sunlight, Surf, Omo, Ariel και Maq, αντίστοιχα [122].



Εικόνα 2.19 Η επίδραση απορρυπαντικών ρούχων στην κερατινολυτική σταθερότητα της πρωτεάσης (Τροποποίηση από [122]).

3. Υλικά-Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Εμπορικά Ένζυμα

Τα εμπορικά ενζυμικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι το Celluclean® Classic και το Carezyme® Premium της εταιρείας Novozymes, και το Revitalenz® 200 της εταιρείας DuPont. Το ένζυμο Celluclean εμφανίζει δράση ενδοκυτταρινάσης, το Revitalenz εξωκυτταρινάσης και το Carezyme έχει και ένδο και έξω δράση.

3.1.2 Απορρυπαντικά και Μαλακτικά

Τα απορρυπαντικά και μαλακτικά που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα, καθώς και η μορφή τους καταγράφονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 3.1 Μάρκες απορρυπαντικών

Απορρυπαντικά	Μορφή
ESSEX One	υγρή
ESSEX Multi	σκόνη
OMO	υγρή
Rol, Quick Wash	υγρή

Πίνακας 3.2 Μάρκες μαλακτικών

Μαλακτικά	Μορφή
Purlan, Blue Delight	υγρή
Purple Flowers, Γαλαξίας	υγρή

3.1.3 Ρυθμιστικά Διαλύματα

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ρυθμιστικά διαλύματα με τη σύσταση που υποδεικνύεται στον πίνακα.

Πίνακας 3.3 Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων

Ρυθμιστικό Διάλυμα	pH	Συστατικά	Συγκέντρωση (M)
--------------------	----	-----------	-----------------

Κιτρικού-Φωσφορικού	5-6-7	Citric acid (C ₆ H ₈ O ₇) 100 mM Sodium phosphate dibasic (Na ₂ PO ₄) 200 mM	0.1 M
Tris-Υδροχλωρικού	7-8-9	Tris Base 100 mM HCl 19% v/v	0.1M

3.1.4 Συσκευές-Όργανα

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκτέλεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας στο εργαστήριο περιλαμβάνει τις παρακάτω συσκευές και όργανα:

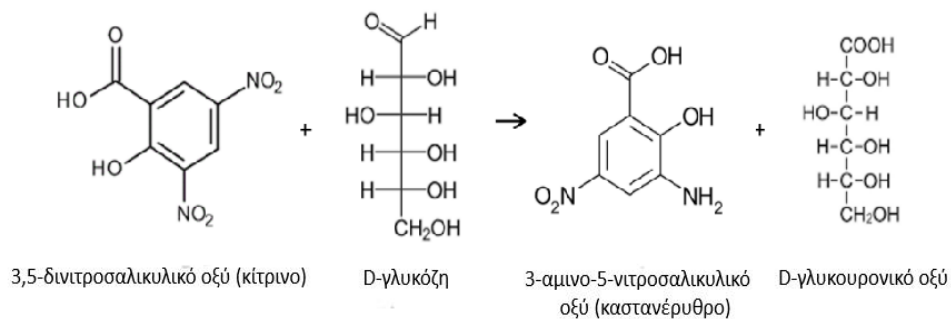
- pH-μετρο 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα Kottermann και επωαστήρες
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Φωτόμετρο UV-VIS S-22 Spectrophotometer (Boeco, Γερμανία)
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης Nuova II Stir Plate της Thermolyne και Stirrer Magnetic w Hotplate της Bioline scientific (Ελλάδα)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας (Bell Engineering, Ιταλία/ KernABS, Γερμανία)
- Πιπέτες DISCOVERY Comfort της PZ HTL SA (Πολωνία) και μικροπιπέτες BioPette™ Autoclavable της Labnet International
- Φορητό χρωματόμετρο MINOLTA CR-200 (Minolta Company, Chuo-Ku, Ιαπωνία)
- Συσκευή πλύσεων Atlas Linitex plus (8 δοχείων)
- Αυτόματο πλυντήριο Miele

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Εκτίμηση των αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στην αντίδραση οξειδοαναγωγής ανάμεσα στο DNS και τα αναγωγικά σάκχαρα ή άλλα αναγωγικά μόρια (που περιέχουν ελεύθερη ομάδα καρβονυλίου) που υπάρχουν στο δείγμα. Αναλυτικότερα, η καρβονυλική ομάδα παρουσίας ήπιων οξειδωτικών μέσων, όπως το DNS, οξειδώνεται σε

καρβοξυλική ομάδα, ενώ το DNS ανάγεται σε 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ, με αλλαγή του χρώματος του από κίτρινο σε καστανέρυθρο. Η χρωματική αυτή αλλαγή που παρατηρείται συνιστά μια ένδειξη, ότι το δείγμα περιέχει αναγωγικά σάκχαρα, με την ένταση του χρώματος να είναι είναι ανάλογη της συγκέντρωσης αυτών. Η ποσοτικοποίηση της ποσότητας των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη βοήθεια φωτομέτρου, στο οποίο μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 540 nm (μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης του 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικού οξέος). Στη συνέχεια, έχοντας δημιουργήσει μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αναγωγικά σάκχαρα γνωστής συγκέντρωσης γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης τους στο εκάστοτε δείγμα [123].

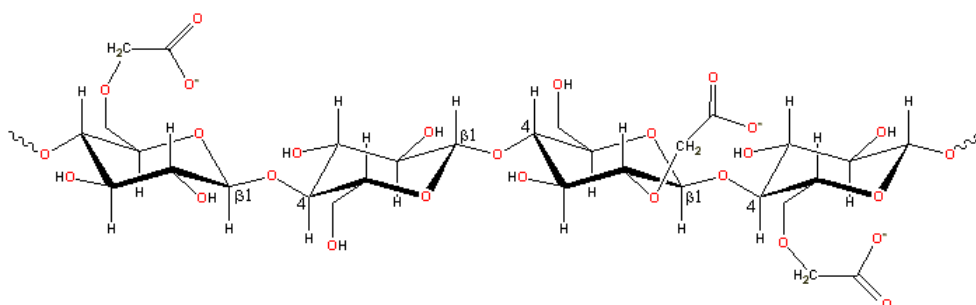


Εικόνα 3.1 Μέθοδος του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Τροποποίηση από [123]).

-Πειραματική Μέθοδος: Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 250 μL αντιδραστηρίου DNS και 250 μL δείγματος ή αποσταγμένου νερού (τυφλό). Οι σωλήνες υφίστανται βρασμό (100 °C) για 5 λεπτά. Μετά το πέρας του βρασμού, αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια, σε κάθε σωλήνα προστίθενται 2 mL απιονισμένου νερού. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων με Vortex και φωτομέτρηση σε 540 nm.

3.2.2 Παρασκευή υποστρωμάτων

Στην παρούσα εργασία, για την ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής κυτταρινικά υποστρώματα: καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (low viscosity carboxymethylcellulose, CMC, SIGMA) και διηθητικό χαρτί (filter paper, Whatman N° 1), ενώ για την εκτίμηση βελτίωσης της λευκότητας και της αντιγήρανσης των υφασμάτων χρησιμοποιήθηκαν βαμβακεροί ιματισμοί (CN-42, Center for test materials). Στη συνέχεια, παρουσιάζεται η δομή της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης που χρησιμοποιήθηκε:



Εικόνα 3.2 Δομή καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC)

- CMC

Παρασκευάστηκε υπόστρωμα 2,0% w/v καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (low viscosity carboxymethylcellulose, CMC) σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών 100 mM, σε pH=5,0 για το Revitalenz και pH=7,0 για το Celluclean και το Carezyme, σύμφωνα με τα βέλτιστα pH που βρέθηκαν μετά από δοκιμές, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Αναλυτικά, ζυγίστηκαν στον αναλυτικό ζυγό 2g CMC σε σκόνη τα οποία στη συνέχεια προστέθηκαν σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος, υπό ανάδευση και χαμηλή θέρμανση για λίγα λεπτά μέχρι να διαλυθούν τα στερεά. Στα δύο διαλύματα CMC, ένα σε pH 5 και ένα σε pH 7, που προέκυψαν, προστέθηκε αζίδιο 0,02% w/v για την αποφυγή μολύνσεων.

- Filter Paper

Για τη μέτρηση της ολικής ενεργότητας κυτταρινασών των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα διηθητικό χαρτί Whatman N° 1, διαστάσεων 1x6 cm και μάζας 50 mg.

- Βαμβακεροί Ιματισμοί

Χρησιμοποιήθηκαν 16 βαμβακερά (πλεκτά) τεμάχια (9 cm*10 cm) ειδικά για τον έλεγχο ποιότητας υλικών (CN-42, Center for test materials 26).

3.2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού ενζυμικής ενεργότητας

Η εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινάσης γίνεται έμμεσα με τη μέτρηση των παραγόμενων αναγωγικών σακχάρων που προκύπτουν από τη δράση της, τα οποία προσδιορίζονται ποσοτικά με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

Ως **μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit)**, ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει το σχηματισμό 1 μmol προϊόντος από το υπόστρωμα ανά λεπτό υπό τις συνθήκες του πρωτοκόλλου της ενζυμικής αντίδρασης.

3.2.3.1 Ενεργότητα ενδογλουκανάσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των ενδογλουκανασών των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα 2.0% w/v καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (low viscosity carboxymethylcellulose, CMC) σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών 100 mM, pH 5.0 για το Revitalenz και pH 7.0 για το Celluclean και το Carezyme, σύμφωνα με τα βέλτιστα pH που βρέθηκαν μετά από δοκιμές, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμείχθηκαν 0.45 mL υποστρώματος με 50 μL κατάλληλα αραιωμένου ενζύμου. Ακολούθησε επώαση του διαλύματος που προέκυψε, σε υδατόλουτρο, σε σταθερή θερμοκρασία 40°C για 1 ώρα, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Μετά το τέλος της επώασης, ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο για 5 min για την παύση της αντίδρασης και στη συνέχεια, προστέθηκαν 0.50 mL δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των παραχθέντων αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS. Ακολούθησε βρασμός του διαλύματος για 5 min και στη συνέχεια προστέθηκαν 4 mL απιονισμένου νερού. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 540 nm. Παρασκευάστηκε ένα τυφλό διάλυμα, σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία, με τη διαφορά ότι αντί για υπόστρωμα προστέθηκε απιονισμένο νερό, ενώ το τυφλό διάλυμα για το μηδενισμό του

φωτομέτρου παρασκευάστηκε με την προσθήκη 0.50 mL DNS και 0.50 mL απιονισμένου νερού σε δοκιμαστικό σωλήνα, ακολούθησε βρασμός 5 min μαζί με τα υπόλοιπα διαλύματα και προσθήκη 4 mL επιπλέον απιονισμένου νερού.

Η ενεργότητα των ενζύμων προσδιορίστηκε με βάση την ποσότητα των αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώθηκαν από την αντίδραση, με τη μέθοδο του DNS. Η τιμή της συγκέντρωσης των σακχάρων προέκυψε από πρότυπη καμπύλη αναφοράς, που κατασκευάστηκε με τη χρήση διαλυμάτων γλυκόζης γνωστών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση προϊόντος υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$C(\text{mg/mL})=0.8024 \cdot A_{540\text{nm}}$$

3.2.3.2 Ολική ενεργότητα κυτταρινασών (Filter Paper Activity)

Για τη μέτρηση της ολικής ενεργότητας κυτταρινασών (Filter Paper Activity, FPA Units) των ενζύμων Revitalenz και Carezyme χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα διηθητικό χαρτί Whatman N° 1, διαστάσεων 1x6 cm και μάζας 50 mg. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκε το διηθητικό χαρτί και εμβαπτίστηκε σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών 100 mM, pH 5.0 για το Revitalenz και pH 7.0 για το Celluclean και το Carezyme, σύμφωνα με τα βέλτιστα pH που βρέθηκαν μετά από δοκιμές, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά, και στη συνέχεια προστέθηκαν 0.5 mL κατάλληλα αραιωμένου ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα που προέκυψε, αναδεύτηκε και αφέθηκε για επώαση σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας $T=50^{\circ}\text{C}$ για κατάλληλο χρόνο επώασης. Μετά το τέλος της επώασης, το μείγμα τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο για τη διακοπή της αντίδρασης. Σε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρθηκαν 250 μL από το διάλυμα και 250 μL διαλύματος δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των παραχθέντων αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS. Κατόπιν, το μείγμα υπέστη βρασμό για 5 min και ακολούθησε προσθήκη 2 mL απιονισμένου νερού. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 540nm. Παρασκευάστηκε ένα τυφλό διάλυμα, σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία, με τη διαφορά ότι αντί για ενζυμικό διάλυμα προστέθηκε απιονισμένο νερό, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για το μηδενισμό του φωτόμετρου, καθώς και ένα διάλυμα ελέγχου (control) που παρασκευάστηκε απουσία υποστρώματος.

Η ενεργότητα των ενζύμων προσδιορίστηκε με βάση την ποσότητα των αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώθηκαν από την αντίδραση, με τη μέθοδο του DNS. Η τιμή της συγκέντρωσης των σακχάρων προέκυψε από πρότυπη καμπύλη αναφοράς, που κατασκευάστηκε με τη χρήση διαλυμάτων γλυκόζης γνωστών συγκεντρώσεων. Σημειώνεται ότι παρασκευάστηκε διαφορετικό διάλυμα DNS από αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της ενεργότητας ενδογλουκανάσης, που περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο, οπότε κατασκευάστηκε και νέα πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ως εκ τούτου, η συγκέντρωση προϊόντος υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$C(\text{mg/mL})=0.8045 \cdot A_{540\text{nm}}$$

3.2.4 Καθορισμός συνθηκών του πειράματος

3.2.4.1 Εύρεση βέλτιστων τιμών pH

Για τον προσδιορισμό των τιμών pH για τις οποίες τα εμπορικά ένζυμα Celluclean, Carezyme και Revitalenz παρουσιάζουν βέλτιστη δράση, διερευνήθηκε το εύρος των τιμών pH 5-9. Για το σκοπό, αυτό, παρασκευάστηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα Κιτρικού-Φωσφορικού για τις τιμές pH 5,6,7 και Tris-Υδροχλωρικού για τις τιμές pH 7,8,9, με τις συστάσεις που αναγράφονται στον ανάλογο πίνακα.

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα 1.0% w/v καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (low viscosity carboxymethylcellulose, CMC) στα ρυθμιστικά διαλύματα που αναφέρονται παραπάνω. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες αναμείχθηκαν 0.5 mL υποστρώματος CMC με 0.5 mL κατάλληλα αραιωμένου ενζύμου. Τα ένζυμα αραιώθηκαν 100 φορές σε απιονισμένο νερό και ύστερα 10 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να βρίσκονται τελικά αραιωμένα σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος (0.1% v/v). Στη συνέχεια, τα διαλύματα αφέθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο σε σταθερή θερμοκρασία 40°C για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθήθηκε η αντίστοιχη διαδικασία, όπως αυτή περιγράφεται στην ανάλογη παράγραφο 3.2.3.1, για να προσδιοριστεί η ενζυμική ενεργότητα του κάθε δείγματος για όλα τα ένζυμα.

3.2.4.2 Εύρεση κατάλληλης συγκέντρωσης των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz σε νερό και κατάλληλου χρόνου επώασης αντίδρασης με τη μέθοδο Filter Paper

Η εύρεση κατάλληλης συγκέντρωσης των ενζύμων στο διάλυμα εξυπηρετεί δύο σκοπούς. Αφενός, επιλέγεται μία συγκέντρωση η οποία να δίνει απορροφήσεις στη γραμμική περιοχή της μεθόδου DNS και αφετέρου απαιτούνται μεγάλες αραιώσεις του απορρυπαντικού και του μαλακτικού, ώστε το δείγμα που, τελικά, θα φωτομετρηθεί να είναι διαυγές, οπότε η μέτρηση να είναι εφικτή και ακριβής.

Για τον προσδιορισμό κατάλληλης συγκέντρωσης των ενζύμων Celluclean, Carezyme, Revitalenz σε διάλυμα, τα ένζυμα, αρχικά, αραιώθηκαν σε νερό σε τελική περιεκτικότητα 0.1, 0.2 και 1% v/v. Σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού ενζυμικής ενεργότητας με Filter Paper, σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκε το διηθητικό χαρτί (1×6cm, 50m), το οποίο εμβαπτίστηκε σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών 0,1 M, pH=5.0 για το Revitalenz και pH=7.0 για τα Celluclean και το Carezyme, και στη συνέχεια προστέθηκαν 0.5 mL κατάλληλα αραιωμένου ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα που προέκυψε αναδεύτηκε και αφέθηκε για επώαση σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας T=50°C για 3 ώρες, με δειγματοληψία κάθε 1 ώρα, ώστε να καθοριστεί ο βέλτιστος χρόνος επώασης. Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθήθηκε η αντίστοιχη διαδικασία, όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.2.

3.2.4.3 Εύρεση κατάλληλης συγκέντρωσης του ενζύμου Revitalenz σε απορρυπαντικό, μαλακτικό και νερό με τη μέθοδο Filter Paper

Για τον προσδιορισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης του Revitalenz σε απορρυπαντικό (Essex One), μαλακτικό (Purilan) και νερό ακολουθήθηκε η ανάλογη πειραματική διαδικασία, όπως αυτή περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.3.2, για χρόνο επώασης της αντίδρασης 3 ώρες. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν διαλύματα ενζύμου με τελικές συγκεντρώσεις 0.4, 0.2, 0.13% v/v, δηλαδή το ένζυμο αραιώθηκε 250, 500 και 750 φορές παρουσία απορρυπαντικού, μαλακτικού και νερού.

3.2.4.4 Εύρεση κατάλληλης συγκέντρωσης του απορρυπαντικού/μαλακτικού και χρόνου επώασης αντίδρασης με τη μέθοδο CMC

Για την εύρεση κατάλληλης συγκέντρωσης του απορρυπαντικού και μαλακτικού στο διάλυμα ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα 2.0% w/v καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (low viscosity carboxymethylcellulose, CMC) σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών 100mM, pH=5.0 για το Revitalenz σύμφωνα με το βέλτιστο pH που βρέθηκε μετά από δοκιμές. Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμείχθηκαν 0.45 mL υποστρώματος με 50 mL κατάλληλα αραιωμένου ενζύμου (αρχικό διάλυμα). Σε όλα τα διαλύματα η αραιώση του ενζύμου σε απορρυπαντικό, μαλακτικό, νερό ήταν 1:1.000. Σημειώνεται ότι κατά την πειραματική μέθοδο τα διαλύματα αραιώθηκαν άλλες 100 φορές.

Στην πρώτη περίπτωση, το ένζυμο αραιώθηκε 1.000 φορές σε απορρυπαντικό και μαλακτικό και τα διαλύματα αφέθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο 30 λεπτά, σε θερμοκρασία 40°C. Το απορρυπαντικό και το μαλακτικό δεν αραιώθηκαν, αρχικά, καθόλου (100% v/v), επομένως η συγκέντρωση τους στα τελικά διαλύματα ήταν 1% v/v. Στη δεύτερη περίπτωση, το ένζυμο αραιώθηκε 100 φορές σε απορρυπαντικό και μαλακτικό και στη συνέχεια άλλες 10 σε νερό, ενώ στην τρίτη 10 φορές σε απορρυπαντικό και μαλακτικό και 100 σε νερό. Άρα, η συγκέντρωση του απορρυπαντικού και του μαλακτικού στο αρχικό διάλυμα ήταν 10% v/v στη δεύτερη περίπτωση, ενώ 1% v/v στην τρίτη. Και στις δύο περιπτώσεις, ο χρόνος επώασης της αντίδρασης στο υδατόλουτρο ορίστηκε η 1 ώρα και η θερμοκρασία 40°C. Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθήθηκε η αντίστοιχη διαδικασία για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας, όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.1.

3.2.5 Μελέτη σταθερότητας ενζύμων παρουσία εμπορικού απορρυπαντικού ή μαλακτικού

Η εκτίμηση της σταθερότητας των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz σε απορρυπαντικό, μαλακτικό και νερό πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της ενεργότητας τους με βάση την ποσότητα των αναγωγικών σακχάρων που απελευθερώθηκαν από την αντίδραση με το κυτταρινικό υπόστρωμα, με τη μέθοδο του DNS. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε 2.0% w/v καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (low viscosity carboxymethylcellulose, CMC) σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών 100 mM, pH 5.0 για το Revitalenz και pH 7.0 για το Celluclean και το Carezyme, σύμφωνα με τα βέλτιστα pH που βρέθηκαν μετά από δοκιμές. Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των ενζύμων περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.3.1. Παρασκευάστηκαν, επίσης, δύο διαλύματα ελέγχου (control), σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία, με τη διαφορά ότι αντί για ενζυμικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε απορρυπαντικό (Essex One) ή μαλακτικό (Purilan), ενώ το τυφλό διάλυμα για το μηδενισμό του φωτομέτρου παρασκευάστηκε με την προσθήκη 0.50 mL DNS και 0.50 mL απιονισμένου νερού σε δοκιμαστικό σωλήνα, ακολούθησε βρασμός 5 min μαζί με τα υπόλοιπα διαλύματα και προσθήκη 4 mL επιπλέον απιονισμένου νερού.

Τα ένζυμα, αρχικά, αραιώθηκαν 4 φορές σε απορρυπαντικό, μαλακτικό και νερό (25% v/v), συσκευάστηκαν (stock) και τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα σε σταθερή θερμοκρασία T=37°C για ένα μήνα. Στα διαλύματα με νερό προστέθηκε αζίδιο 0.02% w/v για την αποφυγή μολύνσεων. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες των διαλυμάτων σε χρονικά διαστήματα t= 0, 3, 8, 14, 21 και 30 ημερών. Σε κάθε δειγματοληψία τα ενζυμικά διαλύματα υπέστησαν 3 διαδοχικές αραιώσεις σε

νερό, ώστε η τελική αραίωση του ενζύμου να προκύπτει 1:1200 (0.083% v/v). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τριπλές μετρήσεις για μεγαλύτερη ακρίβεια.

Οι συνθήκες τους πειράματος, δηλαδή η επώαση των διαλυμάτων των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz σε περιβάλλον απορρυπαντικού, μαλακτικού και νερού σε θερμοκρασία 37°C για 30 μέρες επιλέγονται, έτσι, καθώς προσομοιάζουν τις συνθήκες οικιακής πλύσης των ρούχων για περίοδο ενός χρόνου.

3.2.6 Εκτίμηση λευκότητας και αντιγήρανσης σε βαμβακερό ιματισμό μετά από πλύση με μαλακτικά με ένζυμα

3.2.6.1 Τεχνητή γήρανση και τεχνητό γκριζάρισμα

Για την εκτίμηση βελτίωσης της λευκότητας και της αντιγήρανσης σε βαμβακερό ιματισμό μετά από πλυσίματα με τη χρήση μαλακτικών που περιέχουν τα ένζυμα Celluclean, Carezyme και Revitalenz ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά, 8 βαμβακερά (πλεκτά) τεμάχια (9 cm×10 cm) ειδικά για τον έλεγχο ποιότητας υλικών (CN-42, Center for test materials [124]) υπέστησαν τεχνητό γκριζάρισμα και 8 τεχνητή γήρανση, μέσω πλύσεων σε συγκεκριμένες συνθήκες που προσομοιάζουν την εκτεταμένη χρήση ενδυμάτων και πολλαπλές πλύσεις.

Για τις πολλαπλές πλύσεις μικρού όγκου χρησιμοποιήθηκε ειδική συσκευή ATLAS Linitest plus, που περιείχε 8 δοχεία των 550mL το καθένα (Εικόνα 3.3)



Εικόνα 3.3 Συσκευή Linitest plus για τη διεξαγωγή πολλαπλών πλύσεων μικρού όγκου.

Για το τεχνητό γκριζάρισμα προστέθηκε σε κάθε δοχείο, εκ των οκτώ, της παραπάνω συσκευής, 1 mL υγρού απορρυπαντικού OMO (χωρίς ένζυμο) σε 200 mL απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, προστέθηκε ένα καθαρό βαμβακερό τεμάχιο (CN-42), καθώς και ένα τεμάχιο με επιπλέον ρυπογόνο φορτίο (Soil Ballast Load, W-SBL 2004). Το τελευταίο προστέθηκε για την καλύτερη προσομοίωση των πραγματικών συνθηκών, καθώς στις οικιακές πλύσεις το πλυντήριο περιέχει ρούχα με ακαθαρσίες. Στα δοχεία προστέθηκαν και 20 μεταλλικά σφαιρίδια (8 mm) στο καθένα για την αύξηση της μηχανικής καταπόνησης και η συσκευή τέθηκε σε λειτουργία. Η θερμοκρασία ορίστηκε στους 40°C και το πρόγραμμα εκτελέστηκε για 50 λεπτά υπό ανάδευση.

Για την τεχνητή γήρανση προστέθηκαν ανά δοχείο 0.25 mL απορρυπαντικού Essex multi (σε σκόνη) σε 200mL απιονισμένου νερού, ένα καθαρό βαμβακερό τεμάχιο (CN-42) και 20 μπίλιες για μηχανική καταπόνηση. Το πρόγραμμα εκτελέστηκε σε θερμοκρασία 40°C με διάρκεια 2 ωρών, υπό ανάδευση. Για περαιτέρω γήρανση του υφάσματος, όλα τα βαμβακερά τεμάχια πλύθηκαν σε πλυντήριο Miele με 50 gr απορρυπαντικού Essex multi (σε σκόνη), μαζί με 4kg ρούχα, για 2 ώρες, στους 60°C.

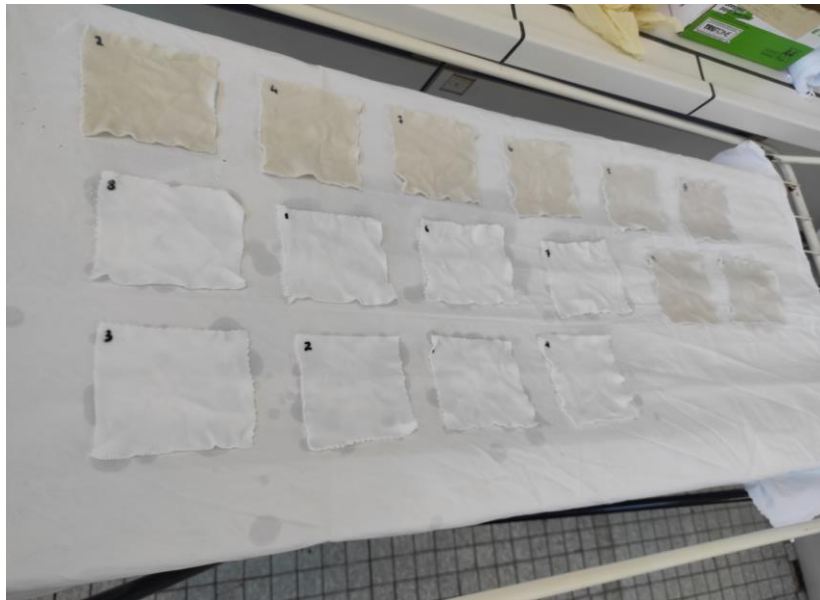
3.2.6.2 Πλύση των δειγμάτων με μαλακτικό με ένζυμο

Για τον έλεγχο της βελτίωσης της λευκότητας και αντιγήρανσης παρασκευάστηκαν συνολικά 16 δείγματα, 8 για τη διερεύνηση της κάθε περίπτωσης. Από τα 8 δείγματα, 4 παρασκευάστηκαν με μαλακτικό Ultra, που περιείχε 8-8.5% κατιονικά και 4 με μαλακτικό Dilute, που περιείχε 3% κατιονικά. Ως συμπυκνωμένο μαλακτικό (Ultra) χρησιμοποιήθηκε το Purlan, *Blue Delight*, ενώ ως πιο αραιωμένο (Dilute) το *Purple Flowers*, Γαλαξίας.

Για κάθε τύπο μαλακτικού παρασκευαστήθηκαν 3 δείγματα με ένζυμο, για το Celluclean, Carezyme και Revitalenz, καθώς και ένα απουσία ενζύμου που λειτούργησε σαν τυφλό δείγμα. Πιο αναλυτικά, για τον έλεγχο της λεύκανσης παρασκευάστηκαν διαλύματα μαλακτικών 100mL με την προσθήκη 200μL ενζύμου, ώστε η τελική περιεκτικότητα του κάθε ενζύμου στο μαλακτικό να είναι 0.2% v/v. Τα διαλύματα μαλακτικών με αραιωμένο ένζυμο αναδεύτηκαν. Στη συνέχεια, σε κάθε δοχείο της συσκευής Linitext προστέθηκαν 200mL απιονισμένο νερό, 0.5 mL του διαλύματος μαλακτικού με 0.2% v/v ένζυμο, καθώς και ο βαμβακερός ιματισμός που είχε προηγουμένως γκριζάρει με τεχνητό τρόπο. Για την αύξηση της μηχανικής καταπόνησης προστέθηκαν 20 μεταλλικά σφαιρίδια με διάμετρο 8mm. Η συσκευή τέθηκε σε λειτουργία σε θερμοκρασία 40°C, για 50 λεπτά και υπό ανάδευση. Μετά το πέρας του κύκλου πλυσίματος, οι βαμβακεροί ιματισμοί στραγγίστηκαν και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες (Εικόνα 3.4). Η διαδικασία επαναλήφθηκε κατά τον ίδιο τρόπο, για τον έλεγχο της αντιγήρανσης με τη διαφορά ότι προστέθηκε ο βαμβακερός ιματισμός που είχε προηγουμένως γηρανθεί τεχνητά. Στον παρακάτω πίνακα καταγράφεται η σύσταση των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν.

Πίνακας 3.4 Σύσταση των δειγμάτων

Δείγμα	Μαλακτικό	Ένζυμο
1	0,5 mL Ultra	0,2% v/v Celluclean
2	0,5 mL Ultra	0,2%v/v Carezyme
3	0,5 mL Ultra	0,2% v/v Revitalenz
4	0,5 mL Ultra	- (control)
5	0,5 mL Dilute	0,2% v/v Celluclean
6	0,5 mL Dilute	0,2% v/v Carezyme
7	0,5 mL Dilute	0,2% v/v Revitalenz
8	0,5 mL Dilute	- (control)



Εικόνα 3.4 Στέγνωμα των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου

Αφού και τα 16 δείγματα στέγνωσαν, πλύθηκαν σε πλυντήριο Miele με προσθήκη 50 mL απορρυπαντικού Rol, *Quick Wash* (χωρίς ένζυμο) μαζί με 3kg καθαρά λευκά ρούχα. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είχε διάρκεια 49 λεπτά, σε θερμοκρασία 40°C. Στη συνέχεια, αφέθηκαν ξανά να στεγνώσουν.



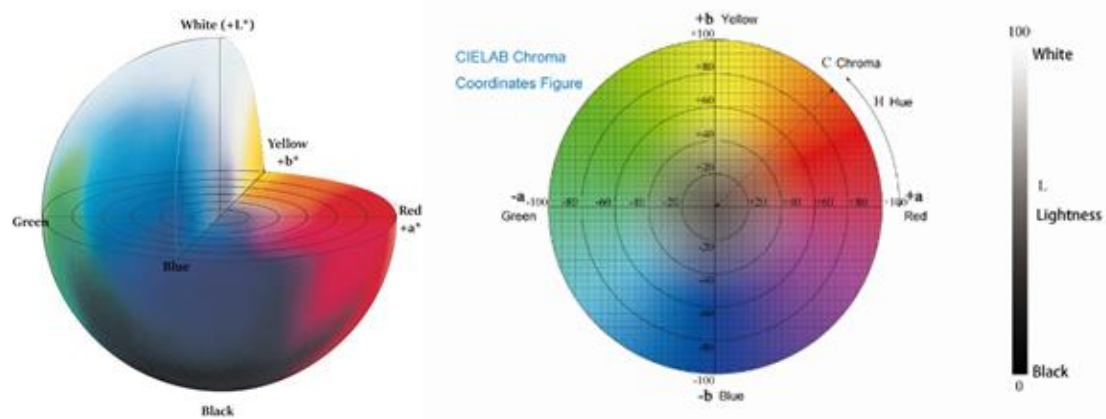
Εικόνα 3.5 Πλυντήριο Miele

Η εκτίμηση της βελτίωσης αντιγήρανσης πραγματοποιήθηκε μέσω οπτικού ελέγχου της επιφάνειας των βαμβακερών υφασμάτων που πλύθηκαν με μαλακτικά με κυτταρινάσες σε σύγκριση με τα υφάσματα που πλύθηκαν με μαλακτικά χωρίς ένζυμα. Η αξιολόγηση της βελτίωσης της λευκότητας

έγινε με οπτικό έλεγχο του χρώματος των υφασμάτων, αλλά και μέτρηση του ολικού χρώματος για πιο ακριβή αποτελέσματα.

3.2.6.3 Μέθοδος προσδιορισμού της λευκότητας - Μέτρηση χρώματος

Για την εκτίμηση της βελτίωσης της λευκότητας των βαμβακερών υφασμάτων μετά την επεξεργασία τους με ένζυμα αραιωμένα σε μαλακτικά, μετράται το χρώμα των δειγμάτων. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται με το χρωματόμετρο MINOLTA CR-200. Η χρωματική κλίμακα που χρησιμοποιείται είναι η CIE Lab (Commission International de l'Éclairage) με χρωματικούς δείκτες τους L, a, b (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6 Συντεταγμένες L, a και b του χρώματος στην κλίμακα CIE Lab.

Η ολική μεταβολή του χρώματος ΔE προκύπτει από τις παραμέτρους L, a, b και την παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta E = \sqrt{((L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2)}$$

Όπου,

- ΔE , η συνολική μεταβολή τους χρώματος
- L, η παράμετρος φωτεινότητας ($0 \leq L \leq 100$)
- a, η παράμετρος του χρώματος κόκκινου και πράσινου. Οι θετικές τιμές του a αντιστοιχούν σε κόκκινο χρώμα και οι αρνητικές σε πράσινο
- b, η παράμετρος του χρώματος κίτρινου και μπλε. Οι θετικές τιμές του b αντιστοιχούν σε κίτρινο χρώμα και οι αρνητικές σε μπλε

Όπου L_0 , a_0 , b_0 οι παράμετροι του αρχικού δείγματος.

Το χρωματόμετρο MINOLTA CR-200 είναι ένα φορητό χρωματόμετρο που αποτελείται από μια λαβή, στο άκρο της οποίας βρίσκεται η κεφαλή μέτρησης, διαμέτρου 8mm και από έναν επεξεργαστή δεδομένων με δυνατότητα εκτύπωσης των μετρήσεων και μνήμη μέγιστης αποθήκευσης 300 μετρήσεων, ο οποίος λειτουργεί με μπαταρίες ή με ρεύμα (Εικόνα 3.7). Το σύστημα περιλαμβάνει και ένα σετ χρωματικών πλακετών εξισορρόπησης (calibration).



Εικόνα 3.7 Φορητό χρωματόμετρο MINOLTA CR-200.

Κατά την πραγματοποίηση των μετρήσεων το χρωματόμετρο συνδέεται με παροχή ρεύματος και στην οθόνη παρουσίασης των μετρήσεων εμφανίζονται οι συντεταγμένες της κλίμακας χρώματος στην οποία είναι ρυθμισμένο. Πριν από κάθε μέτρηση, πραγματοποιείται βαθμονόμηση του οργάνου με τη βοήθεια ειδικής λευκής πλάκας ($L = 97.50$, $a = -0.31$, $b = -3.83$). Η κάθε μέτρηση επαναλαμβάνεται τρεις φορές και το αποτέλεσμα αναγράφεται αυτομάτως στην οθόνη, ως η μέση τιμή των τριών μετρήσεων. Οι μετρήσεις γίνονται σε αντιπροσωπευτική περιοχή του δείγματος και τα αποτελέσματα που προκύπτουν συγκρίνονται συνολικά για όλα τα δείγματα.

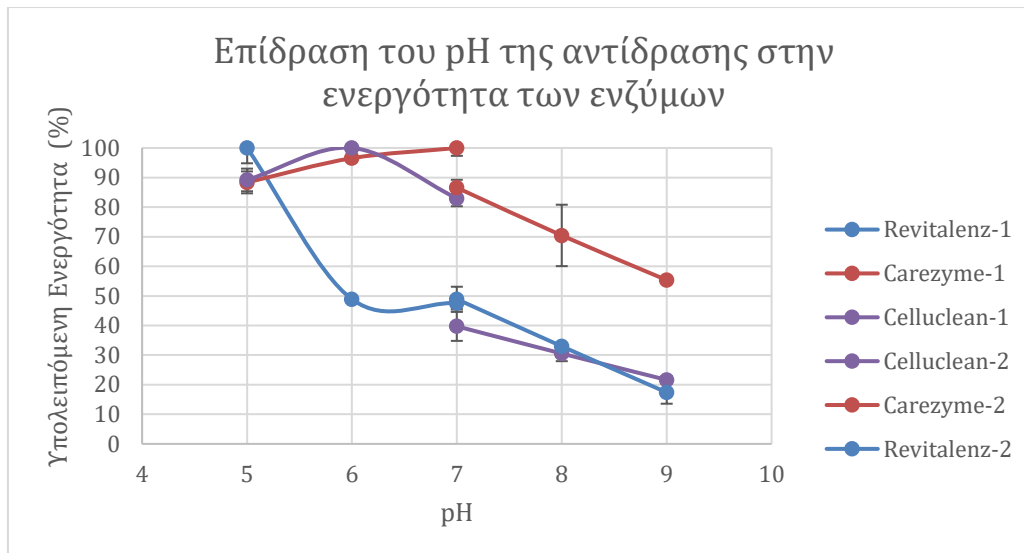
Οι τιμές L_0 , a_0 και b_0 είναι παράμετροι που λήφθηκαν στο χρόνο 0 με τη βοήθεια της λευκής πλάκας.

4. Αποτελέσματα

4.1 Καθορισμός συνθηκών του πειράματος

4.1.1 Καθορισμός βέλτιστης τιμής pH

Στο ακόλουθο διάγραμμα παρουσιάζονται οι υπολογισμοί υπολειπόμενης ενεργότητας για τα ένζυμα Celluclean, Carezyme και Revitalenz, μετά την επώαση τους σε θερμοκρασία 40°C για 30 λεπτά και διαφορετικές τιμές pH, στο εύρος 5 έως 9. Ως 100% ενεργότητα θεωρείται η μέγιστη ενεργότητα που μετρήθηκε για το κάθε ένζυμο και οι υπόλοιπες υπολογίστηκαν βάσει αυτής.



Εικόνα 4.1 Επίδραση της τιμής pH της αντίδρασης στην υπολειπόμενη ενεργότητα των ενζύμων Revitalenz, Carezyme και Celluclean. Σημειώνεται ότι ο αριθμός (1) αναφέρεται στο ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού, ενώ το (2) στο Tris-υδροχλωρικό.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, τα ένζυμα Revitalenz και Celluclean παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχετικά όξινες συνθήκες, pH 5.0 και pH 6.0, αντίστοιχα. Από την άλλη, το ένζυμο Carezyme είναι πιο δραστικό σε ουδέτερες συνθήκες, δηλαδή σε pH 7.0.

Αναλυτικά, από το διάγραμμα φαίνεται ότι το ένζυμο Revitalenz παρουσιάζει τη μέγιστη ενεργότητα για pH 5.0 σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού. Ενώ, σε ρυθμιστικό Tris-υδροχλωρικό, η ενεργότητα του μειώνεται απότομα στο 50% για pH 6.0 και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά με αύξηση του pH, μέχρι το pH 9.0 που φτάνει κάτω από 20%. Το ένζυμο Carezyme παρουσιάζει τη βέλτιστη ενεργότητα για pH 7.0 σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών. Σε pH 5.0, η ενεργότητα βρίσκεται στο 90% της μέγιστης, αυξάνεται μέχρι το pH 7.0 και στη συνέχεια για pH 7.0 σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl μειώνεται κάτω από το 90% με σταδιακή ελάττωση, μέχρι το pH 9.0 που η ενεργότητα βρίσκεται στο 50-60%. Το ένζυμο Celluclean εμφανίζει βέλτιστη ενεργότητα σε pH 6.0. Σε pH 5.0 έχει ενεργότητα 90% της μέγιστης, η οποία αυξάνεται μέχρι τη μέγιστη (pH 6.0), μειώνεται στο 83% για pH 7.0 σε ρυθμιστικό κιτρικών-φωσφορικών και ύστερα απότομα στο 40% σε pH 7.0 σε ρυθμιστικό Tris-HCl.

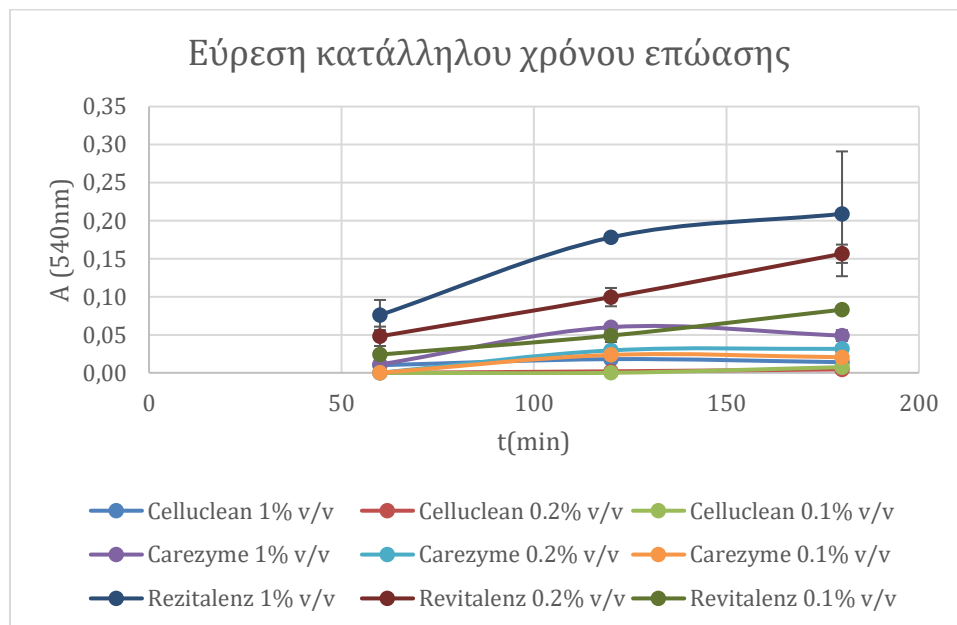
Σημειώνεται, ότι οι πλύσεις των ρούχων με απορρυπαντικά και μαλακτικά πραγματοποιούνται σε αλκαλικές συνθήκες, επομένως δεν διερευνήθηκε η δράση των ενζύμων σε pH μικρότερο από 5.0. Σχετικά με το ένζυμο Revitalenz, το οποίο παρουσιάζει βέλτιστη ενζυμική δράση σε pH 5.0 για το εύρος τιμών που διερευνήθηκε, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα να δρα με το βέλτιστο τρόπο σε ακόμα πιο όξινες συνθήκες. Όμως, επειδή οι οικιακές πλύσεις πραγματοποιούνται σε αλκαλικές συνθήκες, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι σε pH 6.0 η ενεργότητα του Revitalenz μειώνεται στο 50% της μέγιστης, επιλέγεται τελικά το pH 5.0 για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Το ένζυμο Celluclean, σε pH 7.0 εμφανίζει ενεργότητα άνω του 80% της μέγιστης (σε pH 6.0), οπότε επιλέγεται αυτή ως τελική τιμή, για την καλύτερη προσομοίωση των πραγματικών συνθηκών. Οι τιμές pH που τελικά επιλέχθηκαν για το κάθε ένζυμο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.1 Τελικές τιμές pH για τα ένζυμα Revitalenz, Carezyme, Celluclean

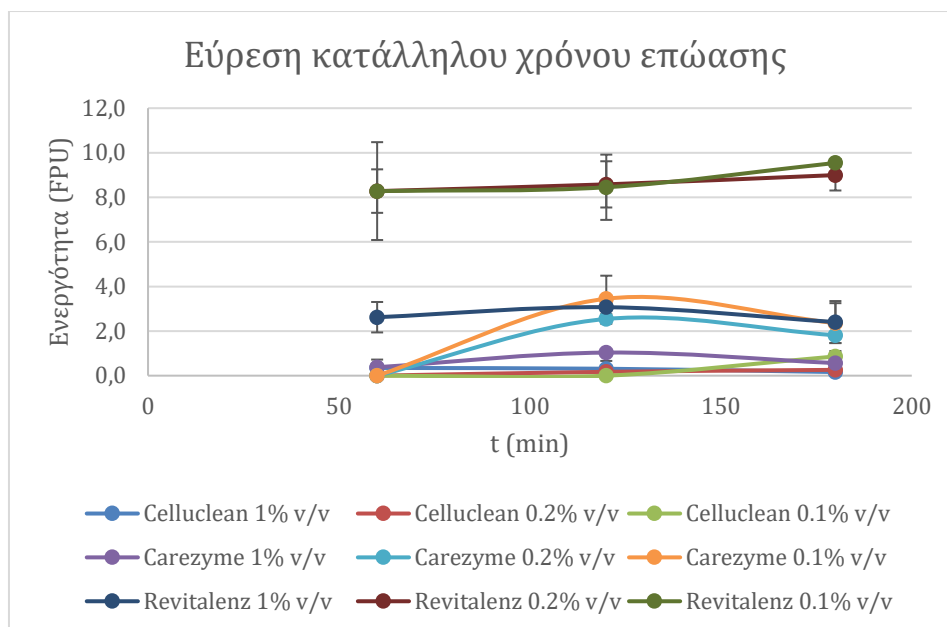
Ένζυμο	pH
Revitalenz	5
Carezyme	7
Celluclean	7

4.1.2 Εύρεση κατάλληλης συγκέντρωσης τους ενζύμου και χρόνου επώασης αντίδρασης με τη μέθοδο Filter Paper

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η ενεργότητα σε Filter Paper Units, καθώς και η μετρούμενη απορρόφηση των κατάλληλα αραιωμένων ενζύμων Celluclean, Carezyme, Revitalenz σε νερό, σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης. Σημειώνεται ότι η σύγκριση επιλέχθηκε να γίνει και με τους δύο τρόπους για μεγαλύτερη σαφήνεια. Για το κάθε ένζυμο παρασκευάστηκαν διαλύματα με συγκεντρώσεις ενζύμου 0.1, 0.2 και 1% v/v και πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία για χρόνους επώασης $t = 60, 120$ και 180 λεπτά.



Εικόνα 4.2 Γραφική απεικόνιση της απορρόφησης των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz συναρτήσει του χρόνου επώασης της αντίδρασης.



Εικόνα 4.3 Γραφική απεικόνιση της ενεργότητας σε Filter Paper Units των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz συναρτήσει του χρόνου επώασης της αντίδρασης.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 4.3), τα ένζυμα Celluclean και Carezyme εμφάνισαν μικρότερη ενεργότητα σε σύγκριση με το Revitalenz. Τα αποτελέσματα αυτά, για το Celluclean και το Carezyme, προέκυψαν λόγω της χαμηλής μετρούμενης απορρόφησης, κάτω του 0.100, ακόμα και για μεγαλύτερους χρόνους επώασης της αντίδρασης (Εικόνα 4.2). Μάλιστα, από την Εικόνα 4.3 φαίνεται ότι το ένζυμο Celluclean έχει σχεδόν μηδενική ενεργότητα.

Σε τόσο μικρές τιμές απορρόφησης, τα σφάλματα είναι πολύ υψηλά, γι αυτό και η σχηματική αναπαράσταση της ενεργότητας έχει τη μορφή που φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, αντί να διατηρείται σταθερή η τιμή της κατά τη διάρκεια του χρόνου. Επομένως, μόνο το ένζυμο Revitalenz παρουσίασε ικανοποιητικά μεγάλη απορρόφηση σε χρόνο επώασης 180 λεπτά, ώστε να είναι δυνατό να εξεταστεί, στη συνέχεια, ως προς τη σταθερότητα του παρουσία απορρυπαντικού, μαλακτικού και νερού για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ως εκ τούτου, επιλέγεται ως τελικός χρόνος επώασης της αντίδρασης, οι 3 ώρες.

Για μεγαλύτερη σαφήνεια, στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι ενεργότητες (σε FPU) των τριών ενζύμων, τα οποία βρίσκονται σε περιεκτικότητα 0.2% v/v στα διαλύματα, για χρόνο επώασης 3 ώρες.

Πίνακας 4.2 Ενεργότητες (σε FPU) των ενζύμων Celluclean, Carezyme, Revitalenz (0.2% v/v)

Ένζυμο (0.2% v/v)	Ενεργότητα (FPU)
Celluclean	0.26 ± 0.20
Carezyme	1.81 ± 0.04
Revitalenz	9.00 ± 0.69

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα ένζυμα Celluclean και Carezyme εμφάνισαν πολύ μικρή ενεργότητα στις δεδομένες συνθήκες. Επομένως, επιλέγεται μόνο το ένζυμο Revitalenz να εξεταστεί ως προς τη σταθερότητα του παρουσία απορρυπαντικού και μαλακτικού με τη μέθοδο Filter Paper και για χρόνο αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος 3 ώρες.

4.1.2.1 Εύρεση κατάλληλης συγκέντρωσης του ενζύμου Revitalenz σε απορρυπαντικό, μαλακτικό και νερό με τη μέθοδο Filter Paper

Στη συνέχεια, καταγράφεται η ενεργότητα, σε Filter Paper Units, του ενζύμου Revitalenz, όταν αυτό βρίσκεται αραιωμένο σε αναλογία 1:750 (0.13% v/v) στο διάλυμα, παρουσία απορρυπαντικού, μαλακτικού και νερού. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη συγκέντρωση ενζύμου (0.13% v/v) που είναι μικρότερη από αυτή που προέκυψε στο προηγούμενο πείραμα (0.2% v/v), ώστε να πραγματοποιηθεί μεγαλύτερη αραιώση του απορρυπαντικού και μαλακτικού.

Πίνακας 4.3 Ενεργότητα (σε FPU) του ενζύμου Revitalenz (0.13% v/v) παρουσία απορρυπαντικού, μαλακτικού και νερού

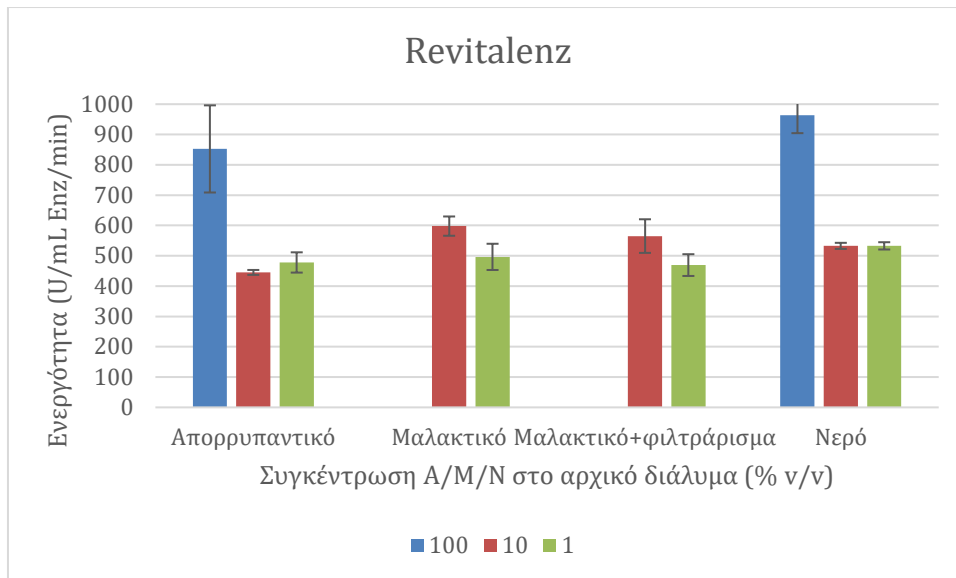
	Ενεργότητα (FPU)
Απορρυπαντικό	8.74 ± 2.76
Μαλακτικό	10.81 ± 2.07
Νερό	8.32 ± 0.61

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, η ενεργότητα του ενζύμου παρουσία απορρυπαντικού, αλλά κυρίως μαλακτικού, είναι μη αναμενόμενα μεγαλύτερη από την ενεργότητα του όταν αυτό βρίσκεται αραιωμένο μόνο σε νερό. Η τιμή, αυτή, έχει προκύψει παρότι έχουν ληφθεί υπόψιν και αφαιρεθεί τα διαλύματα ελέγχου του απορρυπαντικού και του μαλακτικού που παρασκευάστηκαν κατά την πειραματική διαδικασία. Την ίδια στιγμή, τα σφάλματα των μετρήσεων είναι υψηλά, ύψους 32% και 20%, για το απορρυπαντικό και το μαλακτικό, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αποδίδονται στη γαλακτώδη φύση του απορρυπαντικού και του μαλακτικού, τα οποία ακόμα και σε μεγάλες αραιώσεις δεν ήταν αρκετά διαυγή, οπότε καθιστούν μη αποδεκτή την μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο της φωτομέτρησης. Συγκεκριμένα, τα διαλύματα με απορρυπαντικό εμφάνιζαν θολερότητα και ήταν θαμπά, ενώ αυτά με μαλακτικό σχημάτιζαν στερεά.

4.2.3 Εύρεση κατάλληλης συγκέντρωσης του απορρυπαντικού, μαλακτικού και χρόνου επώασης αντίδρασης με τη μέθοδο CMC

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η ενεργότητα (σε CMC Units) του ενζύμου Revitalenz σε απορρυπαντικό, μαλακτικό και νερό συναρτήσει της συγκέντρωσης του απορρυπαντικού και μαλακτικού στο αρχικό διάλυμα. Για το ένζυμο παρασκευάστηκαν διαλύματα με συγκέντρωση απορρυπαντικού και μαλακτικού στο αρχικό διάλυμα: 1, 10 και 100% v/v. Το διάγραμμα που προέκυψε παρουσιάζεται παρακάτω:

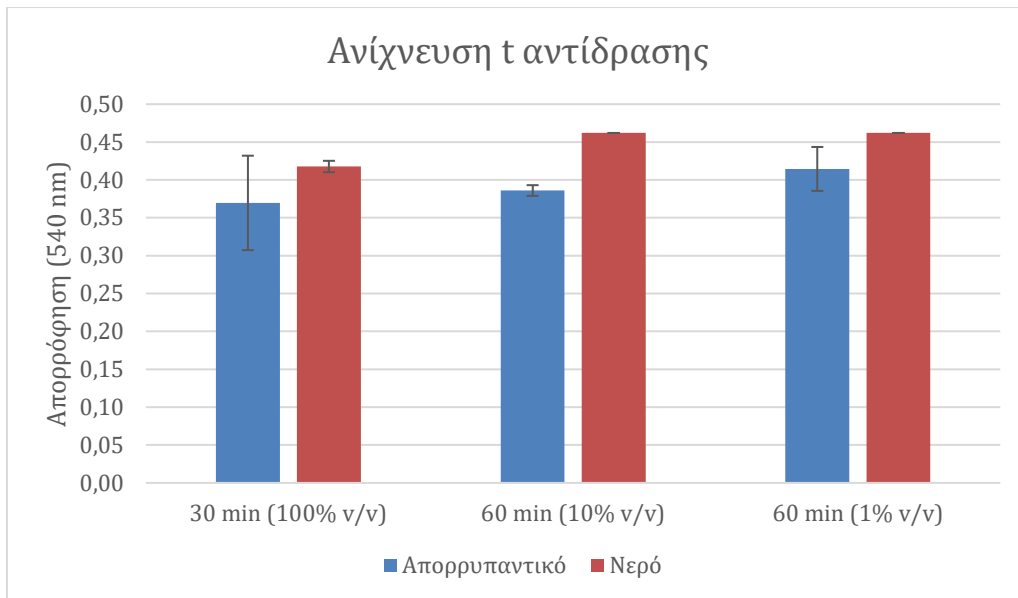


Εικόνα 4.4 Γραφική απεικόνιση της ενεργότητας του ενζύμου Revitalenz συναρτήσει της συγκέντρωσης του απορρυπαντικού, μαλακτικού, νερού στο αρχικό διάλυμα.

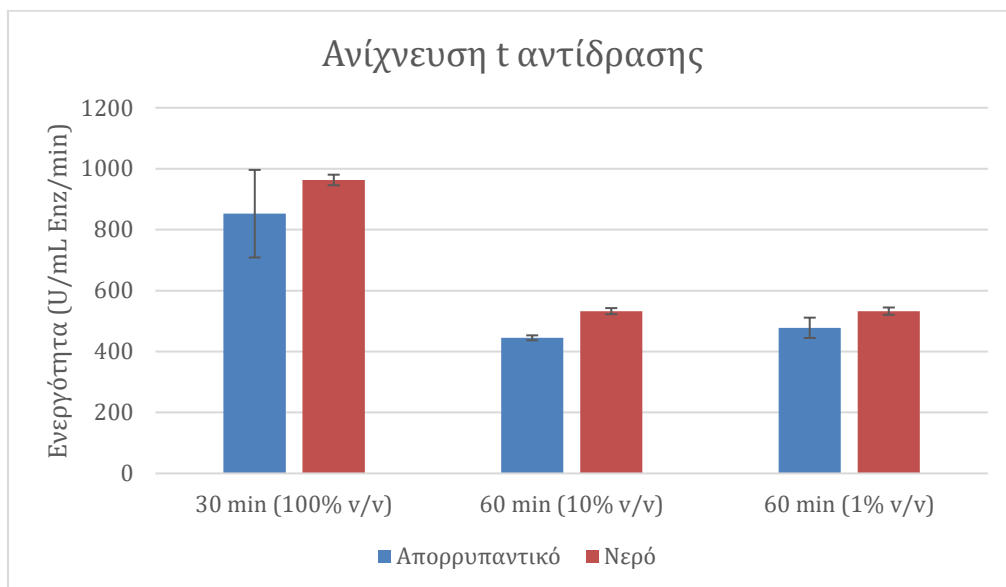
Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα η ενεργότητα του ενζύμου για περιεκτικότητα 100% v/v μαλακτικού στο αρχικό διάλυμα δεν αναγράφεται. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι στην πρώτη περίπτωση, κατά την οποία το απορρυπαντικό και το μαλακτικό δεν αραιώθηκαν καθόλου, το μαλακτικό στερεοποιήθηκε και δημιούργησε συσσωματώματα, οπότε η μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων στο φωτόμετρο με την μέθοδο DNS δεν πραγματοποιήθηκε καθόλου. Ταυτόχρονα, το αντίστοιχο διάλυμα απορρυπαντικού ήταν πολύ θαμπό, οπότε η μέτρηση είχε πολύ μεγάλα σφάλματα και θεωρήθηκε λανθασμένη. Στη δεύτερη περίπτωση, στην οποία το απορρυπαντικό και το μαλακτικό αραιώθηκαν 10 φορές (10% v/v), το διάλυμα μαλακτικού συνέχισε να εμφανίζει στερεά, αλλά σε μικρότερο βαθμό, και το διάλυμα απορρυπαντικού παρέμεινε θολό. Στην τρίτη περίπτωση, δηλαδή σε συγκέντρωση 1% v/v του απορρυπαντικού και μαλακτικού στο αρχικό διάλυμα, κανένα από τα δύο διαλύματα δεν είναι ήταν τελείως διαυγές, αλλά παρουσίαζαν κάποια θολερότητα. Τόσο στη δεύτερη όσο και στην τρίτη περίπτωση, τα διαλύματα με αραιωμένο ένζυμο Revitalenz παρουσία μαλακτικού υπέστησαν φιλτράρισμα με διηθητικό χαρτί. Ωστόσο, δεν υπήρξε καμία ουσιαστική αλλαγή στη θολερότητα των διαλυμάτων, η οποία μεταφράζεται ως μέτρηση αβάσιμα υψηλής απορρόφησης (δεν αναγράφεται) και κατ' επέκταση ενζυμικής ενεργότητας.

Σε καμία από τις περιπτώσεις, τα διαλύματα με περιεκτικότητα απορρυπαντικού ή μαλακτικού δεν ήταν τελείως διαυγή και παρουσίαζαν, επίσης, ασυνήθιστα και μη αναμενόμενα υψηλή ενζυμική ενεργότητα σε σύγκριση με τα διαλύματα απουσία αυτών, καθιστώντας τις μετρήσεις μη αξιόπιστες, ακόμα και μετά την αφαίρεση των τυφλών δειγμάτων. Επομένως, καμία από τις μελετούμενες συγκεντρώσεις 1%, 10%, 100% v/v απορρυπαντικού και μαλακτικού στο αρχικό διάλυμα δεν θεωρείται αποδεκτή.

Στη συνέχεια, παρατίθενται τα διαγράμματα της ενεργότητας, καθώς και της μετρούμενης απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου επώασης της αντίδρασης. Σημειώνεται ότι η σύγκριση επιλέχθηκε να γίνει και με τους δύο τρόπους για μεγαλύτερη σαφήνεια.



Εικόνα 4.5 Επίδραση του χρόνου επώασης της αντίδρασης στην απορρόφηση του ενζύμου Revitalenz.



Εικόνα 4.6 Επίδραση του χρόνου επώασης της αντίδρασης στην ενεργότητα του ενζύμου Revitalenz.

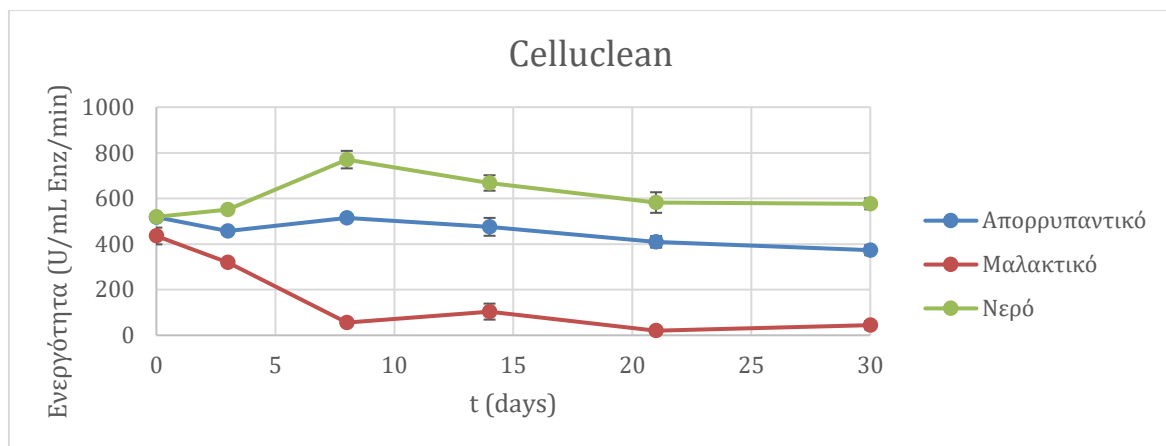
Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι για χρόνο αντίδρασης 60 min σε σύγκριση με χρόνο 30 min, η ενεργότητα μειώνεται, ενώ η απορρόφηση αυξάνεται. Συγκεκριμένα, η ενεργότητα στα 60 min μειώνεται σε ποσοστό περίπου 45% σε σχέση με τα 30 min, ενώ η απορρόφηση αυξάνεται σε ποσοστό 12%. Αυτό προκύπτει καθώς η μέτρηση της ενεργότητας πραγματοποιείται σε Units/mL Enz/min.

Παρόλ'αυτά επιλέγεται ως χρόνος επώασης της αντίδρασης η μία ώρα, για να επιτευχθούν μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης, καθώς όπως αποδείχθηκε παραπάνω οι αραιώσεις που διερευνήθηκαν του απορρυπαντικού και μαλακτικού στο αρχικό διάλυμα δεν ήταν αρκετές, ώστε να

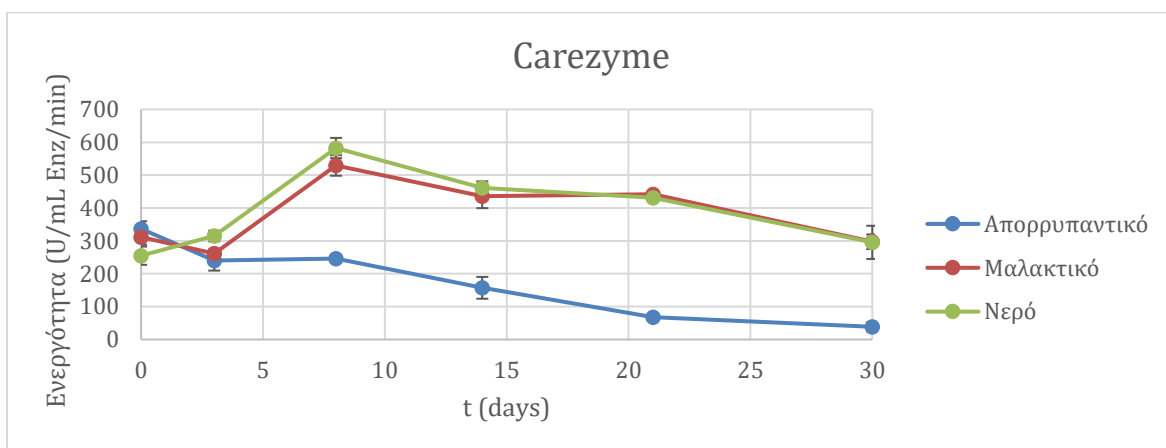
είναι διαυγές το δείγμα προς φωτομέτρηση. Επομένως, με περαιτέρω αραιώση του διαλύματος αναμένεται μείωση της συγκέντρωσης του ενζύμου στο τελικό διάλυμα, οπότε απαιτούνται οι μεγαλύτερες δυνατές απορροφήσεις, ώστε να τα σφάλματα των μετρήσεων να είναι όσο το δυνατόν μικρότερα.

4.2 Μελέτη σταθερότητας ενζύμων παρουσία εμπορικού απορρυπαντικού ή μαλακτικού

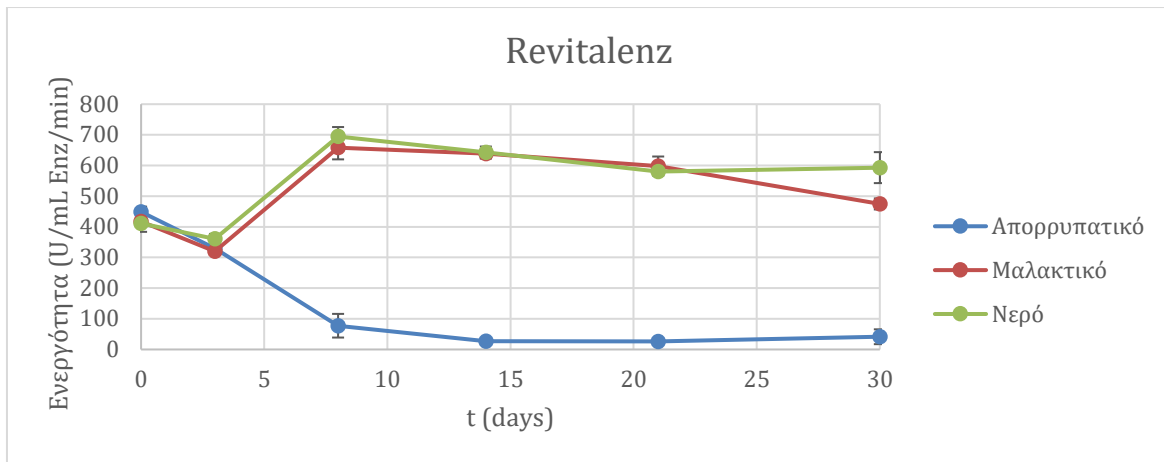
Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται η σταθερότητα των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz παρουσία απορρυπαντικού, μαλακτικού και νερού σε διάρκεια ενός μήνα και σε θερμοκρασία επώασης 37°C.



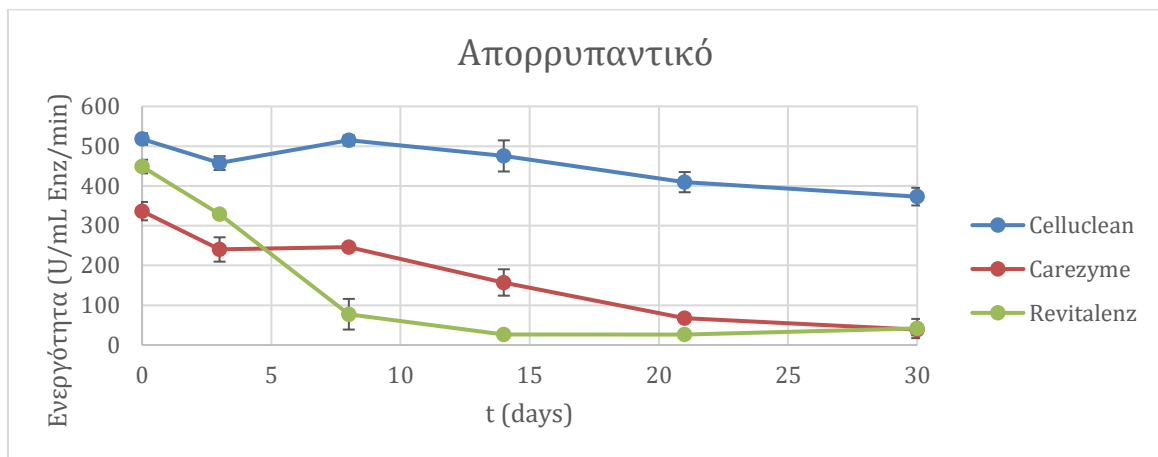
Εικόνα 4.7 Απεικόνιση της μείωσης ενεργότητας του ενζύμου Celluclean κατά την επώαση του στους 37°C σε απορρυπαντικό, μαλακτικό και νερό για ένα μήνα.



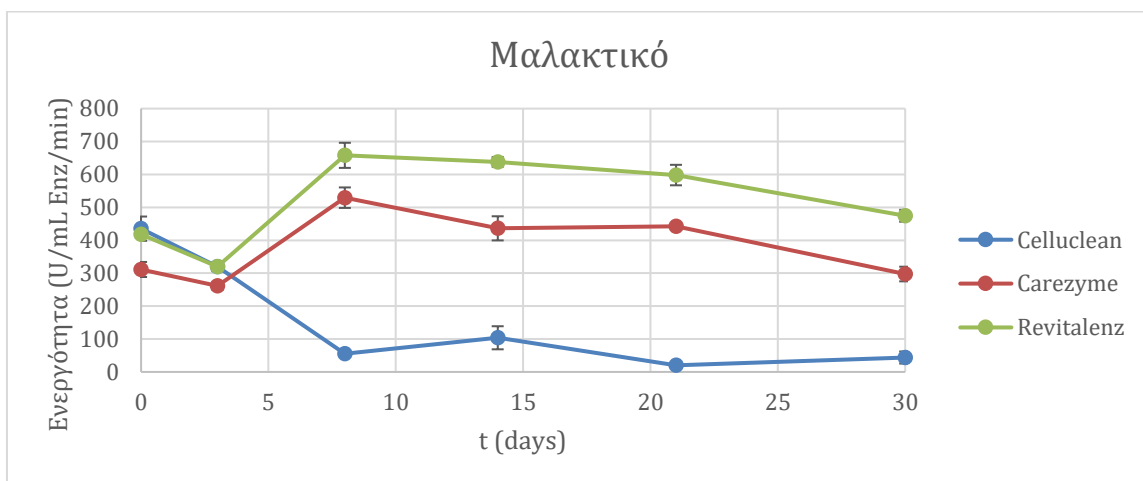
Εικόνα 4.8 Απεικόνιση της μείωσης ενεργότητας του ενζύμου Carezyme κατά την επώαση του στους 37°C σε απορρυπαντικό, μαλακτικό και νερό για ένα μήνα.



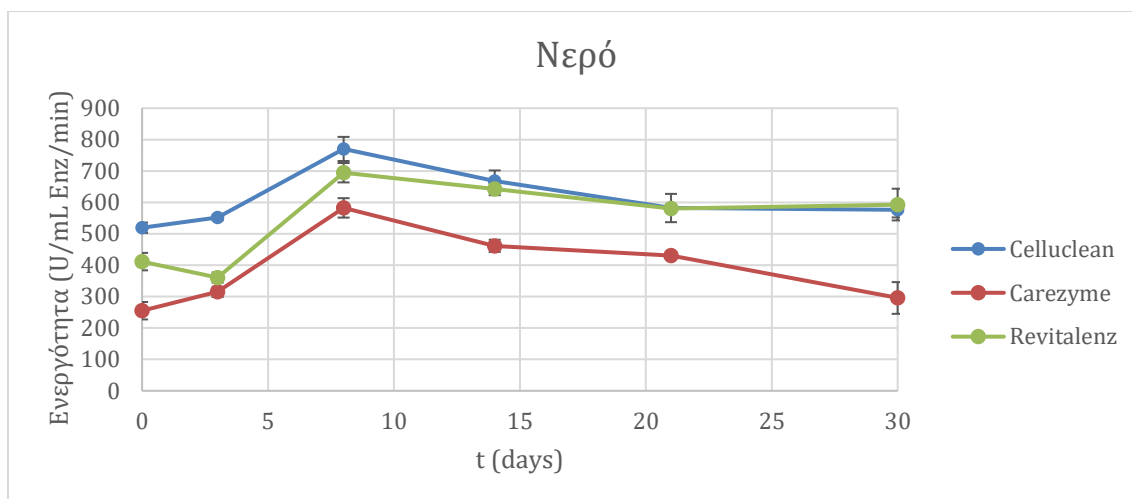
Εικόνα 4.9 Απεικόνιση της μείωσης ενεργότητας του ενζύμου Revitalenz κατά την επώαση του στους 37°C σε απορρυπαντικό, μαλακτικό και νερό για ένα μήνα.



Εικόνα 4.10 Σύγκριση των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz ως προς τη σταθερότητα τους στο απορρυπαντικό σε διάρκεια ενός μήνα.



Εικόνα 4.11 Σύγκριση των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz ως προς τη σταθερότητα τους στο μαλακτικό σε διάρκεια ενός μήνα.



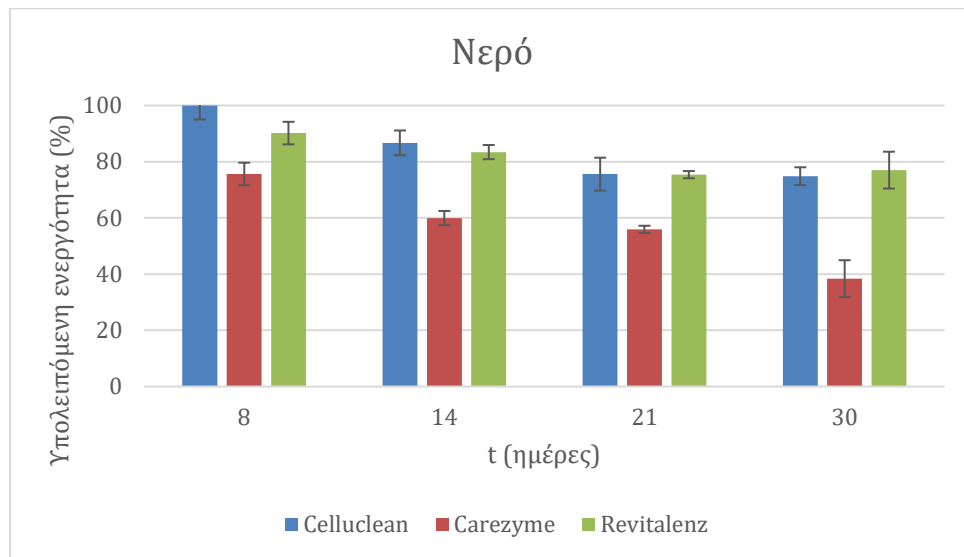
Εικόνα 4.12 Σύγκριση των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz ως προς τη σταθερότητα τους στο νερό σε διάρκεια ενός μήνα.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, οι μετρήσεις στις 2 πρώτες δειγματοληψίες, δηλαδή για $t=0$ και $t=3$ ημέρες δεν είναι αντιπροσωπευτικές, καθώς από τη μέτρηση που πραγματοποιήθηκε την 7^η μέρα δειγματοληψίας έγινε αντιληπτό ότι το υπόστρωμα CMC είχε μολυνθεί, παρότι είχε προστεθεί αζίδιο γι' αυτόν τον σκοπό. Η μόλυνση του υποστρώματος διαπιστώθηκε λόγω της μέτρησης αισθητά αυξημένων τιμών των αναγωγικών σακχάρων στο τυφλό διάλυμα που δεν ήταν αναμενόμενες. Επομένως, την 8^η μέρα του πειράματος παρασκευάστηκε νέο υπόστρωμα CMC, στο οποίο προστέθηκε αζίδιο, συσκευάστηκε αεροστεγώς και μεταφέρθηκε σε θάλαμο χαμηλής θερμοκρασίας (4°C). Ο κύκλος δειγματοληψίας συνεχίστηκε κανονικά, με χρήση του νέου υποστρώματος, για την εξαγωγή ποιοτικών συμπερασμάτων αναφορικά με τη σταθερότητα των ενζύμων στα απορρυπαντικά και τα μαλακτικά. Σημειώνεται ότι η εκτίμηση της σταθερότητας πραγματοποιήθηκε για το διάστημα από την 8^η μέρα μέχρι το τέλος της επώασης.

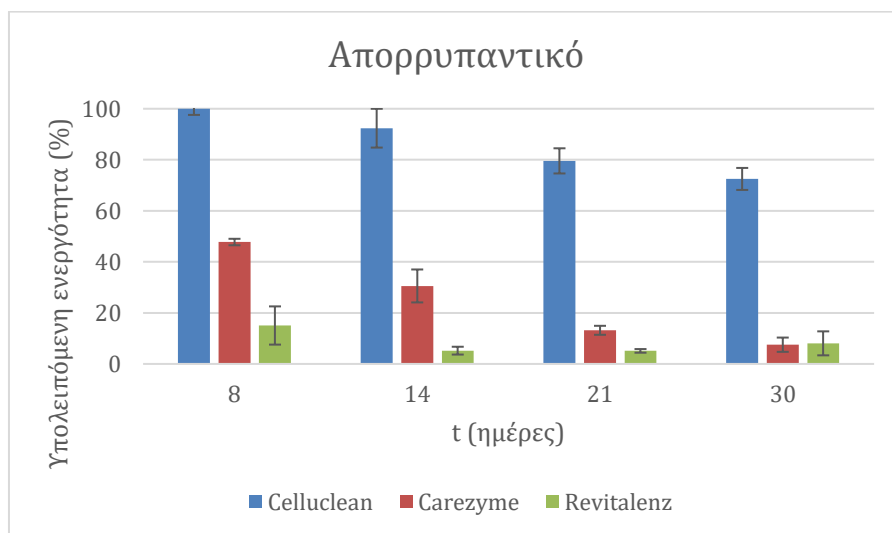
Από τα διαγράμματα είναι φανερό ότι υπάρχει μια αναμενόμενη πτώση της σταθερότητας των ενζύμων παρουσία απορρυπαντικού, μαλακτικού και νερού κατά τον ένα μήνα της επώασης τους σε θερμοκρασία 37°C . Το ένζυμο Celluclean παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα κατά την επώαση του για 30 μέρες (Εικόνα 4.7). Παρουσία απορρυπαντικού είναι πολύ δραστικό, ενώ παρουσία μαλακτικού η ενεργότητα του είναι εξαρχής σχεδόν μηδενική (55 Units/mL enz./min). Το ένζυμο Carezyme εμφανίζει μια μεγάλη μείωση στη σταθερότητα του κατά τη διάρκεια της επώασης. Προκύπτει, επίσης, ότι παρουσία μαλακτικού και νερού είναι πιο δραστικό, σε σύγκριση με την παρουσία απορρυπαντικού (Εικόνα 4.8). Το ένζυμο Revitalenz εμφανίζει υψηλές τιμές σταθερότητας στο μαλακτικό και το νερό κατά την επώαση (Εικόνα 4.9). Τα ένζυμα Carezyme και Revitalenz δεν είναι ιδιαίτερα δραστικά παρουσία απορρυπαντικού, ενώ μετά το πέρας της επώασης η δράση τους σχεδόν μηδενίζεται, 39 και 41 Units/mL enz./min, αντίστοιχα (Εικόνα 4.10).

Στη συνέχεια, για καλύτερη απεικόνιση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται η ποσοστιαία μείωση της ενεργότητας των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz κατά την πάροδο του χρόνου στο νερό, απορρυπαντικό και μαλακτικό. Σημειώνεται ότι οι δύο πρώτες μετρήσεις, για $t=0$ και $t=3$ ημέρες, στις οποίες το υπόστρωμα είχε μολυνθεί δεν περιλαμβάνονται στα διαγράμματα, οπότε ως πρώτη

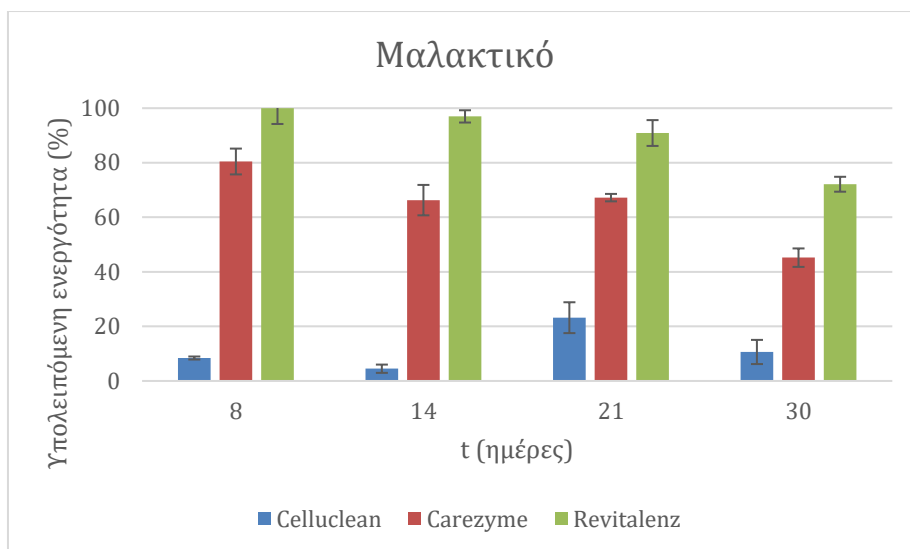
μέτρηση έχει θεωρεί η μέρα $t=8$. Ως 100% ενεργότητα έχει θεωρηθεί σε κάθε περίπτωση η μέγιστη όλων των μετρήσεων και οι υπολογισμοί έχουν πραγματοποιηθεί βάσει αυτής.



Εικόνα 4.13 Εκτίμηση σταθερότητας και ενεργότητας των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz παρουσία νερού κατόπιν χρόνου επώασης 30 ημερών σε θερμοκρασία 37°C.



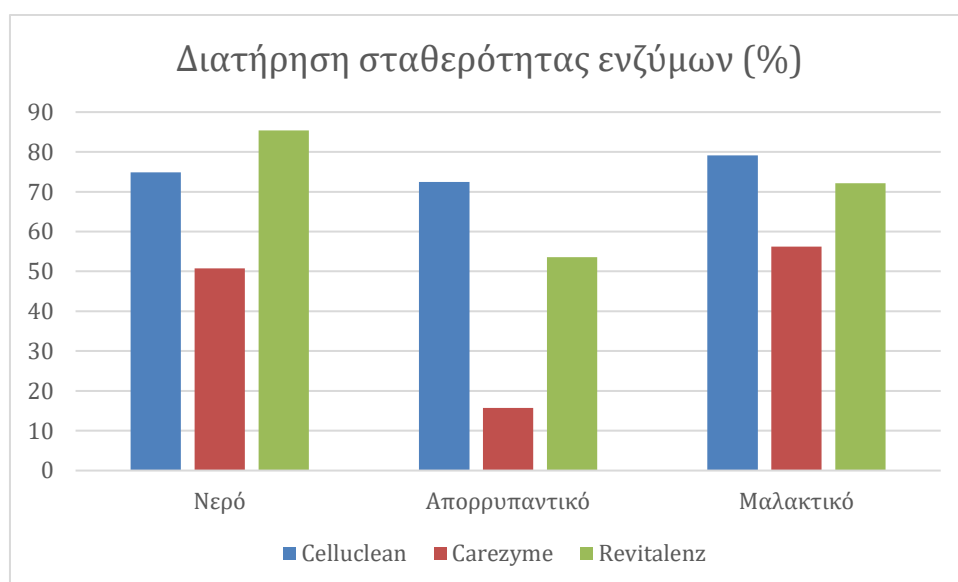
Εικόνα 4.14 Εκτίμηση σταθερότητας και ενεργότητας των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz παρουσία απορρυπαντικού κατόπιν χρόνου επώασης 30 ημερών σε θερμοκρασία 37°C.



Εικόνα 4.15 Εκτίμηση σταθερότητας και ενεργότητας των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz παρουσία μαλακτικού κατόπιν χρόνου επώασης 30 ημερών σε θερμοκρασία 37°C.

Παρουσία νερού, όπως αναμένεται, όλα τα ένζυμα εμφάνισαν υψηλές τιμές σταθερότητας που μειώθηκαν σταδιακά κατά την επώαση. Η ενεργότητα τους στο νερό καθόλη τη διάρκεια του ενός μήνα, με φθίνουσα σειρά ήταν η εξής: Celluclean>Revitalenz>Carezyme (Εικόνα 4.13). Από τα αποτελέσματα προκύπτει, ότι παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο Celluclean παρουσιάζει τη μέγιστη δράση, ενώ τα ένζυμα Carezyme και Revitalenz δεν είναι δραστικά (Εικόνα 4.14). Παρουσία μαλακτικού, το ένζυμο Revitalenz είναι πιο δραστικό, στη συνέχεια το Carezyme, ενώ το Celluclean δεν παρουσιάζει καμία δραστικότητα (Εικόνα 4.15).

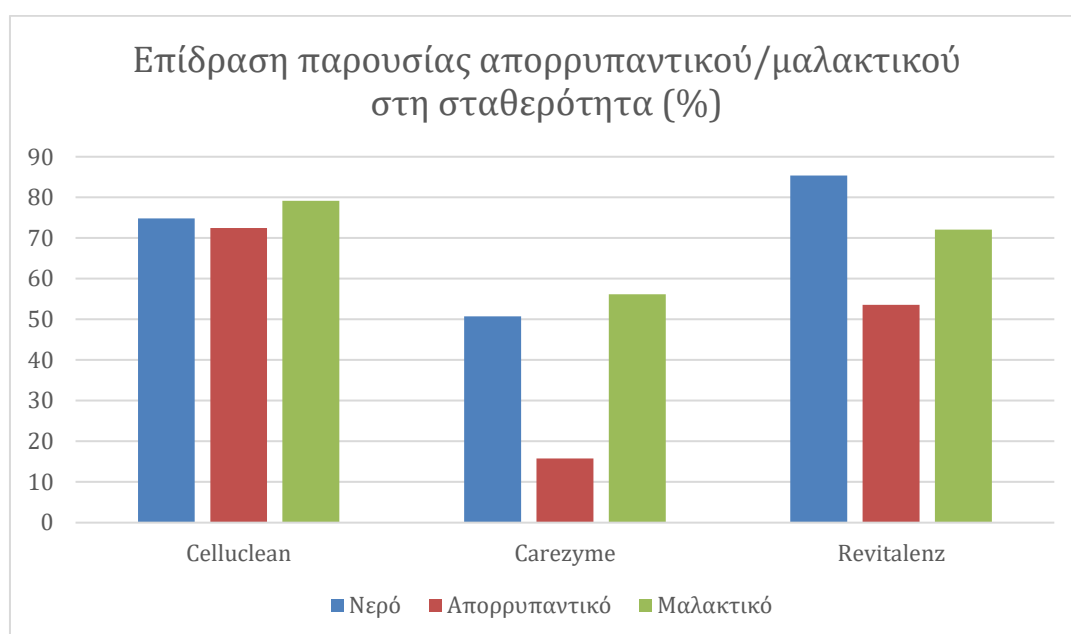
Στο παρακάτω συγκεντρωτικό διάγραμμα απεικονίζεται η ποσοστιαία διατήρηση της σταθερότητας των ενζύμων Celluclean, Carezyme, Revitalenz παρουσία απορρυπαντικού, μαλακτικού και νερού μετά από επώαση 30 ημερών σε θερμοκρασία 37°C.



Εικόνα 4.16 Ποσοστιαία διατήρηση της σταθερότητας των ενζύμων Celluclean, Carezyme, Revitalenz παρουσία απορρυπαντικού, μαλακτικού, νερού μετά από επώαση 30 ημερών στους 37°C.

Με βάση τις τιμές σταθερότητας των ενζύμων, προκύπτει ότι στο απορρυπαντικό το Celluclean είναι το πιο σταθερό ένζυμο διατηρώντας το 72% της ενεργότητας του, ενώ το Carezyme διατηρεί μόλις το 16% της αρχικής του δράσης μετά από 30 μέρες αποθήκευσης. Επίσης, η σταθερότητα του Revitalenz μειώνεται στο μισό παρουσία απορρυπαντικού (46%). Στο μαλακτικό τα ένζυμα Celluclean και Revitalenz εμφανίζουν περισσότερο από 70% σταθερότητα, ενώ η σταθερότητα του Carezyme μειώνεται σχεδόν στο μισό.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το ίδιο συγκεντρωτικό διάγραμμα, αλλά ως προς τα τρία ένζυμα, ώστε να προκύψει για κάθε ένζυμο ένα συμπέρασμα σχετικά με την επίδραση της παρουσίας του απορρυπαντικού και του μαλακτικού κατά την επώαση, λαμβάνοντας υπόψιν την μείωση της σταθερότητας του ενζύμου λόγω της αποθήκευσης του στο νερό για ένα μήνα.



Εικόνα 4.17 Ποσοστιαία διατήρηση της σταθερότητας των ενζύμων Celluclean, Carezyme, Revitalenz παρουσία απορρυπαντικού, μαλακτικού, νερού μετά από επώαση 30 ημερών στους 37°C, βάσει του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε (απορρυπαντικό, μαλακτικό, νερό).

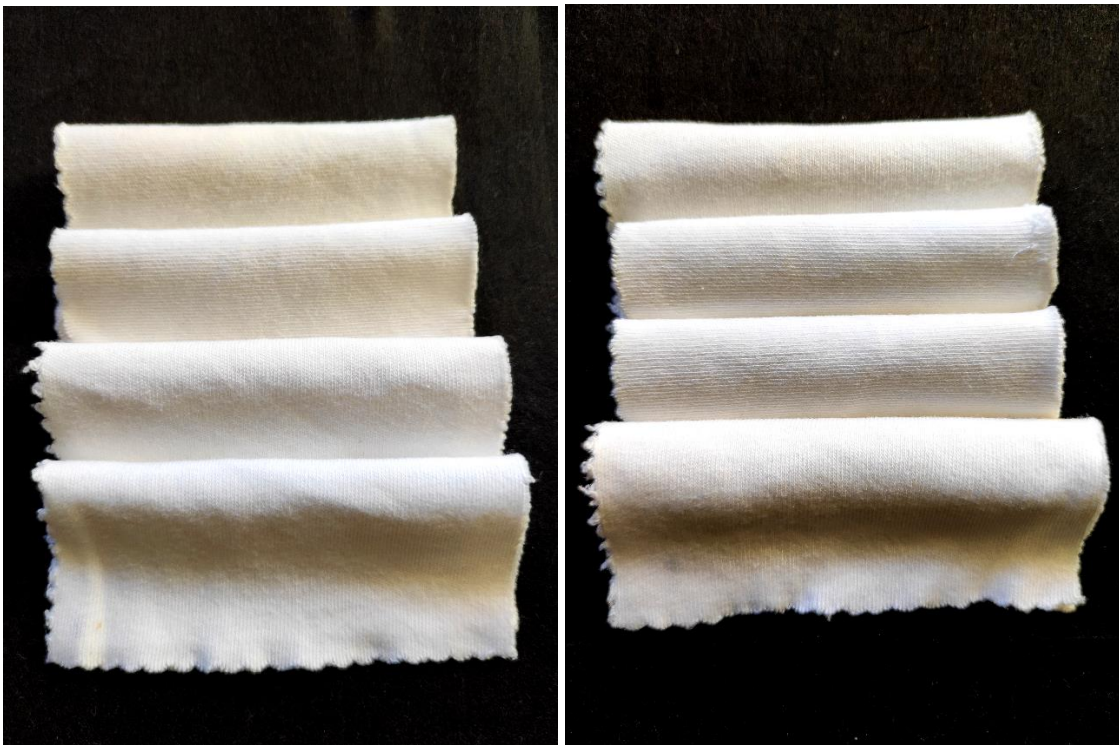
Από την παραπάνω εικόνα προκύπτει ότι το ένζυμο Celluclean είναι πάρα πολύ σταθερό και στα τρία μέσα επώασης, διατηρώντας περισσότερο από το 70% της ενεργότητας του, οπότε η επώαση σε απορρυπαντικό και μαλακτικό δεν επηρεάζει την σταθερότητα του. Η σταθερότητα του ενζύμου Carezyme ελαττώνεται κατά 50% περίπου παρουσία νερού και μαλακτικού, ενώ διατηρείται μόλις στο 16% σε απορρυπαντικό. Η διαφορά στη μείωση αποδίδεται στην παρουσία του απορρυπαντικού. Κατά τον ίδιο τρόπο, το Revitalenz διατηρείται κατά 54% και 72% σταθερό σε απορρυπαντικό και μαλακτικό, αντίστοιχα, ενώ στο νερό διατηρεί το 85% της ενεργότητας του. Η διαφορά στη σταθερότητα σε απορρυπαντικό και μαλακτικό σε σχέση με το νερό αποδίδεται στην επίδραση των καθαριστικών προϊόντων στην ενεργότητα του ενζύμου.

4.3 Εκτίμηση λευκότητας και αντιγήρανσης σε βαμβακερό ιματισμό μετά από πλύση με μαλακτικά με ένζυμα

4.3.1 Προσδιορισμός βελτίωσης της λευκότητας

4.3.1.1 Οπτικός Έλεγχος

Παρακάτω απεικονίζονται οι βαμβακεροί ιματισμοί μετά την πλύση τους με το αραιωμένο και συμπυκνωμένο μαλακτικό με κυτταρινάσες σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μαλακτικά απουσία ενζύμου.



Εικόνα 4.18 Βαμβακεροί ιματισμοί μετά την πλύση τους με συμπυκνωμένο μαλακτικό (αριστερά) και αραιωμένο μαλακτικό (δεξιά). Τα υφάσματα έχουν επεξεργαστεί με σειρά από πάνω προς τα κάτω: χωρίς ένζυμο (control), Celluclean, Carezyme, Revitalenz.

Από τον οπτικό έλεγχο των βαμβακερών ιματισμών προκύπτει πως δεν υπάρχει κάποια προφανής διαφορά στη λευκότητα των υφασμάτων που πλύθηκαν με μαλακτικά που περιείχαν ενζυμικά διαλύματα σχέση με αυτά που πλύθηκαν με μαλακτικά απουσία ενζύμου.

4.3.1.2 Μέτρηση χρώματος

Για την ποσοτική εκτίμηση της μεταβολής της λευκότητας των βαμβακερών ιματισμών που επεξεργάστηκαν με μαλακτικά με κυτταρινάσες σε σύγκριση με μαλακτικά απουσία ενζύμου,

μετρήθηκε το ολικό χρώμα των δειγμάτων. Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.6.3, η ολική μεταβολή του χρώματος ΔΕ προκύπτει από τις παραμέτρους L, a, b και την παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta E = \sqrt{((L-L_0)^2 + (a-a_0)^2 + (b-b_0)^2)}$$

Οι τιμές των παραμέτρων L, a, b που μετρήθηκαν, καθώς και ο υπολογισμός του ολικού χρώματος για κάθε δείγμα, για τα δύο είδη μαλακτικών, καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

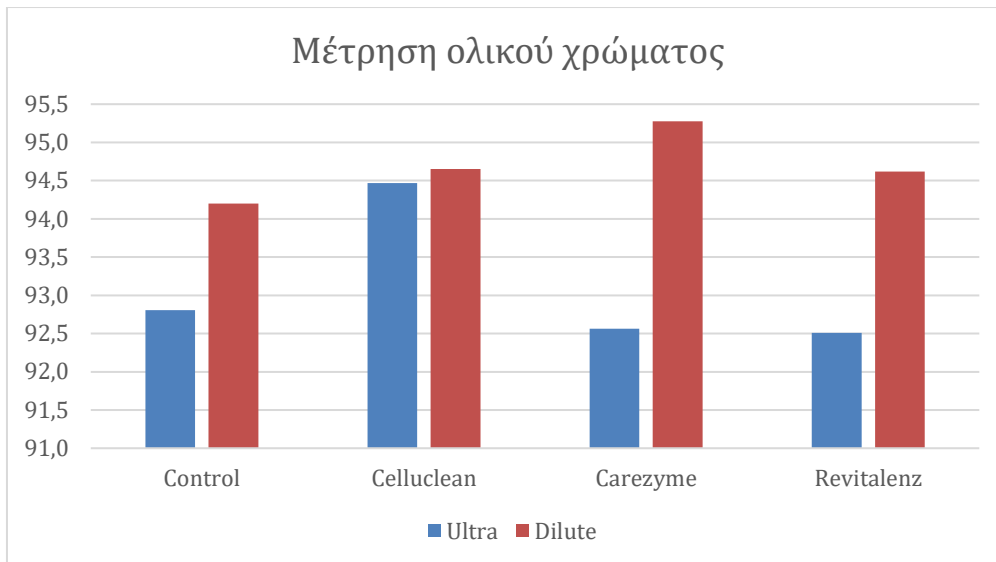
Πίνακας 4.4 Παράμετροι χρώματος υφασμάτων και μέτρηση ολικού χρώματος για το συμπυκνωμένο (Ultra) μαλακτικό

Ultra	Ένζυμο	L	a	b	ΔΕ
1	Control	92,65	-0,33	5,39	92,81
2	Celluclean	94,39	-0,19	3,85	94,47
3	Carezyme	92,41	-0,33	5,30	92,56
4	Revitalenz	92,34	-0,43	5,56	92,51

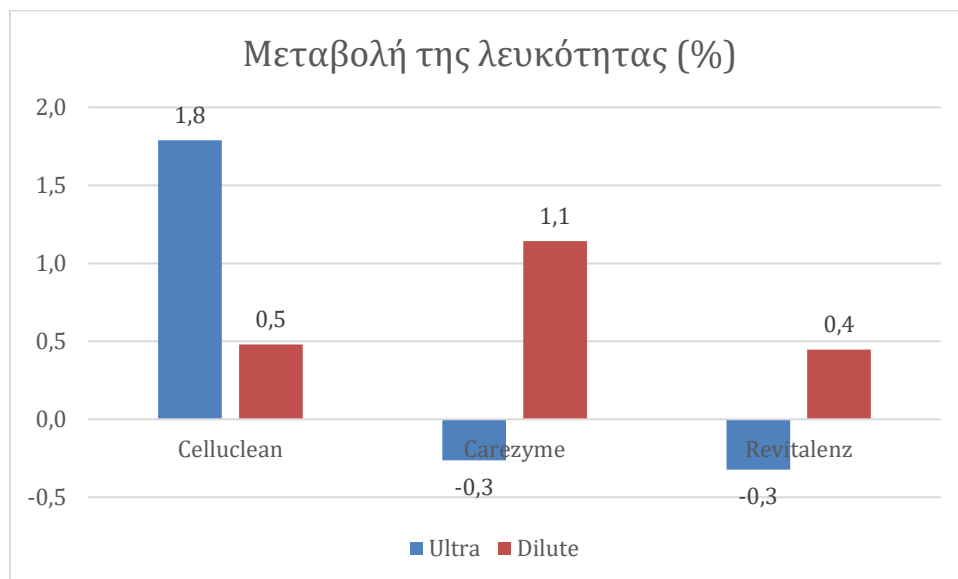
Πίνακας 4.5 Παράμετροι χρώματος υφασμάτων και μέτρηση ολικού χρώματος για το αραιωμένο (Dilute) μαλακτικό

Dilute	Ένζυμο	L	a	b	ΔΕ
5	Control	94,12	-0,23	3,84	94,20
6	Celluclean	94,60	-0,12	3,09	94,65
7	Carezyme	95,23	-0,07	2,95	95,28
8	Revitalenz	94,54	-0,20	3,87	94,62

Στην παρακάτω Εικόνα 4.19, παρουσιάζεται η μέτρηση του ολικού χρώματος όλων των δειγμάτων και για τα δύο μαλακτικά, ενώ στην Εικόνα 4.20 παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της λευκότητας των δειγμάτων μαλακτικού με ένζυμο σε σχέση με αυτά χωρίς ένζυμο (control). Σημειώνεται ότι για την εύρεση μεταβολής της λευκότητας τα διαλύματα μαλακτικού με ένζυμο συγκρίνονται με το αντίστοιχο διάλυμα μαλακτικού χωρίς ένζυμο.



Εικόνα 4.19 Μέτρηση ολικού χρώματος των αραιωμένων (Dilute) και συμπυκνωμένων (Ultra) μαλακτικών, απουσία ενζύμου (control) ή με τα ένζυμα Celluclean, Carezyme ή Revitalenz.



Εικόνα 4.20 Ποσοστιαία μεταβολή της λευκότητας των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν με τα ένζυμα Celluclean, Carezyme, Revitalenz σε αραιωμένο (Dilute) ή συμπυκνωμένο (Ultra) μαλακτικό σε σχέση με αυτό απουσία ενζύμου (δεν αναγράφεται).

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 4.19, στο σύνολο τους τα βαμβακερά τεμάχια τα οποία επεξεργάστηκαν με μαλακτικό με περιεκτικότητα 3% κατιονικά (Dilute) και 0.2% αραιωμένο ένζυμο είναι πιο λευκά σε σχέση με αυτά που επεξεργάστηκαν με συμπυκνωμένο μαλακτικό (8% κατιονικά, Ultra) και 0.2% αραιωμένο ένζυμο. Επίσης, αναφορικά με τα τεμάχια που επεξεργάστηκαν απουσία ενζύμου (τεμάχια ελέγχου), το τεμάχιο που επεξεργάστηκε με το συμπυκνωμένο μαλακτικό ήταν κατά 2% περίπου πιο λευκό από το τεμάχιο ελέγχου του αραιωμένου μαλακτικού.

Στην εικόνα 4.20, παρουσιάζεται η επί τις εκατό μεταβολή της λευκότητας για το κάθε διάλυμα μαλακτικού με ένζυμο σε σύγκριση με το αντίστοιχο μαλακτικό χωρίς ένζυμο. Για τα δείγματα που αναφέρονται στο αραιωμένο μαλακτικό, προκύπτει ότι και τα τρία ένζυμα ενισχύουν ελαφρώς την λευκότητα, σε ποσοστό 0-1.5%. Ειδικά το μαλακτικό με αραιωμένο Carezyme, βελτιώνει την λευκότητα κατά 1.14%, ενώ τα μαλακτικά με Celluclean και Revitalenz κατά 0.5%. Αναφορικά με το συμπυκνωμένο μαλακτικό (Ultra), τα δείγματα που περιείχαν τα ένζυμα Carezyme και Revitalenz, φαίνεται όχι μόνο να μη συνεισφέρουν στη βελτίωση της λευκότητας των υφασμάτων, αλλά οριακά να έχουν αρνητική επίδραση σε αυτήν, καθώς μειώνεται κατά 0.26% και 0.32%, αντίστοιχα. Αντίθετα, η δράση του ενζύμου Celluclean στο μαλακτικό προκύπτει από τα αποτελέσματα ότι βελτιώνει τη λευκότητα κατά 1.8%.

4.3.2 Προσδιορισμός βελτίωσης της αντιγήρανσης

Παρακάτω απεικονίζονται οι βαμβακεροί ιματισμοί μετά την πλύση τους με το αραιωμένο και συμπυκνωμένο μαλακτικό με κυτταρινάσες σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μαλακτικά απουσία ενζύμου. Σημειώνεται πως αριστερά απεικονίζεται το ύφασμα που πλύθηκε με μαλακτικό χωρίς ένζυμο, ενώ κάτω το ύφασμα που πλύθηκε με μαλακτικό που περιείχε ενζυμικό διάλυμα.



Εικόνα 4.21 Βαμβακεροί ιματισμοί μετά την πλύση τους με συμπυκνωμένο μαλακτικό. Αριστερά: Χωρίς ένζυμο, Κάτω (με σειρά): Celluclean, Carezyme, Revitalenz.



Εικόνα 4.22 Βαμβακεροί ιματισμοί μετά την πλύση τους με αραιωμένο μαλακτικό. Αριστερά: Χωρίς ένζυμο, Κάτω (με σειρά): Celluclean, Carezyme, Revitalenz.

Από τον οπτικό έλεγχο των βαμβακερών ματισμών προκύπτει πως δεν υπάρχει κάποια προφανής διαφορά στην επιφάνεια των υφασμάτων που πλύθηκαν με μαλακτικά που περιείχαν ενζυμικά διαλύματα σχέση με αυτά που πλύθηκαν με μαλακτικά απουσία ενζύμου.

5. Συμπεράσματα & Συζήτηση

5.1 Καθορισμός συνθηκών του πειράματος

5.1.1 Επίδραση pH στην ενεργότητα των ενζύμων

Όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 4.1.1, ως βέλτιστα pH για τα ένζυμα Celluclean, Carezyme και Revitalenz προέκυψαν οι τιμές 7, 7 και 5, αντίστοιχα, στο εύρος τιμών pH 5-9 που διερευνήθηκε. Ωστόσο, οι οικιακές πλύσεις πραγματοποιούνται σε αλκαλικές συνθήκες, οπότε τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στη σύσταση των καθαριστικών προϊόντων πρέπει να είναι σταθερά και αποτελεσματικά σε αλκαλικό pH. Σε αλκαλικές συνθήκες, το Carezyme εμφανίζει υπολειπόμενη ενεργότητα κάτω από 70%, ενώ τα ένζυμα Celluclean και Revitalenz 30-20% της μέγιστης. Μάλιστα, για το ένζυμο Revitalenz, η αποτελεσματικότητά του, σε αλκαλικές συνθήκες, μπορεί να είναι ακόμα μικρότερη της μέγιστης, από όσο αναφέρθηκε, καθώς ως μέγιστη ενεργότητα θεωρήθηκε αυτή σε pH 5, ενώ ενδεχομένως να εμφανίζει βέλτιστη δράση σε μικρότερο pH εκτός του εύρους τιμών που εξετάστηκε.

5.1.2 Εξειδίκευση υποστρώματος

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, το εμπορικό ενζυμικό μίγμα Celluclean έχει δράση ενδοκυτταρινάσης, το Revitalenz εξωκυτταρινάσης, ενώ το Carezyme διαθέτει και ένδο και έξω δράση. Από τα πειράματα που διεξήχθησαν προέκυψε ότι και τα τρία ένζυμα παρουσίασαν μεγαλύτερη εξειδίκευση υποστρώματος με το CMC, σε σχέση με το Filter Paper. Το αποτέλεσμα, αυτό, είναι αναμενόμενο για τα ενζυμικά μίγματα Celluclean και Revitalenz που περιέχουν μόνο ενδοκυτταρινάση και εξωκυτταρινάση, αντίστοιχα, καθώς το filter paper υδρολύεται πιο δύσκολα από το CMC. Το Carezyme, ωστόσο, που περιέχει και τα δύο είδη κυτταρινασών εμφάνισε μικρότερη εξειδίκευση με το filter paper σε σύγκριση με το Revitalenz, αλλά και μικρότερη εξειδίκευση με το CMC και από τα δύο ένζυμα, επομένως συμπεραίνεται ότι δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό ενζυμικό μίγμα.

Σχετικά, με τη χρήση Filter Paper ως υποστρώματος, για τον προσδιορισμό της ολικής ενεργότητας των κυτταρινασών προέκυψε από την παράγραφο 4.1.2, ότι μόνο το ένζυμο Revitalenz παρουσίασε κάποια εξειδίκευση με το υπόστρωμα αν και μικρή, ενώ το Carezyme και ιδιαίτερα το Celluclean παρουσίασαν μηδενικές ενεργότητες. Σε παρόμοιο αποτέλεσμα έχουν καταλήξει και άλλες έρευνες. Για παράδειγμα, η ενδογλουκανάση από το στέλεχος HZN11 του *Trichoderma harzianum* παρουσίασε μεγαλύτερη εξειδίκευση υποστρώματος με το CMC σε σχέση με το Filter Paper [77], ενώ η ενδογλουκανάση από τον *D. eschscholzii* αποικοδόμησε το διηθητικό χαρτί με περίπου το 25.3% της δράσης σε σύγκριση με την υδρόλυση του CMC (100%) [125].

5.1.3 Προσδιορισμός ολικής ενεργότητας κυτταρινασών με υπόστρωμα Filter Paper

Όπως προέκυψε από το διάγραμμα της γραφικής απεικόνισης της ενεργότητας σε Filter Paper Units των τριών ενζύμων (Εικόνα 4.2), μόνο το ένζυμο Revitalenz παρουσίασε εξειδίκευση με το διηθητικό χαρτί. Αντίθετα, το Carezyme και ιδιαίτερα το Celluclean παρουσίασαν μηδενικές ενεργότητες, για 0.1-1% v/v συγκέντρωση του ενζύμου και χρόνο επώασης της αντίδρασης έως και τρεις ώρες σε θερμοκρασία 50°C. Μάλιστα, το ένζυμο Celluclean εμφάνισε ενεργότητα κάτω από 1 FPU σε όλες τις δειγματοληψίες. Το αποτέλεσμα αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι το ενζυμικό παρασκεύασμα περιέχει ενδογλουκανάση, επομένως υδρολύει πιο δύσκολα ένα υπόστρωμα σαν το Filter Paper.

Ωστόσο, η μέτρηση της ολικής ενεργότητας με χρήση διηθητικού χαρτιού δεν ήταν δυνατή ούτε για το ένζυμο Revitalenz. Στις συνθήκες που περιεγράφηκαν στην παράγραφο 3.2.4.3, δηλαδή σε συγκέντρωση ενζύμου 0.13% v/v (750 φορές αραιώση) παρουσία απορρυπαντικού ή μαλακτικού (1.2 % v/v) και για χρόνο επώασης της αντίδρασης 3 ώρες στους 50°C, το δείγμα προς φωτομέτρηση εμφάνισε θολερότητα λόγω της σύστασης και γαλακτώδους φύσης του απορρυπαντικού και του μαλακτικού, οπότε η μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων δε θεωρήθηκε αποδεκτή. Για τη χρήση της μεθόδου, απαιτούνται μεγαλύτερες αραιώσεις του απορρυπαντικού και του μαλακτικού, επομένως μικρότερη τελική συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα, η οποία, όμως, δίνει πολύ μικρές απορροφήσεις, στις οποίες δεν μπορούν να διακριθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους και άρα δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σωστά η μέτρηση. Επομένως, συνάγεται το συμπέρασμα, ότι δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος Filter Paper για τη μέτρηση της ολικής ενεργότητας των ενζύμων παρουσία απορρυπαντικού και μαλακτικού.

5.1.4 Προσδιορισμός ενεργότητας ενδογλουκανάσης με υπόστρωμα CMC

Ο προσδιορισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης του απορρυπαντικού και του μαλακτικού στο διάλυμα της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με χρήση υποστρώματος CMC. Από τις περιεκτικότητες που διερευνήθηκαν (1%, 10% και 100% v/v) καμία δεν κρίθηκε κατάλληλη, καθώς τα δείγματα προς φωτομέτρηση παρουσίαζαν θολερότητα, επομένως η μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων παρουσίαζε πάρα πολλά σφάλματα.

Αναλυτικά, το πρόβλημα που αντιμετωπίστηκε ήταν το εξής. Για σχετικά μικρές αραιώσεις απορρυπαντικού και μαλακτικού (μέχρι 100 φορές), το απορρυπαντικό εμφάνιζε θολερότητα, ενώ το μαλακτικό δημιουργούσε στερεά στο διάλυμα, λόγω της γαλακτώδους φύσης τους. Οπότε, οι μετρήσεις της απορρόφησης δε θεωρήθηκαν αποδεκτές, ακόμη και με αφαίρεση των τυφλών δειγμάτων. Το φιλτράρισμα των διαλυμάτων, επίσης, δεν συνέβαλε στην υπερνίκηση του προβλήματος. Επομένως, απαιτήθηκαν πολύ μεγάλες αραιώσεις του απορρυπαντικού και του μαλακτικού, ώστε το διάλυμα να είναι διαυγές.

Από την άλλη, η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας προκύπτει μέσα από τη μέτρηση της απορρόφησης, η οποία, στη συνέχεια, ανάγεται σε ενεργότητα μέσω της καμπύλης αναφοράς. Κατά το πείραμα, προσδιορίζεται η σταθερότητα των ενζύμων στα απορρυπαντικά και τα μαλακτικά σε περίοδο ενός μήνα, επομένως αναμένεται η πιθανή μείωση της απορρόφησης/ενεργότητας. Ως εκ τούτου, η μέτρηση της απορρόφησης σε χρόνο $t=0$ δεν πρέπει να είναι πολύ χαμηλή, ώστε να μην παρουσιάζει μεγάλα σφάλματα και ταυτόχρονα να υπάρχει ένα περιθώριο πτώσης.

Για το λόγο αυτό, το ένζυμο αραιώθηκε, τελικά, σε απορρυπαντικό, μαλακτικό και νερό σε αναλογία 1:4 και αφήθηκε να επωάζεται στους 37°, για ένα μήνα. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες στα διαστήματα που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 3.2.4.4, στις οποίες τα ενζυμικά διαλύματα υπέστησαν 3 διαδοχικές αραιώσεις σε νερό, ώστε η τελική αραιώση του ενζύμου να προκύπτει 1:1200 (0.083% v/v). Έτσι, το απορρυπαντικό και το μαλακτικό αραιώνονται αρκετά προκειμένου να είναι διαυγές το δείγμα προς φωτομέτρηση και οι τιμές της απορρόφησης βρίσκονται εντός της γραμμικής περιοχής του DNS.

5.2 Μελέτη σταθερότητας ενζύμων παρουσία εμπορικού απορρυπαντικού ή μαλακτικού

Για την προσθήκη ενός ενζύμου στην σύσταση ενός εμπορικού απορρυπαντικού ή μαλακτικού είναι απαραίτητο το ένζυμο να παρουσιάζει συμβατότητα, δηλαδή δραστικότητα και σταθερότητα, με τα υπόλοιπα συστατικά του προϊόντος. Η διερεύνηση της σταθερότητας των ενζύμων Celluclean, Carezyme και Revitalenz παρουσία απορρυπαντικού, μαλακτικού, νερού πραγματοποιήθηκε για 30 μέρες σε θερμοκρασία επώασης 37°C. Οι συνθήκες, αυτές, προσομοιάζουν τις συνθήκες οικιακής πλύσης των ρούχων για την περίοδο ενός χρόνου.

Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα σταθερότητας των τριών ενζύμων (Εικόνες 4.7-4.9), τα ένζυμα είναι, κατά βάση, πιο ενεργά στο νερό από ότι παρουσία απορρυπαντικού και μαλακτικού. Αυτό υποδεικνύει, ότι τα συστατικά της σύνθεσης των απορρυπαντικών και μαλακτικών, πιθανόν αναστέλλουν τη δράση και επηρεάζουν τη σταθερότητα των ενζύμων. Ένας, ακόμη, παράγοντας που πιθανόν αναστέλλει την δράση των ενζύμων είναι το pH. Από τη διερεύνηση του βέλτιστου pH του κάθε ενζύμου, που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.1.1, προέκυψε ότι το Celluclean και το Carezyme είναι πιο δραστικά σε ουδέτερες συνθήκες, ενώ το Revitalenz σε ουδέτερες προς όξινες συνθήκες (pH 5). Στην παρούσα διπλωματική εργασία, το εμπορικό απορρυπαντικό που χρησιμοποιήθηκε είχε pH 8.3, ενώ το εμπορικό μαλακτικό pH 2.4, οπότε η μειωμένη δράση των ενζύμων πιθανόν να οφείλεται στην αδρανοποίηση τους στο βασικό ή το ιδιαίτερα όξινο περιβάλλον, αντίστοιχα.

Για να προκύψει ένα συμπέρασμα σχετικά με την επίδραση της σύστασης του απορρυπαντικού και του μαλακτικού στην ενεργότητα και τη σταθερότητα των ενζύμων, πρέπει να ληφθεί υπόψη η συμπεριφορά του ενζύμου κατά την αποθήκευση του στο νερό. Από την Εικόνα 4.13, προκύπτει ότι απουσία απορρυπαντικού και μαλακτικού, τα ένζυμα με φθίνουσα σειρά δραστικότητας είναι ως εξής: Celluclean>Revitalenz>Carezyme, ενώ με βάση τη σταθερότητα στο νερό, ως εξής Revitalenz>Celluclean>Carezyme (Εικόνα 4.16). Από την Εικόνα 4.17 προκύπτει ότι το ένζυμο Celluclean παρουσίασε εξαιρετική σταθερότητα, μετά από ένα μήνα αποθήκευσης στους 37°C, ανεξαρτήτως του μέσου στο οποίο επωάστηκε. Διατήρησε το 79% της αρχικής του ενεργότητας στο μαλακτικό, το 75% στο νερό και το 73% στο απορρυπαντικό. Ωστόσο, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.15, παρότι το Celluclean είναι πάρα πολύ σταθερό στο μαλακτικό δεν είναι καθόλου δραστικό, πιθανόν λόγω του όξινου περιβάλλοντος, ενώ στο απορρυπαντικό είναι ταυτόχρονα ιδιαίτερα δραστικό και σταθερό. Το ένζυμο Carezyme εμφανίζει ικανοποιητική σταθερότητα στο μαλακτικό και το νερό, καθώς διατηρεί το 56% και 51% της αρχικής του ενεργότητας, αντίστοιχα (Εικόνα 4.17). Παρουσία απορρυπαντικού, όμως, διατηρεί μόλις το 16% της αρχικής του ενεργότητας, που υποδεικνύει ότι το απορρυπαντικό περιέχει συστατικά που αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου Carezyme. Επίσης, από τις Εικόνες 4.14 και 4.15 προκύπτει ότι η δραστικότητα του Carezyme είναι

ικανοποιητική στο μαλακτικό, ενώ στο απορρυπαντικό είναι αρκετά χαμηλή και ελαττώνεται περαιτέρω κατά την επώαση. Το Revitalenz εμφανίζει, γενικά, ικανοποιητική σταθερότητα, καθώς διατηρεί το 85% και 72% της αρχικής του ενεργότητας στο νερό και το μαλακτικό, αντίστοιχα, ενώ το 54% στο απορρυπαντικό (Εικόνα 4.17). Η διαφορά της σταθερότητας στο μαλακτικό, αλλά κυρίως στο απορρυπαντικό σε σύγκριση με το νερό αποδίδεται στην επίδραση του εμπορικού απορρυπαντικού και μαλακτικού. Από την Εικόνα 4.14 προκύπτει ότι παρουσία απορρυπαντικού δεν είναι καθόλου δραστικό, ενώ παράλληλα χάνει τη μισή από την αρχική του ενεργότητα μετά από ένα μήνα. Η μείωση, αυτή, αποδίδεται στην αδρανοποίηση του σε βασικές συνθήκες λόγω του απορρυπαντικού. Στο μαλακτικό, από την άλλη είναι εξίσου αποτελεσματικό όσο και στο νερό (Εικόνα 4.9) και ταυτόχρονα χάνει μόλις το 28% της αρχικής του ενεργότητας μετά από 30 μέρες αποθήκευσης.

Συνοπτικά, από τις Εικόνες 4.7, 4.14 και 4.17 προκύπτει ότι παρουσία απορρυπαντικού αναστέλλεται, σε μικρό βαθμό, η δράση του ενζύμου Celluclean, το οποίο όμως συνεχίζει να είναι αρκετά αποτελεσματικό και δεν επηρεάζεται η σταθερότητα του. Μειώνεται σε μεγάλο βαθμό η δραστηριότητα του ενζύμου Carezyme, καθώς και η σταθερότητα του (Εικόνες 4.8, 4.14, 4.17). Η μείωση, αυτή, πιθανόν οφείλεται στην επίδραση των συστατικών του εμπορικού απορρυπαντικού. Η δραστηριότητα του ενζύμου Revitalenz μειώνεται εξαιρετικά παρουσία απορρυπαντικού, ενώ η σταθερότητα, επίσης, μειώνεται σε μεγάλο βαθμό (Εικόνες 4.9, 4.14, 4.17). Η πολύ μικρή, σχεδόν μηδενική, δραστηριότητα του ενζύμου Revitalenz παρουσία απορρυπαντικού, πιθανόν να οφείλεται στην αδρανοποίηση του σε υψηλότερα pH, λόγω του αλκαλικού περιβάλλοντος του απορρυπαντικού (pH 8.3), καθώς το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε όξινες συνθήκες. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και άλλες έρευνες. Η ενεργότητα της ενδογλουκανάσης από τον *Thermoascus aurantiacus*, που παρουσιάζει βέλτιστο pH στο 4.0, μειώθηκε κατά 40% μετά από επώαση μιας ώρας με απορρυπαντικό σε αλκαλικές συνθήκες λόγω της απενεργοποίησης της σε υψηλότερα pH εξαιτίας της παρουσίας του απορρυπαντικού [82]. Η παρουσία μαλακτικού αναστέλλει τελείως τη δράση του Celluclean, αλλά δεν έχει επίδραση στη σταθερότητα του ενζύμου (Εικόνες 4.7, 4.15, 4.17). Η μειωμένη δραστηριότητα της κυτταρινάσης Celluclean παρουσία μαλακτικού πολύ πιθανόν να οφείλεται στην αδρανοποίηση της στο ιδιαίτερα όξινο περιβάλλον του μαλακτικού (pH 2.4), καθώς το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε pH 6.0. Από τις Εικόνες 4.8 και 4.17 προκύπτει ότι το μαλακτικό δεν επιδρά αρνητικά στην δραστηριότητα και τη σταθερότητα του Carezyme. Δεν επηρεάζει, επίσης, τη δραστηριότητα του Revitalenz, αλλά επηρεάζει αρνητικά σε μικρό βαθμό τη σταθερότητα του ενζύμου (Εικόνες 4.9, 4.17).

Τελικά, ως προς τη συμβατότητα των ενζύμων με τη σύνθεση των καθαριστικών προϊόντων ρούχων προκύπτει από τις Εικόνες 4.14 και 4.15, ότι ενδείκνυται η προσθήκη της ενδογλουκανάσης Celluclean στη σύσταση του απορρυπαντικού, και η προσθήκη των ενζύμων Carezyme και Revitalenz στη σύσταση του μαλακτικού, με το δεύτερο να είναι πιο δραστικό από το πρώτο.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν ενζυμικά παρασκευάσματα κυτταρινάσης που χρησιμοποιούνται ήδη στη βιομηχανία των απορρυπαντικών. Αυτό σημαίνει ότι ορισμένα από τα ένζυμα, όπως για παράδειγμα η κυτταρινάση Celluclean διαθέτουν τις κατάλληλες ιδιότητες για τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Τέτοιες ενδεχομένως είναι η σταθερότητα και η αποτελεσματικότητα σε αλκαλικές συνθήκες. Όμως, τα μαλακτικά προϊόντα, συνήθως έχουν όξινο pH, επομένως είναι απαραίτητη η χρήση ενζύμων με τις επιθυμητές ιδιότητες και χαρακτηριστικά, ώστε να είναι συμβατά στις διαφορετικές συνθήκες των μαλακτικών.

Επίσης, για την πιο ακριβή εκτίμηση της σταθερότητας των ενζύμων παρουσία εμπορικού απορρυπαντικού θα έπρεπε προηγουμένως να είχαν απενεργοποιηθεί τα υπάρχοντα ένζυμα (<0.04% v/v) της σύστασης του προϊόντος με θερμική επεξεργασία του απορρυπαντικού στους 100°C για 15-30 λεπτά, όπως πραγματοποιήθηκε σε παρεμφερείς έρευνες σταθερότητας των ενζύμων σε απορρυπαντικά. Για τον έλεγχο της σταθερότητας της κυτταρινάσης από τον *Bacillus* SMIA-2 παρουσία απορρυπαντικού, το διάλυμα απορρυπαντικού αρχικά θερμάνθηκε στους 100°C για 15 λεπτά για την απενεργοποίηση των ενζύμων που ενδεχομένως υπήρχαν στη σύσταση των απορρυπαντικών [80]. Αντίστοιχα, για τη μελέτη σταθερότητας της κερατινάσης από τον *Bacillus* CSK2 σε απορρυπαντικό, το εμπορικό απορρυπαντικό υπέστη θερμική επεξεργασία στους 100°C για 30 λεπτά [122].

5.3 Εκτίμηση λευκότητας και αντιγήρανσης σε βαμβακερό ιματισμό μετά από πλύση με μαλακτικά με ένζυμα

Από την Εικόνα 4.19 της μέτρησης του ολικού χρώματος των μαλακτικών με ένζυμα προέκυψε ότι στο σύνολο τους τα βαμβακερά υφάσματα τα οποία επεξεργάστηκαν με αραιωμένο μαλακτικό περιεκτικότητας 3% σε κατιονικά (Dilute) και 0.2% αραιωμένο ένζυμο είναι πιο λευκά σε σχέση με αυτά που επεξεργάστηκαν με συμπυκνωμένο μαλακτικό περιεκτικότητας 8% σε κατιονικά (Ultra) και 0.2% αραιωμένο ένζυμο. Αυτό, κατά βάση, οφείλεται στο γεγονός ότι το βαμβακερό ύφασμα που πλύθηκε μόνο με αραιωμένο μαλακτικό, απουσία ενζύμου ήταν κατά 2% πιο λευκό από το αντίστοιχο που πλύθηκε με συμπυκνωμένο μαλακτικό. Επίσης, οι κατιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες, αναστέλλουν, γενικά, τη δράση των ενζύμων, οπότε είναι πιθανό καλύτερη δράση να εμφανίζει το μαλακτικό με ένζυμο με μικρότερη περιεκτικότητα σε επιφανειοδραστικές ουσίες.

Από το διάγραμμα 4.20 φαίνεται ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές αλλαγές στη λευκότητα των βαμβακερών ιματισμών που πλύθηκαν με μαλακτικό με ένζυμο σε σύγκριση με αυτά χωρίς ένζυμο, καθώς οι μεταβολές της λευκότητας ανήκουν στο εύρος 0-2% για τα τρία ένζυμα και για τα δύο είδη μαλακτικών. Από την επεξεργασία των υφασμάτων με συμπυκνωμένο μαλακτικό προέκυψε μείωση της λευκότητας κατά 0.3% για τα ένζυμα Carezyme και Revitalenz σε σύγκριση με τα υφάσματα ελέγχου, η οποία μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα. Με χρήση του ενζύμου Celluclean, παρατηρήθηκε μια αύξηση στη λευκότητα κατά 1.8%. Όμως, σε συνδυασμό με την προηγούμενη παράγραφο από την οποία προέκυψε ότι παρουσία μαλακτικού η δράση της ενδογλουκανάσης Celluclean αναστέλλεται εξαιρετικά, είναι πιθανό η μέτρηση αυτή να είναι λανθασμένη. Τα υφάσματα που επεξεργάστηκαν με κυτταρινάσες σε αραιωμένο μαλακτικό παρουσίασαν μια βελτίωση της λευκότητας της τάξης του 0-1.5%. Συγκεκριμένα, προέκυψε βελτίωση κατά 0.5% λόγω Celluclean, 1.1% λόγω Carezyme και 0.4% λόγω Revitalenz σε αραιωμένο μαλακτικό.

Προκύπτει, επομένως, ότι οι μεταβολές στη λευκότητα των βαμβακερών ιματισμών είναι πολύ μικρές. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.6.2 για την εκτίμηση της λευκότητας των υφασμάτων, τα υφάσματα πλύθηκαν μόνο μια φορά με το μαλακτικό με ένζυμο σε περιεκτικότητα 0.2% v/v για 50 λεπτά. Αντίστοιχες πειραματικές έρευνες έχουν δείξει ότι οι θετικές επιδράσεις του ενζύμου στο ύφασμα είναι πιο έντονες μετά από επαναλαμβανόμενες σύντομες πλύσεις με το ένζυμο και όχι με μία μόνο πλύση μεγαλύτερης διάρκειας. Συγκεκριμένα, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την εκτίμηση της βελτίωσης της ικανότητας καθαρισμού υφασμάτων μετά την επεξεργασία τους με

κυτταρινάσες προέκυψε ότι μετά από 4 κύκλους πλύσης, η επίδραση του πλυσίματος στα υφάσματα ήταν θετική με 4.33% και 5.44% βελτίωση της καθαριότητας για συγκέντρωση ενζύμου 0.12 και 0.2 ppm, ενώ μετά από 8 κύκλους πλύσης, η επίδραση της δράσης του ενζύμου υψηλότερης συγκέντρωσης ήταν ακόμα αισθητή (4.77%), ενώ η καθαριστική ικανότητα μειώθηκε στο 1.2% για τη χαμηλότερη συγκέντρωση [51]. Επομένως, τα αποτελέσματα από τη δράση του ενζύμου είναι αθροιστικά, καθώς τα οφέλη που αυτό επιφέρει αυξάνονται σε κάθε κύκλο πλύσης, μέχρι να φτάσουν σε ένα πλατό, που εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα. Δεν υπάρχει συσσώρευση ενεργού ενζύμου, καθώς το μεγαλύτερο μέρος της ενεργότητας χάνεται κατά τη διαδικασία της ξέπλυσης και του στεγνώματος. Η επίδραση της επεξεργασίας με ένζυμο, που αυξάνεται μετά από κάθε κύκλο πλύσης, αποδίδεται αφενός στη δράση του ενζύμου και αφετέρου στην μηχανική καταπόνηση που συντελείται λόγω πλύσης στο πλυντήριο.

Σχετικά με την εκτίμηση αντιγήρανσης των βαμβακερών ιματισμών που πλύθηκαν με μαλακτικό με ένζυμο, οπτικά δεν υπήρχε προφανής διαφορά στην επιφάνεια του υφάσματος σε σύγκριση με το ύφασμα που πλύθηκε με μαλακτικό χωρίς ένζυμο, όπως φαίνεται στις Εικόνες 4.21 και 4.22. Ωστόσο, όπως και για την περίπτωση της εκτίμησης λευκότητας, το βαμβακερό ύφασμα πλύθηκε μόνο μία φορά με μαλακτικό με ένζυμο σε περιεκτικότητα 0.2% v/v για 50 λεπτά. Σε άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την εκτίμηση της επίδρασης της Celluclean στην επιφάνεια βαμβακερού υφάσματος προέκυψε ότι 10 επαναλαμβανόμενες πλύσεις των 20 λεπτών η κάθε μία του υφάσματος με απορρυπαντικό με ένζυμο αύξησαν κατά 40% σχεδόν την παραγωγή αναγωγικών άκρων στην επιφάνεια του υφάσματος, ενώ 1 πλύση με απορρυπαντικό με ένζυμο των 200 λεπτών και των 2 ημερών, οδήγησε σε 10% και 15% αύξηση, αντίστοιχα [52]. Όπως και προηγουμένως, δεν υπάρχει συσσώρευση ενεργού ενζύμου στην επιφάνεια του υφάσματος, καθώς με την ξέπλυση και το στέγνωμα χάνεται το μεγαλύτερο μέρος της ενεργότητας του ενζύμου. Επίσης, με τις επαναλαμβανόμενες πλύσεις ενισχύεται η δράση του ενζύμου και λόγω της επιπλέον μηχανικής καταπόνησης.

Επομένως, από τα πειράματα που διεξήχθησαν στην παρούσα διπλωματική εργασία δεν εξάγεται κάποιο ξεκάθαρο συμπέρασμα σχετικά με τα οφέλη της προσθήκης κυτταρινάσων στη σύσταση των μαλακτικών. Από τη μελέτη σταθερότητας των ενζύμων προέκυψε ότι τα ένζυμα Carezyme και Revitalenz είναι συμβατά με τα συστατικά των μαλακτικών, καθώς διατηρούνται σχετικά δραστικά και σταθερά, ενώ το ένζυμο Celluclean δεν είναι συμβατό. Συγκεκριμένα, το ένζυμο Revitalenz εμφανίζει καλύτερη συμπεριφορά ως προς τη δραστηριότητα και την σταθερότητα σε σχέση με το Carezyme. Από την εκτίμηση της βελτίωσης της λευκότητας και της αντιγήρανσης μετά από πλύση βαμβακερών υφασμάτων με μαλακτικά με κυτταρινάσες μέσω οπτικού ελέγχου, δεν προέκυψε κάποιο αποτέλεσμα, ενώ από την μέτρηση του ολικού χρώματος των υφασμάτων προέκυψε βελτίωση στη λευκότητα κατά 0.5% με χρήση Celluclean, 1.1% με Carezyme και 0.4% με Revitalenz σε αραιωμένο μαλακτικό. Άρα, η προσθήκη των ενζύμων Carezyme ή Revitalenz στη σύσταση μαλακτικών προϊόντων θα μπορούσε να έχει θετικές επιδράσεις στα χρώματα και την εμφάνιση των βαμβακερών υφασμάτων, αλλά χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

5.4 Μελλοντικοί στόχοι

Η αξιοποίηση των ενζύμων, και πιο συγκεκριμένα των κυτταρινάσων, σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές στη βιομηχανία είναι ήδη πολύ διαδεδομένη, αλλά παρουσιάζει, επίσης, μεγάλες προοπτικές και για

το μέλλον. Η προσθήκη τους σε καθαριστικά προϊόντα ρούχων, αλλά και γενικότερα η χρήση τους για την επεξεργασία βαμβακερών υφασμάτων, είναι μερικοί μόνο από τους τομείς στους οποίους η παρουσία των κυτταρινασών είναι ιδιαίτερα σημαντική. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας επιχειρήθηκε η προσθήκη κυτταρινασών σε μαλακτικά ρούχων και αξιολογήθηκε η σταθερότητα τους παρουσία των συστατικών του μαλακτικού, σε σύγκριση με το απορρυπαντικό και το νερό, καθώς και η βελτίωση της λευκότητας και της αντιγήρανσης βαμβακερού υφάσματος μετά την πλύση του με μαλακτικά με ένζυμα.

Σε πρώτο στάδιο, όσον αφορά τα εμπορικά παρασκευάσματα κυτταρινάσης που χρησιμοποιήθηκαν, προτείνεται η χρήση ενζύμων, τα οποία εμφανίζουν δραστικότητα και σταθερότητα σε όξινες συνθήκες. Οι κυτταρινάσες που χρησιμοποιήθηκαν, προστίθενται, τυπικά, στη σύνθεση εμπορικών απορρυπαντικών, τα οποία έχουν αλκαλικό pH, οπότε διαθέτουν τις κατάλληλες ιδιότητες για τη συγκεκριμένη χρήση. Ωστόσο, τα μαλακτικά προϊόντα έχουν, κατά βάση, όξινο pH, συνεπώς θα ήταν πιο σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν για τα πειράματα κυτταρινάσες που να εμφανίζουν βέλτιστη δράση και σταθερότητα σε όξινο και ουδέτερο περιβάλλον.

Επίσης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η σταθερότητα των κυτταρινασών παρουσία εμπορικού απορρυπαντικού και μαλακτικού. Για την επίτευξη πιο ακριβής σύγκρισης μεταξύ του απορρυπαντικού και του μαλακτικού προϊόντος, συνίσταται η απενεργοποίηση των υπαρχόντων ενζύμων (<0.04% v/v) της σύστασης του απορρυπαντικού με θερμική επεξεργασία του στους 100°C για 15-30 λεπτά [80][122]. Επίσης, σε επόμενο στάδιο προτείνεται ο έλεγχος της συμβατότητας των κυτταρινασών με μεμονωμένα τα συστατικά που προστίθενται στα μαλακτικά προϊόντα, με επώαση τους 15 λεπτά έως και μία ώρα σε κατάλληλη θερμοκρασία, όπως κατιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες (π.χ. τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα), οργανικούς διαλύτες (π.χ. αλκοόλη) και άλλους χημικούς παράγοντες (π.χ. αντιβακτηριακούς), όπως αντίστοιχα συμβαίνει και κατά την αξιολόγηση συμβατότητας των ενζύμων με τη σύσταση των εμπορικών απορρυπαντικών [77], [80], [81], [119].

Ακόμη, κατά τη διεξαγωγή της εργασίας μελετήθηκε η βελτίωση της λευκότητας και της αντιγήρανσης βαμβακερών υφασμάτων μετά την πλύση τους με μαλακτικά με κυτταρινάσες. Όπως, αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκε μία μόνο πλύση των 50 λεπτών. Σε επόμενο στάδιο, προτείνεται η εκτίμηση της βελτίωσης της λευκότητας και της εμφάνισης των υφασμάτων μετά από πολλαπλούς κύκλους πλύσεων με μαλακτικά με κυτταρινάσες, καθώς τα αποτελέσματα θα είναι πιο εμφανή. Όπως έχει αποδειχτεί, το ενεργό ένζυμο δεν συσσωρεύεται στην επιφάνεια του υφάσματος, αφού το μεγαλύτερο μέρος της ενεργότητας χάνεται κατά τη διαδικασία της ξέπλυσης και του στεγνώματος, αλλά τα οφέλη από τη δράση του ενζύμου είναι αθροιστικά και αυξάνονται σε κάθε κύκλο πλύσης μέχρι να φτάσουν σε ένα πλατό, που εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα [51], [52].

Τέλος, εκτιμήθηκε η βελτίωση της επιφάνειας των βαμβακερών υφασμάτων μετά την πλύση τους με ένζυμα, δηλαδή η αφαίρεση χνουδιών και κόμπων και η απόκτηση πιο λείας εμφάνισης, μέσω οπτικού ελέγχου. Σε επόμενο στάδιο, προτείνεται η χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (SEM) για την αξιολόγηση των αλλαγών στην επιφάνεια των υφασμάτων κατόπιν ενζυμικής επεξεργασίας [52], [56].

6. Βιβλιογραφία

- [1] A. A. Al-Ghanayem and B. Joseph, "Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 104, no. 7, pp. 2871–2882, 2020, doi: 10.1007/s00253-020-10429-x.
- [2] "Global Cellulase (CAS 9012-54-8) Market Size, Share Analysis 2028." <https://marketresearch.biz/report/cellulase-cas-9012-54-8-market/#details> (accessed Feb. 05, 2021).
- [3] E. M. Rubin, "Genomics of cellulosic biofuels," *Nature*, vol. 454, no. 7206, pp. 841–845, 2008.
- [4] I. Levy, Z. Shani, and O. Shoseyov, "Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1, 4-β-glucanase and cellulose-binding domains," *Biomol. Eng.*, vol. 19, no. 1, pp. 17–30, 2002.
- [5] Π. Χριστακόπουλος and Ε. Τόπακας, *Βιοτεχνολογική Παραγωγή Βιοκαυσίμων*. 2015.
- [6] "Microscopic and Submicroscopic Structure of Cell Walls – Explained!" <https://www.yourarticlelibrary.com/biology/microscopic-and-submicroscopic-structure-of-cell-walls-explained> (accessed Feb. 05, 2021).
- [7] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. Van Zyl, and S. Isak, "Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology Downloaded from <http://mmbbr.asm.org/> on February 6 , 2013 by INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY MADRAS," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 66, no. 3, pp. 506–577, 2002, doi: 10.1128/MMBR.66.3.506.
- [8] C. Xiros, E. Topakas, and P. Christakopoulos, "Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production," *Wiley Interdiscip. Rev. Energy Environ.*, vol. 2, no. 6, pp. 633–654, 2013, doi: 10.1002/wene.49.
- [9] G. Cheng *et al.*, "Transition of cellulose crystalline structure and surface morphology of biomass as a function of ionic liquid pretreatment and its relation to enzymatic hydrolysis," *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 4, pp. 933–941, 2011.
- [10] D. Klemm, B. Heublein, H. Fink, and A. Bohn, "Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material," *Angew. chemie Int. Ed.*, vol. 44, no. 22, pp. 3358–3393, 2005.
- [11] R. Estela and J. Luis, "Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars," *Sustain. Degrad. Lignocellul. Biomass - Tech. Appl. Commer.*, 2013, doi: 10.5772/53719.
- [12] C. Somerville *et al.*, "Toward a systems approach to understanding plant cell walls," *Science (80-.)*, vol. 306, no. 5705, pp. 2206–2211, 2004, doi: 10.1126/science.1102765.
- [13] N. Aro, T. Pakula, and M. Penttilä, "Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 29, no. 4, pp. 719–739, 2005, doi: 10.1016/j.femsre.2004.11.006.
- [14] R. H. Doi, "Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome and noncellulosome producers," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1125, no. 1, pp. 267–279, 2008.
- [15] R. Singh, M. Kumar, A. Mittal, and P. K. Mehta, "Microbial enzymes: industrial progress in 21st

- century," *3 Biotech*, vol. 6, no. 2, 2016, doi: 10.1007/s13205-016-0485-8.
- [16] V. Arantes and J. N. Saddler, "Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 3, no. 1, pp. 1–11, 2010, doi: 10.1186/1754-6834-3-1.
- [17] S. D. Mansfield, C. Mooney, and J. N. Saddler, "Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis," *Biotechnol. Prog.*, vol. 15, no. 5, pp. 804–816, 1999, doi: 10.1021/bp9900864.
- [18] R. C. Kuhad, R. Gupta, and A. Singh, "Microbial cellulases and their industrial applications," *Enzyme Res.*, vol. 2011, no. 1, 2011, doi: 10.4061/2011/280696.
- [19] Z. Dai, B. S. Hooker, D. B. Anderson, and S. R. Thomas, "Expression of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase E1 in transgenic tobacco: biochemical characteristics and physiological effects," *Transgenic Res.*, vol. 9, no. 1, pp. 43–54, 2000.
- [20] V. Zverlov, S. Mahr, K. Riedel, and K. Bronnenmeier, "Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile '*Anaerocellum thermophilum*' with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains," *Microbiology*, vol. 144, no. 2, pp. 457–465, 1998.
- [21] K. BRONNENMEIER, K. P. RÜCKNAGEL, and W. L. STAUDENBAUER, "Purification and properties of a novel type of exo-1, 4- β -glucanase (Avicelase II) from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*," *Eur. J. Biochem.*, vol. 200, no. 2, pp. 379–385, 1991.
- [22] A. L. Carvalho *et al.*, "The family 11 carbohydrate-binding module of *Clostridium thermocellum* Lic26A-Cel5E accommodates β -1, 4- and β -1, 3-1, 4-mixed linked glucans at a single binding site," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 33, pp. 34785–34793, 2004.
- [23] A. Singh and P. K. R. Kumar, "*Fusarium oxysporum*: status in bioethanol production," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 11, no. 2, pp. 129–147, 1991.
- [24] A. Sharma, S. K. Khare, and M. N. Gupta, "Hydrolysis of rice hull by crosslinked *Aspergillus niger* cellulase," *Bioresour. Technol.*, vol. 78, no. 3, pp. 281–284, 2001.
- [25] L. S. Trivedi and R. A. O. RR, "CELLULOSE INDUCTION IN *ASPERGILLUS FUMIGATUS* M 216," 1980.
- [26] M. O. Arja, "Cellulases in the textile industry," *Ind. Enzym. Struct. Funct. Appl.*, pp. 51–63, 2007, doi: 10.1007/1-4020-5377-0_4.
- [27] R. J. Quinlan *et al.*, "Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 37, pp. 15079–15084, 2011.
- [28] J. Andreaus, D. N. Oleksyszyn, M. Henrique, and L. Silveira, "Processing of cellulosic textile materials with cellulases," *Cellul. Other Nat. Occur. Polym.*, vol. 661, no. 2, pp. 11–19, 2014.
- [29] P. Bubner, H. Plank, and B. Nidetzky, "Visualizing cellulase activity," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 110, no. 6, pp. 1529–1549, 2013, doi: 10.1002/bit.24884.
- [30] "Genomic Science Program: U.S. Department of Energy." <https://genomicscience.energy.gov/roadmap/> (accessed Feb. 05, 2021).
- [31] E. T. Reese, R. G. H. Siu, and H. S. Levinson, "The biological degradation of soluble cellulose

- derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis," *J. Bacteriol.*, vol. 59, no. 4, p. 485, 1950.
- [32] M. Mandels and E. T. Reese, "Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fabric,(Volume 5).," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 22, 1999.
- [33] L. Laureano-Perez, F. Teymouri, H. Alizadeh, and B. E. Dale, "Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 124, no. 1, pp. 1081–1099, 2005.
- [34] I. Lee, B. R. Evans, and J. Woodward, "The mechanism of cellulase action on cotton fibers: Evidence from atomic force microscopy," *Ultramicroscopy*, vol. 82, no. 1–4, pp. 213–221, 2000, doi: 10.1016/S0304-3991(99)00158-8.
- [35] M. P. Coughlan, "The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application," *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, vol. 3, no. 1, pp. 39–109, 1985, doi: 10.1080/02648725.1985.10647809.
- [36] M. Mandels, "Applications of cellulases." Portland Press Ltd., 1985.
- [37] E. T. Reese and M. Mandels, "Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase," in *Annual reports on fermentation processes*, vol. 7, Elsevier, 1984, pp. 1–20.
- [38] M. R. Ladisch, K. W. Lin, M. Voloch, and G. T. Tsao, "Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 5, no. 2, pp. 82–102, 1983.
- [39] D. D. Y. Ryu and M. Mandels, "Cellulases: biosynthesis and applications," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 2, no. 2, pp. 91–102, 1980.
- [40] M. K. Bhat, "Cellulases and related enzymes in biotechnology," *Biotechnol. Adv.*, vol. 18, no. 5, pp. 355–383, 2000, doi: 10.1016/S0734-9750(00)00041-0.
- [41] H. J. Gilbert and G. P. Hazlewood, "Bacterial cellulases and xylanases," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 139, no. 2, pp. 187–194, 1993, doi: 10.1099/00221287-139-2-187.
- [42] H. Uhlig, *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley & Sons, 1998.
- [43] D. Kochovi, "Optimizing processing conditions in enzymatic stone washing," *Am. Dye. Rep.*, vol. 79, no. 9, pp. 24–28, 1990.
- [44] M. Tyndall, "Upgrading garment washing techniques," *Am. Dyest. Report.*, vol. 5, pp. 22–30, 1990.
- [45] D. Pont, "17. Υφάνσιμες ίνες 17.1."
- [46] K. D. Mojsov, "TRENDS IN BIO-PROCESSING OF TEXTILES : A REVIEW," vol. 3, no. 2, pp. 135–138, 2014.
- [47] M. Casal, A. Cavaco-paulo, and R. Arau, "Application of enzymes for textile fibres processing," vol. 26, no. October, pp. 332–349, 2008, doi: 10.1080/10242420802390457.
- [48] "Cotton: World Markets and Trade | USDA Foreign Agricultural Service." <https://www.fas.usda.gov/data/cotton-world-markets-and-trade> (accessed Feb. 05, 2021).
- [49] R. M. Rowell and H. P. Stout, "Handbook of fiber chemistry," *CRC/Taylor Fr.*, pp. 409–456, 2007.

- [50] L. Shen and M. K. Patel, "Life cycle assessment of man-made cellulose fibres," *Lenzinger Berichte*, vol. 88, pp. 1–59, 2010.
- [51] A. Calvimontes, N. J. Lant, and V. Dutschk, "Cleanability improvement of cotton fabrics through their topographical changes due to the conditioning with cellulase enzyme," *J. Surfactants Deterg.*, vol. 15, no. 2, pp. 131–137, 2012, doi: 10.1007/s11743-011-1293-0.
- [52] C. Caparrós, C. López, M. Torrell, N. Lant, J. Smets, and A. Cavaco-Paulo, "Treatment of cotton with an alkaline *Bacillus* spp cellulase: Activity towards crystalline cellulose," *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 2, pp. 275–283, 2012, doi: 10.1002/biot.201000352.
- [53] M. Rau *et al.*, "Application of cellulases from *Acrophialophora nainiana* and *Penicillium echinulatum* in textile processing of cellulosic fibres," *Biocatal. Biotransformation*, vol. 26, no. 5, pp. 383–390, 2008.
- [54] M. Yamada, Y. Amano, E. Horikawa, K. Nozaki, and T. Kanda, "Mode of action of cellulases on dyed cotton with a reactive dye," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 69, no. 1, pp. 45–50, 2005, doi: 10.1271/bbb.69.45.
- [55] H. Azevedo, D. Bishop, and A. Cavaco-Paulo, "Effects of agitation level on the adsorption, desorption, and activities on cotton fabrics of full length and core domains of EGV (*Humicola insolens*) and CenA (*Cellulomonas fimi*)," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 27, no. 3–5, pp. 325–329, 2000, doi: 10.1016/S0141-0229(00)00205-2.
- [56] C. Caparrós, N. Lant, J. Smets, and A. Cavaco-Paulo, "Effects of adsorption properties and mechanical agitation of two detergent cellulases towards cotton cellulose," *Biocatal. Biotransformation*, vol. 30, no. 2, pp. 260–271, 2012, doi: 10.3109/10242422.2012.666840.
- [57] W. Wang, F. Meng, P. Liu, S. Yang, and D. Wei, "Construction of a promoter collection for genes co-expression in filamentous fungus *Trichoderma reesei*," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 41, no. 11, pp. 1709–1718, 2014, doi: 10.1007/s10295-014-1508-2.
- [58] Y. M. Galante and C. Formantici, "Enzyme Applications in Detergency and in Manufacturing Industries," pp. 1399–1422, 2003.
- [59] T. Tzanov, J. Andreaus, G. Guebitz, and A. Cavaco-Paulo, "Protein interactions in enzymatic processes in textiles," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 6, no. 3, pp. 146–154, 2003.
- [60] B. M. Eid and N. A. Ibrahim, "Recent developments in sustainable finishing of cellulosic textiles employing biotechnology," *J. Clean. Prod.*, vol. 284, p. 124701, 2021, doi: 10.1016/j.jclepro.2020.124701.
- [61] S. Gürkök, "Microbial enzymes in detergents: a review," *Int. J. Sci. Eng. Res.*, vol. 10, no. 9, pp. 75–81, 2019.
- [62] W. Rähse, "Production of Tailor-made enzymes for detergents," *ChemBioEng Rev.*, vol. 1, no. 1, pp. 27–39, 2014.
- [63] M. K. Kang and Y. H. Rhee, "Carboxymethyl cellulases active and stable at alkaline pH from alkalophilic *Cephalosporium* sp. RYM-202," *Biotechnol. Lett.*, vol. 17, no. 5, pp. 507–512, 1995.
- [64] S. Shikata *et al.*, "Alkaline cellulases for laundry detergents: production by alkalophilic strains of *Bacillus* and some properties of the crude enzymes," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 54, no. 1, pp. 91–96, 1990.
- [65] N. K. Pazarlioğlu, M. Sarişik, and A. Telefoncu, "Treating denim fabrics with immobilized

- commercial cellulases," *Process Biochem.*, vol. 40, no. 2, pp. 767–771, 2005.
- [66] F. N. Niyonzima, "Detergent-compatible fungal cellulases," *Folia Microbiol. (Praha)*, 2020, doi: 10.1007/s12223-020-00838-w.
- [67] S. K. Obendorf, A. Varanasi, R. Mejlidal, and V. S. Nielsen, "Lipid distribution on cotton textiles in relation to washing with cellulase," *J. Surfactants Deterg.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–5, 2003, doi: 10.1007/s11743-003-0241-x.
- [68] S. Acharya and A. Chaudhary, "Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 43, no. 3, pp. 844–856, 2012.
- [69] T. H. Pham, D. T. Quyen, and N. M. Nghiem, "Purification and properties of an endoglucanase from *Aspergillus niger* VTCC-F021," *Turkish J. Biol.*, vol. 36, no. 6, pp. 694–701, 2012.
- [70] A. A. El-Hadi, S. A. El-Nour, A. Hammad, Z. Kamel, and M. Anwar, "Optimization of cultural and nutritional conditions for carboxymethylcellulase production by *Aspergillus hortai*," *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 23–28, 2014.
- [71] A. Bekele *et al.*, "Isolation and characterization of efficient cellulolytic fungi from degraded wood and industrial samples," *African J. Biotechnol.*, vol. 14, no. 48, pp. 3228–3234, 2015.
- [72] A. K. Maharana and P. Ray, "Optimization and characterization of cold-active endoglucanase produced by *Aspergillus terreus* strain AKM-F3 grown on sugarcane bagasse," *Turkish J. Biol.*, vol. 39, no. 1, pp. 175–185, 2015.
- [73] M. Imran, Z. Anwar, M. Zafar, A. Ali, and M. Arif, "Production and characterization of commercial cellulase produced through *Aspergillus niger* IMMIS1 after screening fungal species," *Pak J Bot*, vol. 50, no. 4, pp. 1563–1570, 2018.
- [74] G. El-Baroty, A.-E. Faten, H. Moawad, T. N. El-Sebai, F. Abdulaziz, and A. A. Khattab, "Optimization and Characterization of Extracellular Cellulase Produced by Native Egyptian Fungal Strain," *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*, vol. 47, no. 3, pp. 743–750, 2019.
- [75] I. Hafiz Muhammad Nasir, A. Ishtiaq, Z. Muhammad Anjum, and I. Muhammad, "Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility," *Adv. Biosci. Biotechnol.*, vol. 2011, 2011.
- [76] I. Ahmed, M. A. Zia, and H. M. N. N. Iqbal, "Detergent-compatible purified endoglucanase from the agro-industrial residue by *Trichoderma harzianum* under solid state fermentation," *BioResources*, vol. 11, no. 3, pp. 6393–6406, 2016, doi: 10.15376/biores.11.3.6393-6406.
- [77] Z. K. Bagewadi, S. I. Mulla, and H. Z. Ninnekar, "Purification and characterization of endo β -1, 4-d-glucanase from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 and its application in production of bioethanol from sweet sorghum bagasse," *3 Biotech*, vol. 6, no. 1, p. 101, 2016, doi: 10.1007/s13205-016-0421-y.
- [78] S. Bairagi, "Optimization of cellulase enzyme from vegetable waste by using *Trichoderma atroviride* in solid state fermentation," *J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.*, vol. 10, pp. 68–73, 2016.
- [79] E. Hoshino, M. Chiwaki, A. Suzuki, and M. Murata, "Improvement of cotton cloth soil removal by inclusion of alkaline cellulase from bacillus sp. KSM-635 in detergents," *J. Surfactants Deterg.*, vol. 3, no. 3, pp. 317–326, 2000, doi: 10.1007/s11743-000-0135-y.

- [80] S. A. Ladeira, E. Cruz, A. B. Delatorre, J. B. Barbosa, and M. L. L. Martins, "Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 18, no. 2, pp. 110–115, 2015, doi: 10.1016/j.ejbt.2014.12.008.
- [81] D. K. Trinh, D. T. Quyen, T. T. Do, and N. M. Nghiem, "Purification and characterization of a novel detergent-and organic solvent-resistant endo-beta-1, 4-glucanase from a newly isolated basidiomycete *Peniophora* sp. NDVN01," *Turkish J. Biol.*, vol. 37, no. 4, pp. 377–384, 2013, doi: 10.3906/biy-1207-37.
- [82] B. R. Dave, A. P. Sudhir, and R. B. Subramanian, "Purification and properties of an endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus*," *Biotechnol. Reports*, vol. 6, pp. 85–90, 2015.
- [83] S. Jayasekara and R. Ratnayake, "Microbial Cellulases: An Overview and Applications," *Cellulose*, 2019, doi: 10.5772/intechopen.84531.
- [84] F. Sarmiento, R. Peralta, and J. M. Blamey, "Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 3, p. 148, 2015.
- [85] F. Hasan, A. A. Shah, S. Javed, and A. Hameed, "Enzymes used in detergents: lipases," *African J. Biotechnol.*, vol. 9, no. 31, pp. 4836–4844, 2010.
- [86] M. Beneito-Cambra, V. Bernabé-Zafón, J. M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso, and G. Ramis-Ramos, "Enzyme class identification in cleaning products by hydrolysis followed by derivatization with o-phthalaldehyde, HPLC and linear discriminant analysis," *Talanta*, vol. 79, no. 2, pp. 275–279, 2009.
- [87] S. GÜRKÖK, "Microbial Enzymes in Detergents: A Review," in *4th INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCES IN NATURAL & APPLIED SCIENCES ICANAS*, 2019, pp. 19–22.
- [88] H. S. Olsen and P. Falholt, "The role of enzymes in modern detergency," *J. Surfactants Deterg.*, vol. 1, no. 4, pp. 555–567, 1998, doi: 10.1007/s11743-998-0058-7.
- [89] S. Mitidieri, A. H. S. Martinelli, A. Schrank, and M. H. Vainstein, "Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations," *Bioresour. Technol.*, vol. 97, no. 10, pp. 1217–1224, 2006.
- [90] D. Mehta and T. Satyanarayana, "Bacterial and archaeal α -amylases: diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications," *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 1129, 2016.
- [91] S. Javed *et al.*, "Bacterial lipases: a review on purification and characterization," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 132, pp. 23–34, 2018.
- [92] D. Bajpai and V. K. Tyagi, "Laundry Detergents : An Overview," vol. 340, no. 7, pp. 327–340, 2007.
- [93] V. K. Tyagi, "Gels: Novel Detergents for Laundry Applications," *J. Oleo Sci.*, vol. 55, no. 11, pp. 555–562, 2006.
- [94] D. Kumar, T. N. Savitri, R. Verma, and T. C. Bhalla, "Microbial proteases and application as laundry detergent additive," *Res J Microbiol*, vol. 3, no. 12, pp. 661–672, 2008.
- [95] "Enzymes in Detergents | Catalysis | Hydrolysis." <https://www.scribd.com/doc/11523933/Enzymes-in-Detergents> (accessed Feb. 05, 2021).
- [96] K. Πουλάς and Σ. Σιδέρης, *Εργαστηριακές Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών*. 2015.

- [97] Σ. Σωτήριος, *Εργαστηριακές Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών Πουλάς Κωνσταντίνος*. .
- [98] B. A. Chiweshe and P. C. Crews, "Influence of Household Fabric Softeners and Laundry Enzymes on Pilling and Breaking Strength," pp. 1–7, 1996.
- [99] D. S. Murphy, "Fabric softener technology: A review," *J. Surfactants Deterg.*, vol. 18, no. 2, pp. 199–204, 2015, doi: 10.1007/s11743-014-1658-2.
- [100] E. K. Oikonomou, G. M. L. Messina, and L. Heux, "Adsorption of a fabric conditioner on cellulose nanocrystals: Synergistic effects of surfactant vesicles and polysaccharides on softness properties I – Introduction," no. Sigel 2017, pp. 1–20, 2020.
- [101] T. Igarashi, N. Morita, Y. Okamoto, and K. Nakamura, "Elucidation of Softening Mechanism in Rinse Cycle Fabric Softeners . Part 1 : Effect of Hydrogen Bonding," *J. Surfactants Deterg.*, vol. 19, no. 1, pp. 183–192, 2016, doi: 10.1007/s11743-015-1732-4.
- [102] S. K. Obendorf and Æ. V. Dixit, "Microscopy Study of Distribution of Laundry Fabric Softener on Cotton Fabric," pp. 225–230, 2009, doi: 10.1007/s11743-009-1115-9.
- [103] K. Holmberg, "Interactions between surfactants and hydrolytic enzymes," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 168, pp. 169–177, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.002.
- [104] A. A. Rastegari, A. K. Bordbar, and A. Taheri-Kafrani, "Interaction of cellulase with cationic surfactants: Using surfactant membrane selective electrodes and fluorescence spectroscopy," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 73, no. 1, pp. 132–139, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.010.
- [105] X. Lin, C. Cai, H. Lou, X. Qiu, Y. Pang, and D. Yang, "Effect of cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide on the enzymatic hydrolysis of cellulose," *Cellulose*, vol. 24, no. 1, pp. 61–68, 2017, doi: 10.1007/s10570-016-1089-5.
- [106] J. Xiang, J. B. Fan, N. Chen, J. Chen, and Y. Liang, "Interaction of cellulase with sodium dodecyl sulfate at critical micelle concentration level," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 49, no. 2, pp. 175–180, 2006, doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.03.015.
- [107] T. Eriksson, J. Börjesson, and F. Tjerneld, "Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 31, no. 3, pp. 353–364, 2002, doi: 10.1016/S0141-0229(02)00134-5.
- [108] D. E. Otzen, L. Christiansen, and M. Schülein, " A comparative study of the unfolding of the endoglucanase Cel45 from *Humicola insolens* in denaturant and surfactant ," *Protein Sci.*, vol. 8, no. 9, pp. 1878–1887, 1999, doi: 10.1110/ps.8.9.1878.
- [109] F. N. Niyonzima and S. More, "Purification and properties of detergent-compatible extracellular alkaline protease from *Scopulariopsis* spp.," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 44, no. 7, pp. 738–759, 2014, doi: 10.1080/10826068.2013.854254.
- [110] N. Tindbaek, A. Svendsen, P. R. Oestergaard, and H. Draborg, "Engineering a substrate-specific cold-adapted subtilisin," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 17, no. 2, pp. 149–156, 2004, doi: 10.1093/protein/gzh019.
- [111] M. Ke, B. Ramesh, Y. Hang, and Z. Liu, "Engineering and characterization of a novel low temperature active and thermo stable esterase from marine *Enterobacter cloacae*," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 118, no. 2017, pp. 304–310, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.193.
- [112] X.-Q. Zhao, X.-Y. Zhang, F. Zhang, R. Zhang, B.-J. Jiang, and F.-W. Bai, "Metabolic engineering of

- fungal strains for efficient production of cellulolytic enzymes,” in *Fungal cellulolytic enzymes*, Springer, 2018, pp. 27–41.
- [113] R. Krull *et al.*, “Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology,” *J. Biotechnol.*, vol. 163, no. 2, pp. 112–123, 2013.
- [114] R. W. Novozymes, “TREAT YOUR CLOTHES RIGHT.”
- [115] “Celluclean® 5000 L | Novozymes.” <https://biosolutions.novozymes.com/en/laundry/products/cellucleanr-5000-l> (accessed Feb. 05, 2021).
- [116] “Carezyme® Premium 4500 L | Novozymes.” <https://biosolutions.novozymes.com/en/laundry/products/carezymer-premium-4500-l> (accessed Feb. 05, 2021).
- [117] I. Revitalenz *et al.*, “THE MOST EFFECTIVE WAY TO PROTECT AND CARE FOR WHAT MATTERS.”
- [118] “Essential Ingredients Product Search Results.” <https://www.essentialingredients.com/productdetailsingle.aspx?ItemNum=DI-Revitlz200-225-DR> (accessed Feb. 05, 2021).
- [119] R. Gaur and S. Tiwari, “Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07,” *BMC Biotechnol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1186/s12896-015-0129-9.
- [120] M. Omrane Benmrada *et al.*, “Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest,” *BMC Biotechnol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–18, 2019, doi: 10.1186/s12896-019-0536-4.
- [121] C. E. Duffeck, C. L. A. de Menezes, M. Boscolo, R. da Silva, E. Gomes, and R. R. da Silva, “Keratinases from *Coriopsis byrsina* as an alternative for feather degradation: applications for cloth cleaning based on commercial detergent compatibility and for the production of collagen hydrolysate,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 42, no. 11, pp. 2403–2412, 2020, doi: 10.1007/s10529-020-02963-5.
- [122] N. E. Nnolim and U. U. Nwodo, “*Bacillus* sp. CSK2 produced thermostable alkaline keratinase using agro-wastes: keratinolytic enzyme characterization,” *BMC Biotechnol.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1186/s12896-020-00659-2.
- [123] M. Garriga, M. Almaraz, and A. Marchiaro, “Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method) Determinación de azúcares reductores en extractos de alga *Undaria pinnatifida* (harvey) por espectrofotometría UV-visible (método DNS),” 2017.
- [124] “Laundry - CFT.” <https://www.cftbv.nl/laundry/> (accessed Feb. 12, 2021).
- [125] A. Karnchanatat *et al.*, “A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 42, no. 5, pp. 404–413, 2008, doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.11.009.