

dr. Vanja Kokol, univ. dipl. inž.

Simona Teodorovič, prof. bi. – ke.

izred. prof. dr. Vera Golob, univ. dipl. inž.

Univerza v Mariboru, Fakulteta za strojništvo, Oddelek za tekstilstvo,

Inštitut za tekstilno kemijo, ekologijo in koloristiko, LBEE, Smetanova 17, SI-2000 Maribor;

e-pošta: vanja.kokol@uni-mb.si, simona.teodorovic@uni-mb.si, vera.golob@uni-mb.si

Biotehnologija v tekstilnih procesih plemenitenja

1. del: Encimi, industrija in okolje

Članek obravnava današnjo uporabo encimov v industrijskih procesih tekstilnega plemenitenja ter ob njihovem intenzivnem znanstvenem razvoju kompleksno opozarja na obstoječe aplikativne probleme in cilje v prihodnje.

Po razloženi strukturno – funkcionalni aktivnosti encimov, njihovem tehnološkem postopku pridobivanja in vlogi genetskega inženiringa so podane ekološke in ekonomske prednosti njihove industrijske uporabe. Sledi podrobnejši opis možnosti uporabe encimov v posameznih postopkih tekstilnega plemenitenja in njihov znanstveni razvoj. Pregled je usmerjen tako na posamezne postopke v obdelavi naravnih vlaken kot tudi na prve poizkuse obdelave sintetičnih vlaken. Opisani so obstoječi problemi klasičnih plemenitilnih postopkov, od predobdelave, beljenja in barvanja do plemenitenja/apretiranja, ter predstavljene možnosti za vključitev encimskih postopkov. Podrobneje so opisana nova spoznanja na posameznih vlaknih in fazah encimskega plemenitenja; poseben poudarek je na razvoju novih encimov, primernih za njihovo obdelavo, novih encimskih postopkih, njihovih prednostih in slabostih, predusem poškodbe vlaken in življenjska doba oz. ostala aktivnost encimov na tkanini. Podrobneje so opisani alternativni tehnološki postopki za doseganje posebnih končnih učinkov na površini tkanine. Po krajšem opisu razvoja novih, izjemno stabilnih encimov in njihovih prednostih je opozorjeno na obetavno uporabo biotehnologije v tekstilno obdelovalnih postopkih in perspektivo njihovega razvoja v prihodnje.

Ključne besede: tekstilno plemenitenje, biotehnologija, encimi, ekologija, raziskave in razvoj

Biotechnology in Textile Finishing Processes

Part 1: Enzymes, Industry and Environment

The authors investigate today's use of enzymes in industrial textile finishing processes and in view of their intense scientific development point to the existing application problems and objectives.

The explained structural – functional activity of enzymes, the technological process of their obtaining and the genetic engineering are followed by ecological and economical benefits of their industrial usage and then by a detailed description of possibilities of using enzymes in particular processes of textile finishing and their scientific development. The review includes individual procedures of natural fibres treatment and the first trials of synthetic fibres treatment. The existing problems of standard finishing processes, from pretreatment, bleaching and dyeing to finishing and the possibilities for incorporating enzymatic processes are presented. New achievements regarding individual fibres and enzymatic processes phases are described in detail; a special emphasis is put on development of new enzymes, new enzymatic processes, their advantages and disadvantages, and above all on damages of fibres and on the lifetime of enzymes, i.e. their remaining activity on fabric. Alternative technological processes for achieving special final effects on a fabric surface are described in detail. After a short description of development of new extremely stable enzymes and their advantages the authors point to promising usage of biotechnology in textile processing processes and to the prospect of their future development.

Keywords: textile finishing, biotechnology, enzymes, ecology, researches and development

1.0 UVOD

Tako kot so devetnajsto stoletje v tekstilni industriji zaznamovale inovacije iz kemije (nova barvila, nove apreture in nova vlakna), elektrotehnika in kontrolni inženiring, je bila v dvajsetem stoletju v ospredju fizika, ki je z zmogljivejšim računalniškim programiranjem in novimi eksperimentalnimi tehnikami pripomogla k boljšemu razumevanju fizikalno-mehanskih lastnosti vlaken ter z vnaprejšnjim predvidevanjem odnosa med sestavo, strukturo in kvalitativnimi lastnostmi omogočila kreiranje novih tekstilnih sistemov [1]. Na prehodu v tretje tisočletje pa postajajo vedno bolj pomembna predvsem tri znanstvena področja: nanostruktura, informacijska znanost in molekularna biologija, ki z intenzivnim razvojem skušajo preoblikovati tudi tekstilno-tehnološke procese plemenitjenja in razviti nove proizvode s specifičnimi in novimi (posebnimi) področji uporabe [2]. Najpomembnejšo vlogo imata nedvomno encimska in genska tehnologija (biotehnologija), ki skupaj s tekstilnim plemenitjem, tekstilno kemijo in tehnološkim procesom ustvarjata nove t.i. bio-tekstilije.

Takšne spremembe so rezultat tako vedno večje potrebe po prestrukturiranju in reorganizaciji tekstilne industrije [2] kot vedno večjih ekoloških zahtev, strožjih okoljevarstvenih predpisov in zakonov [3] ter ekološke osveščenosti potrošnikov zaradi negativnega vpliva industrijske aktivnosti na okolje. Poleg kakovosti proizvoda imata vedno pomembnejšo vlogo njegova humano-toksikološka in ekološka neoporečnost in proizvodni proces, ki sloni na čistih, energetsko in materialno varčnih tehnoloških postopkih.

V tekstilni industriji se zaradi visoke porabe vode (Nemčija 1997: okrog 40 milij. m³), energije (večina procesov se odvija pri visokih temperaturah, okrog 90 °C) in kemikalij (alkalij, kislin, soli, barvil, organskih halogenidov, tenzidov) v klasičnih kemičnih procesih plemenitjenja v zadnjih desetih letih tako intenzivno preučujejo alternativni procesi, predvsem procesi, ki z izkoriščanjem naravnih virov uporabljajo neagresivne in ekološko popolnoma čiste spojine, t.j. »bio-pomožna sredstva« – encime in mikroorganizme [4]. S pravilno uporabo encimov namreč lahko občutno zmanjšamo porabo vode, energije in izhodnih surovin brez nastajanja stranskih odpadnih produktov ter s tem omogočimo ustvarjanje ekonomsko donosnejšega in ekološko sprejemljivejšega procesa.

Biotehnologija ob svojem naglem razvoju in istočasnih ekoloških in ekonomskih vplivih tako nedvomno prehaja v svoje najbolj razburljivo obdobje izkoriščanja in uporabe v številnih industrijskih procesih. To je tudi vzrok za povezovanje številnih univerz in raziskovalnih inštitutov z raziskovalno-razvojnimi ekspertnimi skupinami v industriji v zmeraj nove raziskovalno-aplikativne projekte.

2.0 ENCIMI, STRUKTURNO-FUNKCIONALNI ODNOS

2.1 Opredelitev

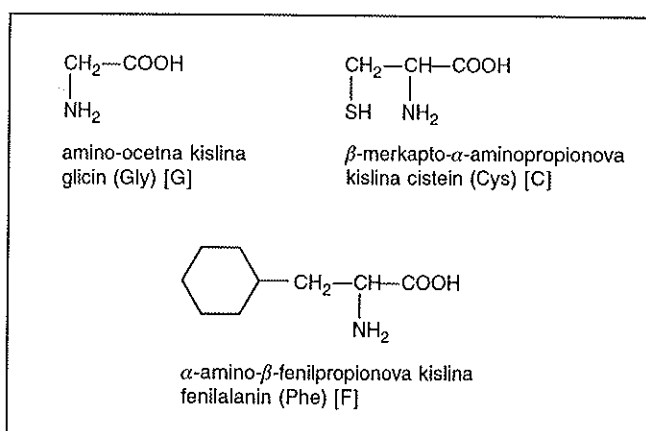
Encimi (gr. *zymae* – droži) ali fermenti (lat.) so *beljakovine* živih celic, sposobne katalizirati biokemijsko reakcijo, zaradi česar jih imenujemo tudi bio-katalizatorji (gr. *bio-* življenjski oz. biološki, katalizator – pospeševalec kemične reakcije). Encimi torej spreminjajo (cepijo ali hidrolizirajo oz. tvorijo ali sintetizirajo) kemične vezi drugih spojin, ne da bi se pri tem sami porabili ali spremenili. [5, 6]

Beljakovine so temeljne sestavine celic živih organizmov, saj kot katalizatorji sodelujejo v skoraj vseh življenjsko pomembnih procesih (kemijskih pretvorbah) tako, da z zniževanjem aktivacijske energije pospešujejo posamezne reakcije ali omogočajo njihov potek. Vsak encim deluje specifično (*stereo-* in *regio-* specifično), kar pomeni, da je prilagojen za natančno določeno funkcijo.

2.2 Kemična zgradba

Beljakovine in encimi

Beljakovine so polimeri 20-ih različnih in s peptidno (amidno) vezjo (C–N) medsebojno povezanih L- α -aminokislin (–NH–CHR_x–CO–NH–CHR_{x-1}–CO–), ki predstavljajo njihovo primarno strukturo [5, 6]. Za *aminokislino* sta značilni amino (–NH₂) in karboksilna (–COOH) skupina, vezani na istem ogljikovem atomu v L-konfiguraciji, ter stranska veriga z različnimi funkcionalnimi skupinami, kot jih imajo različni alifatski ali aromatski ostanki. Nekaj enostavnih primerov α -aminokislin in njihovo trivialno poimenovanje (poimenovanje, skrajšano na prve tri črke celotnega imena ali eno samo črko) je prikazanih na sliki 1. Za α -aminokislino je značilna asimetrična ali optična aktivnost: pri njihovi laboratorijski sintezi nastaja racemat, medtem ko se v živih organizmih nahajajo izključno v L-konfiguraciji; nasprotno D- α -aminokislino niso biološko aktivne in so škodljive.



Slika 1: Primeri L-aminokislin z njihovim kemičnim imenom, tri-črkovno oznako (v okroglem oklepaju) in eno-črkovno kodo (v oglatem oklepaju) [5, 7]

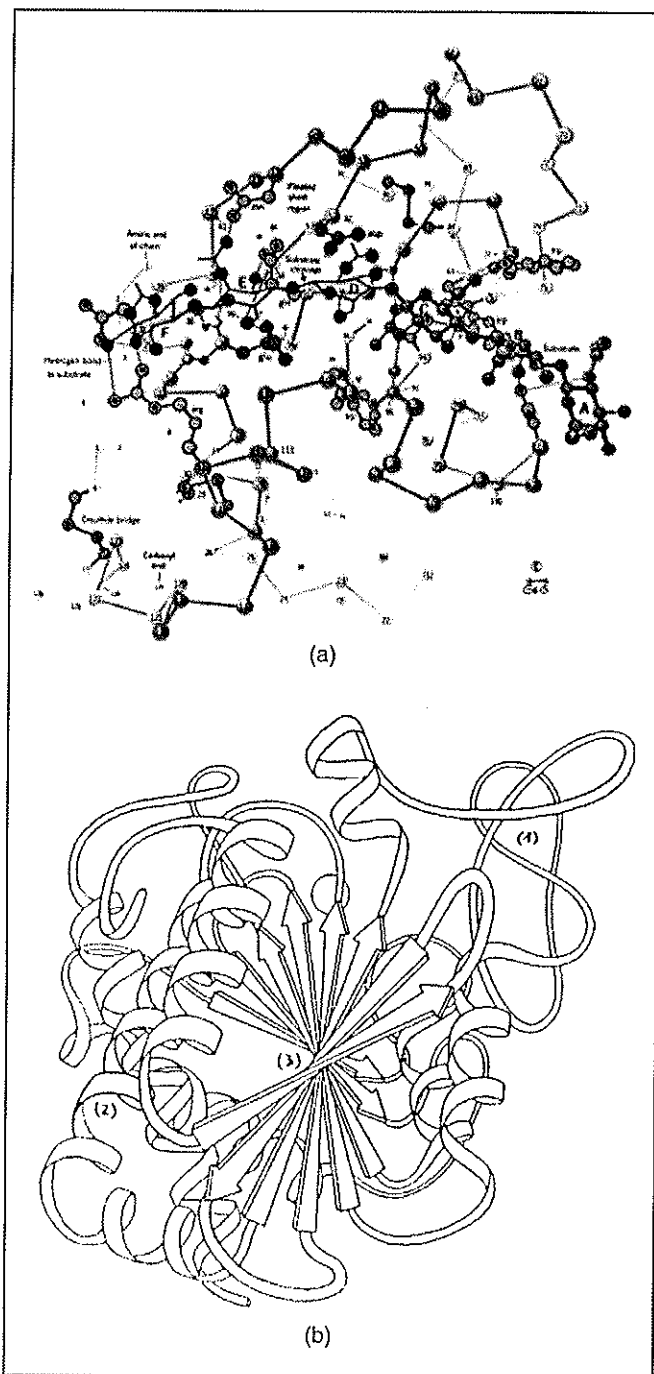
Prostorsko orientacijo (konformacijo) polimerne verige aminokislin pojasnjujejo sekundarna, terciarna in kvartarna struktura [8, 9, 10].

Posamezni segmenti polipeptidne verige se med seboj intramolekularno povezujejo s sekundarnimi nekovalentnimi vezmi (vodikovimi, van der Waalsovimi, elektrostatičnimi in hidrofobnimi vezmi) v – za vsako beljakovino specifično tridimenzionalno (3D) kompleksno strukturo (terciarno strukturo) – *globulo* s premerom od 5 do 50 nm (sl. 2-a). Poznani so različni principi izgradnje takšne strukture, odvisno od prisotnosti stranskih verig. Pri beljakovinah je najpomembnejša α -vijačnica (α -helix), pri kateri se peptidne verige zvijajo v obliki spirale okrog valja tako, da so posamezne $-\text{NH}_2$ in $-\text{COOH}$ skupine razporejene ena nasproti druge v določenem razmiku, običajno v razmiku 3,6 aminokislinskih ostankov na zavoju. Pri drugi, *cikcaka-sto nabrani ali nagubani strukturi* (imenovani β -struktura) so posamezne polipeptidne verige, ki lahko tečejo v nasprotni ali isti smeri, vzporedne in povezane z vodikovimi vezmi. Globularni proteini vsebujejo različne količine teh dveh struktur in tudi posamezne dele neurejene strukture. Filamentarni proteini, takšen je npr. *kolagen*, ki ima tri polipeptidne verige, ovite drugo okrog druge tako, da so nepolarne stranske verige usmerjene v notranjost, polarne stranske verige pa se nahajajo na površini molekule in so odgovorne za njeno topnost (tvorijo vodikove vezi z molekulami topila).

Elementi sekundarne strukture v globularnih proteinih so: krajši ali daljši α -heliksi, področja nagubane površine oz. β -strukture in posamezni deli neurejene strukture (sl. 2-b). Terciarna struktura upošteva prostorsko razvrstitev stranskih verig, ki jo opredeljujejo sistematično razporejene aminokisliline, spiralni polipeptidni segmenti in intramolekularna povezovanja ter sestoji iz določenega števila prostorskih področij oz. »domen«. Pri daljših polipeptidnih verigah (>180 aminokislin) se le-te nabirajo v dveh, treh ali štirih domenah. Kvartarno strukturo vzdržuje intermolekularno povezovanje več polipeptidnih verig. Stabilnost kvartarne strukture je odvisna od njihovega medsebojnega delovanja – interakcij (morebitne prisotnosti koencima) in zunanjih pogojev (T, pH, topilo).

Pri večini industrijsko uporabnih encimov se okoli 25 % vseh aminokislinskih ostankov nahaja v α -vijačnici, ki je sestavljena običajno iz 12-ih aminokislin in ima na površini makromolekule encima hidrofилne stranske verige.

V nevtralnem pH območju se proste aminokisliline nahajajo kot dipolarni ioni z negativno nabito karboksilno ($-\text{COO}^-$) in pozitivno nabito amino ($-\text{NH}_3^+$) skupino. Kisle aminokisliline vsebujejo dodatno vezan-o/e $-\text{COOH}$ skupin-o/e in dajo molekuli beljakovine negativen naboj, bazične aminokisliline pa vsebujejo dodatno vezan-o/e $-\text{NH}_2$ skupin-o/e in dajo molekuli beljakovine pozitivni značaj.



Slika 2: Slikovni prikaz (a) 3D-strukture in (b) prostorske razporeditve makromolekule encima [7] z (1) neurejenimi področji, (2) α -vijačnico in (3) β -strukturo

Proteini in proteidi

Različne možne kombinacije 20-ih aminokislin dajejo skoraj neomejeno število različnih živalskih in rastlinskih beljakovin z relativno molekulsko maso M_r od 5.000 do nekaj 100.000. Racionalna klasifikacija beljakovin danes še ni popolna, zato jih delimo splošno v dve skupini: enostavne beljakovine ali proteine in sestavljene beljakovine ali proteide (holoproteine). **Proteini** se nadalje delijo v globularne ali *sferoproteine* (albumini, globulini, histoni, protamini), za katere je

značilna okroglasta oblika molekul in topnost v vodi ter v ogrodne ali *skleroproteine* (keratini, elastini, glutini, kolageni), za katere je značilna pravilna zgradba nitastih molekul in netopnost v vodi. **Proteidi** so kompleksi, sestavljeni iz *beljakovinske komponente* (*apoproteina* ali apoencima), ki izbira substrat in *prostetične skupine* (*kofaktorja* ali koencima), ki določa, katera reakcija bo potekla; glede na to skupino ločimo: kromoproteine, nukleoproteine, glikoproteine, lipoproteine in metalproteine.

Po takšni razdelitvi so encimi običajno sestavljene beljakovine ali proteidi, ki jih lahko sestavlja tudi do nekaj 100 različnih aminokislin in katerih zaporedje določa strukturo in specifično delovanje posameznega encima. Nekateri encimi so sicer sestavljeni samo iz beljakovinskega dela (apoencima), večina pa jih potrebujejo za svojo aktivnost dodatno vezano prostetično skupino (kofaktor), ki je lahko neka anorganska (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , itd.) in/ali neka kompleksna organska molekula (koencim). Na encim močno in trajno vezan kofaktor imenujemo prostetična skupina, katalitično aktiven encim s kofaktorjem pa *holoencim*. [6]

2.3 Razdelitev in nomenklatura

Pravila za nomenklaturu in razdelitev encimov [6, 9], ki jo je leta 1961 uvedla Komisija za encime pri mednarodni zvezi za biokemijo (*International Union für Biochemie*, IUB), opredeljujejo vsak dovolj dobro okarakteriziran encim z oznakama EC in specifično klasifikacijsko številko. To je pet števil, od katerih prva številka označuje njegovo glavno skupino, ostale dve številki njegove podskupine in četrta številka njegovo serijsko število znotraj druge podskupine. Npr. encim lipaza z oznako EC 3.1.1.3: skupina hidrolaz, podskupini karboksil-ester hidrolaze in glicerol-ester hidrolaze.

Imena encimov imajo običajno končnico -aza (amilaza, celulaza, proteaza), njihovi razgradni produkti pa končnico -oza (dekstroza, maltoza, glukoza, celuloza). Glede na njihov način delovanja jih na splošno delimo na *hidrolaze* (cepijo C-O in C-N vezi) in *desmolaze* (cepijo C-C in C-H vezi); predpona označuje delovanje encima (dehidraza) ali pa substrat, ki ga hidrolitično cepi (amilaza).

Glede na specifičnost biokemijskega procesa (vrsto katalitiške reakcije) pa encime delimo v šest glavnih skupin, ki se nadalje delijo v podskupine oz. pod-podskupine, odvisno od vrste nastanka ali cepitve kemijske vezi:

1. **Oksidoreduktaze (EC 1)**: encimi, ki s prenosom vodika ali elektrona delujejo v procesih oksidacije in redukcije ($AH_2 + B \leftrightarrow A + BH_2$, $Me^{2+} \leftrightarrow Me^0$); delujejo na -CRH-OH in -CRH-NH₂ skupine ter aldehid. Delijo se na štiri podskupine: *dehidrogenaze* (alkoholdehidrogenaze), *oksidaze* (omogočajo prenos vodika ali elektrona na molekularni kisik; citokro-

moksidaze, glukozaoksidaze, peroksidaze), *hidroksilaze* (fenilalanin-4-hidroksilaze), *oksidogenaze* (uvajajo kisik v spojino; mono/di/tri-oksigenaze) in *reduktaze*.

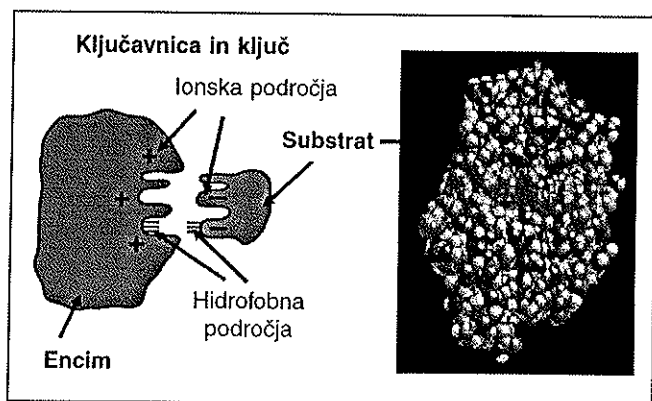
2. **Transferaze (EC 2)**: katalizirajo prenos atomske skupine med molekulama – donorjem in akceptorjem ($AB + C \leftrightarrow A + CB$); prenos ogljikove skupine, aldehydskih ali keto skupin, sladkorja ter spojin, ki vsebujejo N, P ali S.
3. **Hidrolaze (EC 3)**: katalizirajo reakcijo hidrolize ($AB + H_2O \leftrightarrow AOH + BH$); cepijo esterske vezi (*nukleaze*), glikozidne (*glikozidaze*), peptidne (*proteinaze*, *peptidaze*), C-N (*amidaze*), C-C, halogene- ali P-N vezi ob vezanju vode.
4. **Liaze (EC 4)**: nehidrolitsko katalizirajo reakcije eliminacije ob tvorbi dvojne vezi ($AB \leftrightarrow A + B$) ali reakcije adicije na dvojno vez. Glede na vrsto reagirajoče vezi se delijo na: C-C (*karboksilaze*, *aldolaze*), C-O (*hidrataze*), C-N in C-S vezi.
5. **Izomeraze (EC 5)**: katalizirajo prenos atomskih skupin znotraj določene molekule iz enega mesta na drugo ($ABC \leftrightarrow BAC$); delujejo na ogljikovodike (*recemaze* in *epimeraze*), interkonvertirajo proces aldoza – ketoza (*cis-trans izomeraze*, intramolekulske *oksidoreduktaze*) ali proces transferirajo (intramolekulske *transferaze* – mutaze).
6. **Ligaze – sintetaze (EC 6)**: tvorijo/sintetizirajo kovalentno vez med molekulami ob istočasni cepitvi visoko energijske vezi ($A + B + ATP \leftrightarrow AB + ADP + P_i$); katalizirajo nastanek C-O, C-S, C-N in C-C vezi.

2.4 Delovanje encimov

Encimi so katalizatorji, ki pospešujejo posamezne biokemijske reakcije oz. omogočajo njihov potek z manjšo aktivacijsko energijo (energijo, ki dovede molekule v reaktivno stanje), pri čemer ne postanejo del končnega produkta takšne reakcije, ampak se po zaključku le-te sprostijo in lahko sodelujejo v naslednji biokemijski reakciji. Aktivnost industrijskih encimov se postopoma zmanjšuje do stopnje neuporabnosti, ki je odvisna od procesa katalize in delovnih pogojev.

Za encime je značilno specifično delovanje [10], t.j. vsak encim izvaja le določeno in edino funkcijo na točno določenem mestu substrata. Del encima, kjer poteka kataliza, se imenuje aktivno mesto in sestoji iz ožjega katalitičnega centra in mesta vezave substrata (slika 3). Aktivno mesto encima je zelo majhno in togo (predstavlja le aminokislinski ostanek) ter odvisno od celotne tridimenzionalne strukture encima. Encim veže substrat ter ga dogradi ali pa razcepi na manjše molekule. Delovanje encima najenostavneje razložimo z znanstveno potrjenim modelom ključa in ključavnice: aktivno mesto encima (ključavnica) s točno definirano togo strukturo se lahko prilega le v za njega prilegajočo obliko substrata (ključ).

Pogoj za takšen kontakt je ozko – prostorska medsebojna bližina encima in substrata, zaradi česar je za takšno biokemično reakcijo značilna specifična kinetika, ki zahteva določeno ravnovesje (difuzija, vezava). Zaradi specifičnega delovanja in vključevanja v procese, ki jih katalizirajo, je učinkovitost encimov veliko višja pri uporabi surovih/čistih materialov.

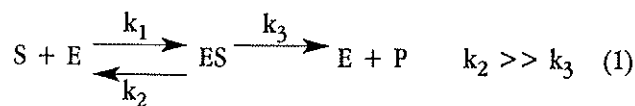


Slika 3: Mehanizem delovanja encima in primer cepitve heksasaharidnega substrata z lizocimom

Kvantitativna opredelitev – kinetika razgradnje

Aktivnost encima [8] nam pove, koliko substrata sodeluje v neki reakciji v določenem času in pri določeni količini encima, torej določa hitrost reakcije. Aktivnost encima je specifična in s termodinamičnega vidika odvisna od njegove sposobnosti znižanja aktivacijske energije pri reakciji ter s tem omogočanja hitrejše vzpostavitve ravnotežja med nastalimi vmesnimi produkti. Posamezne stranske verige v aktivnem centru beljakovine lahko sodelujejo v katalizi kot proton-akceptorske oz. kot proton-donorske skupine, npr. pri kislinsko-bazni katalizi.

Po Michaelis-Mentenini teoriji substrat (S) najprej tvori z encimom (E) kompleks encim-substrat (ES), ki omogoča katalizo reakcije in (pri tem lahko pride tudi do nastanka kompleksa encim-produkt (EP)); slednji za tem razpade na encim (E) in produkt (P). Kot je razvidno iz diagrama spremembe aktivacijske energije na sliki 4 je aktivacijska energija v vsaki posamezni fazi katalizirane reakcije veliko nižja od nekatalizirane reakcije, zaradi česar se hitrost reakcije poveča tudi za $10^8 - 10^{12}$ krat; ena encimska molekula lahko katalizira $10 - 10^3$ molekul substrata na sekundo [5, 13]. Veza substrata na encim je povezana s povečanjem urejenosti oz. s padanjem entropije, pri čemer se nastala energijska poraba kompenzira s spremembo entalpije, ki nastane pri tvorbi vodikovih vezi in pri hidrofobnih interakcijah. Takšne nekovalentne interakcije so torej odgovorne za nastanek vezne energije in posledično za močno zmanjšanje aktivacijske energije pri reakciji. Ker se encim pri reakciji ne porabi, je sposoben ponovno vstopiti v reakcijo s substratom:



k_1, k_2, k_3 – hitrostne konstante

Časovna odvisnost razgradnje substrata je opredeljena z naslednjo enačbo:

$$v = \frac{dS}{dt} = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

v – začetna hitrost reakcije

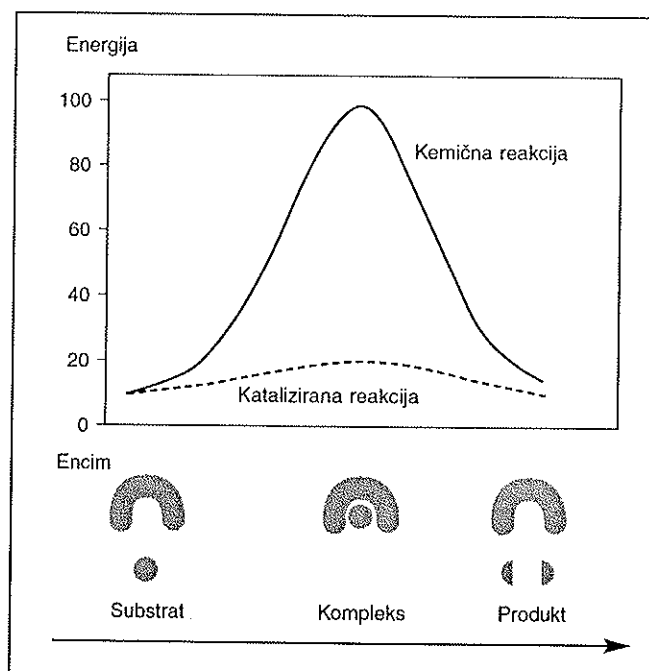
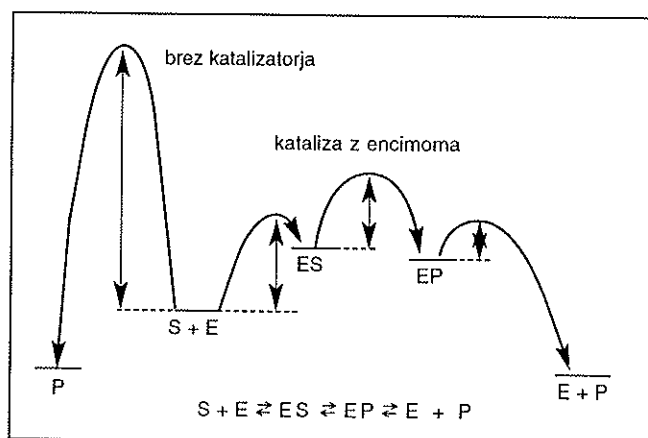
t – reakcijski čas

$[S]$ – koncentracija substrata S

K_m – Michaelis-Mentenova konstanta (karakteristika substrata)

V_{max} – teoretično maksimalna hitrost razgradnje (karakteristika substrata)

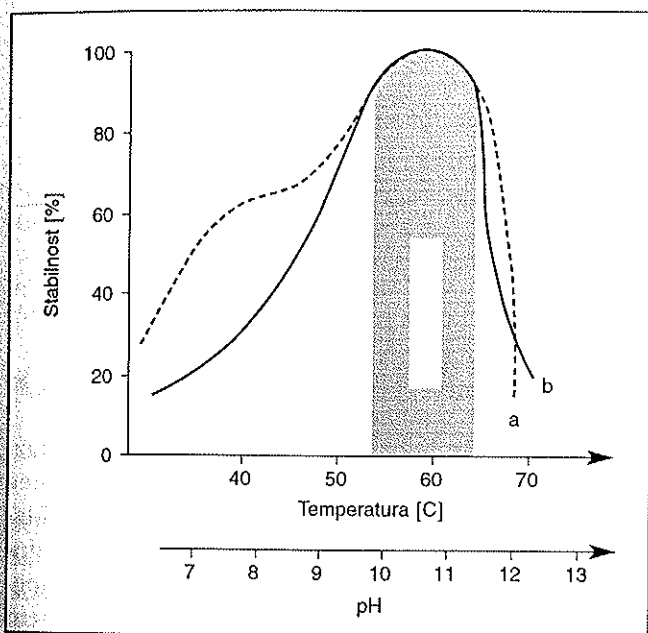
Enačba velja, dokler je reakcija v dinamičnem ravnotežju, kar pomeni, da je koncentracija ES nespremenjena.



Slika 4: Diagram spremembe energije v encimsko katalizirani reakciji [5, 8]

Stabilnost encimov

Med približno 3200 [9] do sedaj identificiranih encimov je za vsakega značilna specifična katalitska aktivnost, ki zahteva ustrezne delovne pogoje, predvsem temperaturo in pH medij. Nasprotno, skrajni pogoji obdelave povzročijo razgradnjo tridimenzionalne strukture encima – denaturiranje in posledično vplivajo na njegovo aktivnost. Večina encimov namreč optimalno deluje v temperaturnem območju med $T = 30 - 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in v alkalnem pH mediju [7] (slika 5). Za določene kemijske aplikacije je razvitih že nekaj skrajno stabilnih encimov, ki so aktivni tudi pri precej višjih temperaturah (tudi do $100\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sicer pa je stabilnost encima odvisna tudi od tlaka, mehanskega delovanja, prisotnosti nevtralnih soli, organskih topil, glicerola, določenih ligandov itd.



Slika 5: Vpliv (a) pH in (b) temperature na stabilnost encima proteaze [8]

3.0 PRIDOBIVANJE INDUSTRIJSKIH ENCIMOV [9, 14]

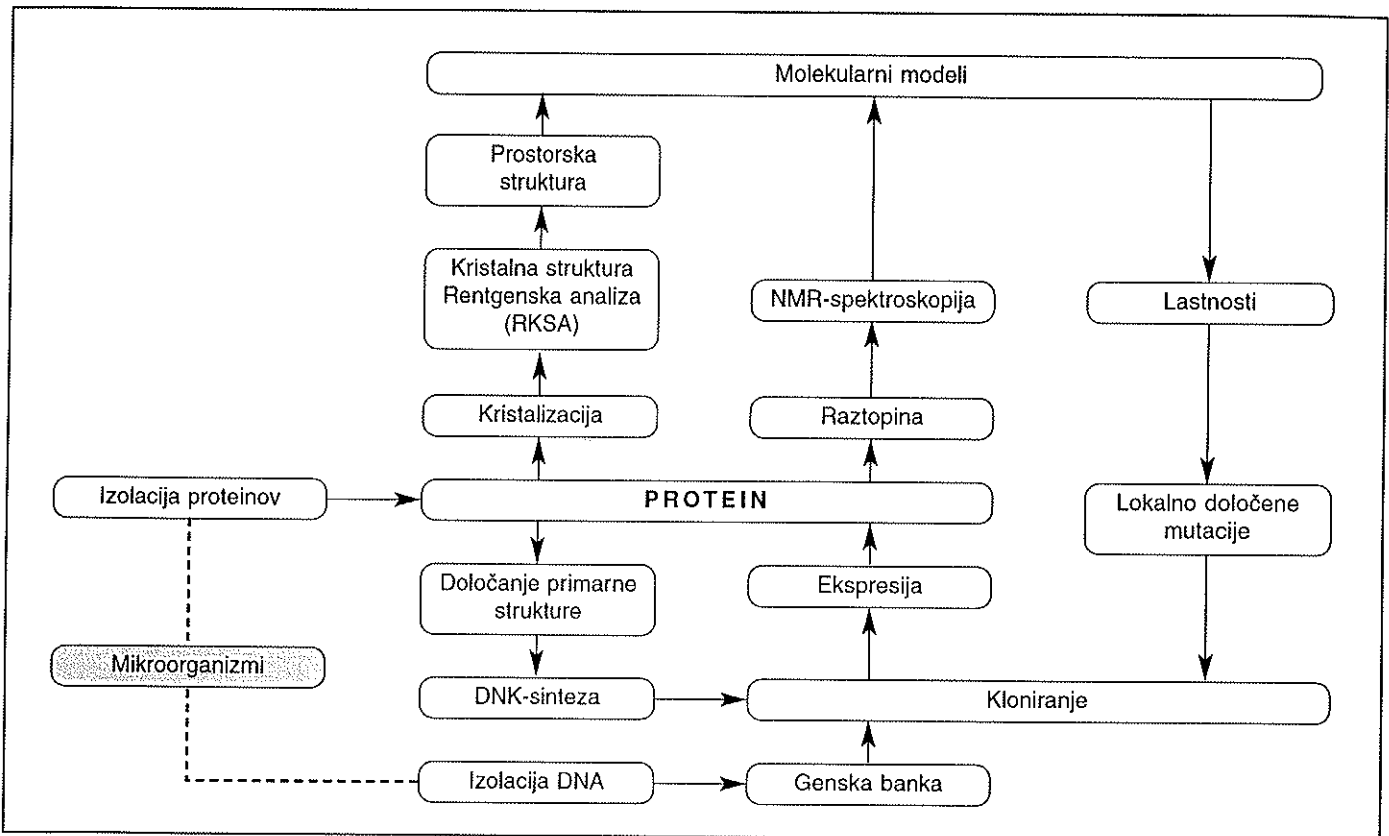
Najbolj produktivni proizvajalci encimov so mikroorganizmi. Za pridobivanje encimov uporabljajo predvsem bakterijo *Bacillus subtilis* ali glivo *Aspergillus oryzae* (preglednica 1) zaradi ugodnih in nezahtevnih pogojev razmnoževanja, visokih proizvodnih zmogljivosti in popolne neškodljivosti/nestrujenosti za ljudi; sicer pa so proizvajalci mikroorganizmov tudi različni enocelični organizmi in alge. Za masovno proizvodnjo določenega encima je potrebno najprej s fermentacijo ustvariti nekaj milijard izbranih mikroorganizmov. Proizvodnja nato poteka v reaktorju brez svetlobe in z vsebnostjo do 30 ton osnovnih surovin

pod točno določenimi pogoji; pH, temperaturo in tlakom. Ker po zaključenem procesu ostane v reaktorju velika količina neuporabljene hranilne snovi (nutrienta), vode, mikroorganizmov in še uporabnih encimov, je potrebno ločevanje posameznih sestavin s pomočjo filtracije v velikem valju. Filter, prevlečen s tankim slojem voska, omogoča penetracijo vode in encimov, medtem ko se hranilna snov in mikroorganizmi ujamejo na lepljivo površino voska. Za popolno ločitev encimov je potrebna še serija drugih filtrirnih procesov in evaporacija. Končna oblika encima, tekoča oblika ali granulati, je odvisna od njegove uporabe in želje kupca ter vpliva na njegovo obstojnost pri skladiščenju (encimi v obliki granulato ostanejo aktivni 1–2 leti, encimi v tekoči obliki pa največ eno leto). Po končanem proizvodnem postopku se preostali mikroorganizmi uničijo s segrevanjem in se skupaj z neuporabljeno hranilno snovjo lahko uporabijo kot površinsko gnojilo na poljih.

3.1 Vloga genetskega inženiringa [9, 11]

Iskanje novih encimov, predvsem pa izoliranje določenega encima, je zelo zahteven in dolgotrajen postopek, saj lahko samo en mikroorganizem pri ustreznih pogojih proizvede tudi več kot 1.000 različnih encimov. Ker encimi in beljakovine niso živi organizmi in torej ne vsebujejo genov (zaporedja nukleinskih kislin, DNK zaporedja), je za masovno proizvodnjo določenega encima potrebna predhodna genska modifikacija (transformacija) mikroorganizma, ki je nato sposoben proizvesti veliko količino izbranega encima. Vsak posamezni gen v genetskem materialu mikroorganizma vsebuje namreč kodo za proizvodnjo določene beljakovine ali encima in s tem način njegovega delovanja.

Razvoj proteinskega inženiringa v devetdesetih letih se je izkazal kot visoko učinkovita metoda, uporabna pri iskanju novih, po naravni poti spremenjenih encimov in njihovi masovni proizvodnji, saj omogoča zamenjavo določenih aminokislin v encimu in njihov prenos iz ene vrste celic v drugo oz. iz enega organizma v drugega. V zadnjem času razvit nov sistem kloniranja ne zahteva predhodnega znanja o zaporedju nukleinskih kislin v aktualnem encimu. Sistem omogoča kombiniranje heterolognih genov določenega mikroorganizma s simultano zamenjavo-izmenjavo posameznih delov DNK [9]; v zadnjih nekaj letih je samo Novozymes na takšen način kloniral več kot 300 novih encimov. Nadalje, poznavanje 3D-strukture proteinov (slika 2) omogoča natančen prikaz encima in s tem določitev položaja posameznih aminokislin v prostoru. S takšnimi informacijami je omogočeno modeliranje in vnaprejšnje napovedovanje funkcionalnih lastnosti encima ob spremembi ene ali več aminokislin. Ciklični potek ustvarjanja proteinov oz. proteinskega inženiringa je prikazan na sliki 6.



Slika 6: Ciklus proteinskega modeliranja [9]

Uporaba genskega inženiringa tako ob boljšem nadzoru kataliznega procesa (specifičnosti in učinkovitosti katalitske reakcije) omogoča proizvodnjo encimov z višjo stopnjo čistosti in kvalitativno spremenjenimi lastnostmi (boljšo učinkovitostjo, višjo toplotno stabilnostjo, višjo aktivnostjo pri višjih pH vrednostih, višjo stabilnostjo do težkih kovin in oksidacijskih sredstev, daljšo časovno stabilnostjo) oz. odstranitev neželenih lastnosti ter posledično vpliva na znižanje porabe izhodnih surovin, energije in vode ter prinaša veliko ekološko prednost tako za okolje kot za potrošnike. Na tržišču je že razmeroma veliko genetsko modificiranih industrijskih encimov, kot so npr. proteazni encim Everlase™ (Novo Nordisk), amilazni encim Duramyl™ (Novo Nordisk) ter Maltogenaza in Lipolaza (Novozymes). Od leta 1997 je samo Novozymes razvil že več kot 48 novih mikroorganizmov, ki proizvajajo encim celulozo.

4.0 TEHNOLOŠKA UPORABA ENCIMOV IN EKOLOŠKI POMEN

Svetovna industrija se danes srečuje z brezmejnimi izzivi, kako ob hitrem naraščanju potreb prebivalstva zaščititi okolje. Istočasno je vse večja okoljevarstvena zavest prebivalstva privedla do vedno bolj intenzivnega iskanja čistejših in učinkovitejših tehnologij, ki so primarno usmerjene v:

- čim manjše onesnaževanje okolja,

- razvoj varnih in čistih tehnoloških procesov ob čim manjši porabi virov in energije ter
- razvoj manj nevarnih, ekološko prijaznejših in energetsko učinkovitejših izdelkov.

V zadnjih desetletjih se je uporaba encimov zelo razmahnila saj predstavlja alternativno naravno rešitev tako za industrijsko tehnološke kot za okoljske probleme. Zaradi njihovih prednosti, kot so možnost nadomeščanja agresivnih kemikalij, znižanje visokih temperatur in tlaka v določenih procesih predelave ter s tem zmanjšanja porabe vode in energije, predstavljajo resnično podporo okolju, industriji in življenjskemu standardu. Kot popolnoma biorazgradljivi pa istočasno ne ustvarjajo škodljivih stranskih produktov niti v tehnoloških procesih niti v vodnem okolju ter se kot del narave, kjer jih mikroorganizmi zelo hitro razgradijo na aminokislino, nadalje uporabijo pri izgrajevanju novih življenjskih struktur.

V preteklosti so se encimi uporabljali izključno za katalitsko transformacijo organskih spojin, tako v laboratorijskih eksperimentih kot v industriji. Širok razpon in uporaba encimov predvsem v prehranski industriji in industriji tenzidov sta pripeljala do današnje uporabe encimskih katalizatorjev tudi pri sintezi kompleksnejših molekul (npr. glikozattransferaz pri tvorbi ciklodekstrinov iz enostavnih molekul škroba ali oksidaz pri sintezi indigo barvila) in v proizvodnji enostavnih molekul (molekul barvila) ali pri selektivni cepitvi mešanice več molekul. Takšne biološke reakcije so podpr-

te s kiralnostjo (sposobnostjo sučnosti [15]) aminokislilin, na osnovi katere se njuni enantiomeri razlikujeta v biološki aktivnosti (npr. ena stereoizomerna oblika privede do zelene kemične reakcije, druga pa ostane nevtralna ali pa ima celo škodljiv učinek). Neomejeno število kombinacij naravnih in industrijskih encimov prinaša velike možnosti v razvoju novih encimov, kar pa zahteva natančnejše raziskave in primerno znanje določanja reakcijske kinetike. Za aplikativno usmerjeno encimologijo predstavlja pojasnjevanje relacij med molekularno strukturo encimov in njihovim katalitskim delovanjem enega izmed najpomembnejših izizov današnjih raziskav.

Kot je pričakovati, bo encimska tehnologija sposobna zagotoviti nekaj takšnih alternativ in uspešno zamenjati kar nekaj kemičnih industrijskih procesov; npr. v predelovanju škroba so encimi že dokaj uspešno zamenjali močne kisline in visoke temperature. Po predvidevanju večine strokovnjakov sloni prihodnost industrijske proizvodnje izključno na uporabi encimov v vseh njenih fazah kljub njihovi razmeroma visoko občutljivi strukturi, ki otežuje takšno vključevanje; med danes poznanimi 3200 (1992 [9]) industrijskimi encimi jih je le okrog 75 vključenih v industrijski proces [2]. Iskanje stabilnega encima oz. metode za stabiliziranje procesa je tako glavna domena današnjih znanstvenih raziskav.

4.1 Uporaba encimov v tekstilnih procesih plemenitenja

Uporaba encimov v industrijskih tekstilnih procesih sega v leto 1857, ko se je za odstranitev amiloznega škroba iz tkanine pred tiskanjem uporabljal sladni ekstrakt [16]. Do leta 1912 je bila to še zmeraj edina komercialno razpoložljiva oblika encima diastaze. Leta 1900 je nemški Diaman Co., München predstavil Diastafor, ki je bolj učinkovito odstranil škrob in preprečil poškodbe, nastale s sicer uporabljeno žveplovo (VI) kislino. Z razvojem rapidaz leta 1919 se je razvoj presmeril izključno na to vrsto encimov, saj so bili sposobni razgraditi škrobne komponente v vodnih raztopinah.

Šele razvoj encimskega bio-inženiringa je omogočil učinkovito katalizno reakcijo pri različnih pogojih obdelave, temperaturi, pH in koncentraciji elektrolita. Do danes je tako razvitih že veliko industrijsko prilagojenih in komercialno razpoložljivih encimskih produktov za tekstilno industrijo, saj spada med največje industrijske onesnaževalce okolja. Zamenjava močnih ekološko neprijaznih kemikalij, sulfidov in apna pri obdelavi kože in usnja s proteazo je npr. zmanjšala porabo vode in energije za okrog 40 % in istočasno izboljšala kakovost usnja. Leta 1913 je Röhm patentiral metodo za pranje beljakovinskih madežev s tkanin, po kateri od leta 1960 proteazni encimi v pralnih

sredstvih uspešno nadomeščajo agresivne kemikalije; po podatkih [11] samo Danska s 5 milijonsko populacijo zaradi znižanja temperature pranja od $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ prihrani na leto energijo v vrednosti 40.000 ton premoga. Encimi pri tem ne ustvarjajo nobenih stranskih produktov in torej ne onesnažujejo okolja. Z odkritjem celulaz leta 1970 so le-te uspešno vključene v mnogih pralnih sredstvih.

Strokovnjaki, industrija in raziskovalci intenzivno preučujejo nove industrijske postopke, ki bi bili neagresivni tako za tekstilna vlakna kot za okolje. Najpomembnejša zahteva vseh obdelovalnih operacij je odstraniti tradicionalno »agresivno in ekološko neprijazno obdelavo«, ki uporablja močne alkalije, kisline, oksidacijska in redukcijska sredstva ter ustvariti novo t.i. »čisto obdelavo«. S tem namenom so bila v letih med 1985 in 1990 tudi ustanovljena številna podjetja [11, 12], kot so Sunstar KK, Showa Denko KK, Kao Corpn, Procter & Gamble Co., Unilever, Novo Nordisk in druga.

Encimi so se izkazali zelo uporabni pri izboljšanju različnih proizvodnih metod, predvsem pri predobdelavah in apretiranju tekstilij [4, 9, 14, 16]. Celulaze so se izkazale zelo uporabne pri apretiranju celuloznih tkanin, predvsem jeansa zaradi doseganja modnega *stone-washed* videza in pri preprečitvi pilinga, izboljšanju otipa in čistosti barve bombaža (*bio-polishing*). Katalaze so uporabne pri razgradnji vodikovega peroksida, preostalega na bombažu po beljenju, proteaze pa v postopkih obdelave volne in pri degumiranju surove svile. Poleg hidrolitskih encimov kot so celulaze, amilaze, pektinaze (bio-izkuhanje) in proteaze (plemenjenje volne) se vse bolj preučujejo tudi možnosti uporabe ostalih encimov, predvsem oksidoreduktaz. Osnovne možnosti uporabe encimov v procesih tekstilnega plemenitenja glede na vrsto uporabljenega encima so prikazane v preglednici 1.

V evropski tekstilni industriji je uporaba encimov danes še zmeraj razmeroma nizka (razširjena je predvsem uporaba encima amilaze pri odstranitvi škrobnih sredstev ter celulaznih encimov v površinskih procesih naravnih vlaken), medtem ko je encimska obdelava tekstilij iz naravnih vlaken v ZDA široko uporabna že nekaj desetletij.

Poraba tekstilnih industrijskih encimov v ZDA je bila leta 1997 ocenjena na 27,1 milijonov \$ in bi naj po nekaterih pričakovanjih do leta 2006 z 2 % povprečno letno rastjo dosegla tudi 32,4 milijona \$ [16]. Težnja po uvajanju encimskih procesov v čim več fazah obdelave tekstilnih vlaken ni usmerjena samo na naravna vlakna, celulozna (bombaž, viskoza, liocel, ...) in beljakovinska (volna, svila), temveč se intenzivno usmerja tudi na področja sintetičnih vlaken (predvsem PES in PAC). Pri tem možnost uporabe encimov ne pomeni samo njihovo vključevanje v procese plemenitenja, temveč tudi v procese čiščenja, predvsem pa razbarvanja odpadnih voda.

Preglednica 1: Encimi, uporabni v procesih tekstilnega plemenitenja [4, 9, 16]

Skupina	Podskupina	Izvor	Vrsta	Delovanje – razgradnja	Področje uporabe
Oksido-reduktaze	Katalaze	<i>Micrococcus</i>	<i>M. lysodeikticus</i> <i>B. alkalophilus</i>	H ₂ O ₂ do H ₂ O in O ₂	– antioksidacija po beljenju s H ₂ O ₂
	Lakaze	<i>Bacillus</i> <i>Myceliophthora</i> <i>Polyporous</i> <i>Rhizoctonia</i> <i>Coprinus</i>	<i>M. thermophila</i> <i>P. pinsitus</i> <i>F. solani</i> <i>C. cinereus</i>	oksidativna polimerizacija aromatskih skupin	– barvanje
Hidrolaze	Amilaze – α-amilaze – β-amilaze	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformi</i> <i>B. cereus</i>	škroba do monosaharidov (glukoza)	– razškrobljenje – gospodinjstvo pranje in detaširanje v kemičnem čiščenju
	Proteaze – amino-, di- – karboksi- – endo-, ekso- – protein(d)- – kisle – prolinaze	<i>Bacillus</i> <i>Streptomyces</i> <i>Aspergillus</i> <i>Lactobacillus</i>	<i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. megaterium</i> <i>S. griseus</i> <i>S. fradiae</i> <i>A. niger</i> <i>A. oryzae</i>	beljakovin do aminokislin	– degumiranje naravne svile – oplemenitenje volne proti polstenju – doseganje boljše obarvljivosti volne – alternativa za karboniziranje volne – doseganje različnih otipov – pri pranju tekstilij
	Lipaze – endo-, ekso- – lipo-	Muco	<i>M. javanicus</i>	maščob v glicerol in maščobne kisline	– dodajanje detergentom – kemično čiščenje
	Pektinaze – endo-, ekso- – pektin-ilaze, esteraze	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>	pektinov do monogalakturonskih kislin	– odstranjevanje pektinov iz bombaža
	Celulaze – nevtr., kisle, alkalne – endo-, ekso- – gluko- – hemi-, itd.	<i>Trichoderma</i> <i>Humicola</i> <i>Penicillium</i> <i>Chrysosporium</i>	<i>T. reesei</i> <i>T. viride</i> <i>H. insolens</i> <i>P. verruculosu</i> <i>C. lucknowense</i>	celuloze do glukoze	– odstranjevanje nečistoč iz bombaža – povečanje mehko-be – obdelava površine barvanega blaga – dodajanje detergentom

Viri:

- [1] HEARLE, JWS. Introduction..*The Journal of the Textile Institute*, 2000, vol. 91, Part 3, p. 1.
- [2] KIEKENS, P. Tekstilna in oblačilna industrija v naslednjem tisočletju: kako naprej?. *Tekstilec*, 2001, let. 44, št. 3–4, str. 83–86.
- [3] DONLAGIČ, J. in GOLOB, V. Varovanje okolja in standardizacija s poudarkom na sistemu ravnanja z okoljem (ISO 14001). *Tekstilec*, 2001, let. 44, št. 3–4, str. 69–75.
- [4] QUANDT, C. in KÜHL, B. Einsatzmöglichkeiten und Optimierung enzymatischer Prozesse in der Textilveredlung. *Melliand Textilberichte*, 2000, vol. 81, no. 10, p. 834–836.
- [5] KARLSON, P. *Biokemija – udžbenik za studente kemije i medicine*. Zagreb : Školska knjiga, 1989.
- [6] PEČNIK, S. *Študija uporabe imobilizirane lipaze iz Mucor miebei pri sintezi monooleil glicerola : magistrsko delo*. Maribor : Tehniška fakulteta, 1992.
- [7] DORER, M. *Kemija II (organska kemija) : skripta*. Ljubljana : Biotehniška fakulteta, 1971.
- [8] ROUETTE, HK. *Lexikon für Textilveredlung*. Band 1, Laumann Verlag, Dülmen, 1995.
- [9] RUTTLOFF, H. *Industrielle Enzyme* :2. Aufl. Hamburg : Behr's Verlag GmbH & Co., 1994.
- [10] ATKINS, PW, CLUGSTON, MJ., FRAZER, MJ. in JONES RAY. *Kemija : zakonitosti in uporaba*. Ljubljana : Tehniška založba Slovenije, 1997.
- [11] Novozymes Biologicals, Inc. <http://www.novozymes.com/cgi-bin/bvisapi.dll/portal.jsp> [6. 11. 2001]
- [12] *Novozymes Biologicals, Inc.* <http://www.bi-chem.com/> [6. 11. 2001]
- [13] *Biotechnology, Enzyme technology : Vol. 7a*. Editor JF. Kennedy. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1987.
- [14] ZAVRŠNIK, T. Biološko plemenitenje s pomočjo encimov. *Tekstilec*, 1996, let. 39, št. 12, str. 277 – 286.
- [15] TIŠLER, M. *Organska kemija : 3. izdaja*. Ljubljana : Državna založba Slovenije, 1991.
- [16] CEGARRA, J. The state of the art in textile biotechnology. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 1996, vol. 112, November, p. 326 – 329.
- [17] CHENGHONG, L., LADISCH, CM. in LADISCH, MR. Pore characterization of cellulose enzyme treated cotton fabric. *Textile Research Journal*, 2001, vol. 71, no. 5, p. 407–414.

Prispelo/Received: 01-2002; sprejeto/accepted: 04-2002