

Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное агентство по образованию

ГОУВПО «Ивановский государственный химико-технологический
университет»

А.В.Чешкова

Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха

Учебное пособие

Иваново 2007

Чешкова А.В. Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха: Учеб.пособие для вузов.-И.: ГОУВПО ИГХТУ, 2007.-282 с.

В учебном пособии изложены основы биохимических процессов, описаны современные сведения о ферментах, их строении, механизме действия на природные полимерные субстраты различной природы. Представлены технологические схемы ферментативной и биохимической отделки целлюлозосодержащих, шерстяных текстильных материалов, кожи и меха. Включены методики определения каталитической и субстратной активности ферментов. Дана характеристика современных коммерческих ферментных препаратов.

Пособие предназначено для студентов химико-технологических и биохимических специальностей и должно способствовать более глубокому пониманию будущим специалистом сущности биохимических процессов, лежащих в основе ферментативных технологий отделки волокнистых материалов, возможностей комбинирования их с химическими процессами, грамотному прогнозированию технологического результата. Современные сведения представленные в учебном пособии позволят осуществить более полное освоение базовых учебных дисциплин, в частности, «Практические технологии отрасли», «Химическая технология и оборудование отделочного производства», «Теоретические основы отделочного производства», «Современные проблемы химической и биохимической технологии» специальности 240202 и магистров направления 240100, а также дисциплин «Теоретические основы применения биохимических препаратов», «Химическая технология текстильных материалов». «Химическая технология и биотехнология» при подготовке магистров по программе 550834.

Табл. 27.Ил.63.Библиогр.:	Назв.Ферменты и технологии для
текстиля, моющих средств, кожи, меха	

Печатается по решению редакционно-издательского совета ГОУ ВПБ «Ивановского государственного химико-технологического университета»

Рецензенты:

Ивановский Всероссийский научно-исследовательский текстильный институт; доктор технических наук Кузнецов В.Б.

Герасимов М.Н (доктор технических наук, профессор ГОУВПО «Ивановской государственная текстильная академия»

ISBN 5-9616-0199

© ГОУ ВПО ««Ивановский
государственный
химико-технологический
университет», 2007

Введение

Современное состояние и перспективы использования ферментов при подготовке текстильных материалов

Согласно основной концепции развития текстильного производства, заключающейся в создании тканей принципиально новой структуры, намечается увеличить долю полотен сорочечного, плательного и костюмного ассортимента, соответствующих тенденциям качества мировых стандартов. Критериями качества тканей нового поколения являются не только высокая износоустойчивость, прочность окрасок, высокая белизна, но и комфортность, гигиеничность и экологичность. Комплексное решение данной проблемы достигнуто путем формирования принципиально новых малозатратных и экологичных технологий с использованием биологически активных препаратов. За рубежом наиболее широко используются технологии «мягчения» тканей (25 %), на втором месте – технологии ферментативной расшлихтовки (17 %), «отбеливания» (14 %). На стадии разработок и промышленного апробирования находятся биотехнологии глянцеваания, биоминерализации, противоусадочной отделки, биолощения, карбонизации, модификации грубой шерсти, химических волокон . Современная микробиологическая промышленность и научно-исследовательские энзиматические лаборатории предлагают ферментные препараты различной активности, пригодные для глубокой конверсии примесей и загрязнений волокон растительного происхождения, а также поверхностной модификации волокон без существенного нарушения их структуры и прочностных характеристик . Первичный выбор гидролитических ферментов из широкого спектра ферментативных препаратов осуществлялся на основе определенных критериев. Препарат должен вырабатываться в промышленном масштабе, соответствовать сертификату качества, не содержать патогенных культур, иметь 100 % биорасщепляемость, отличаться стабильностью при хранении и эксплуатации в широком диапазоне температур (учитывая зимний и летний периоды времени, требующие особого хранения).

Использование биохимических катализаторов (ферментов) – один из возможных путей комплексного решения проблемы получения текстильных материалов улучшенного качества более рентабельным и экологически безопасным путем. В отличие от традиционно применяемых в текстильной промышленности реагентов они являются 100 % расщепляемыми веществами высокоселективного действия, проявляющими активность при низких температурах и в нейтральных средах. Формирование и реализация на практике новых подходов к построению технологий отделки текстильных материалов, где биохимические процессы дополняют или полностью заменяют химические, станут основой для создания химико-текстильного производства нового поколения.

В последние десятилетия достигнуты большие успехи в области теоретической энзимологии и технологии производства ферментов, расшифрован механизм действия ферментов на сложные природные субстраты, установлены закономерности функционирования полиферментных систем. Динамично развивается как зарубежное так и отечественное промышленное производство ферментных препаратов, пригодных для нужд текстильной промышленности.

На основе анализа каталитической и субстратной активности промышленно выпускаемых ферментов по отношению к многокомпонентным биополимерам, разработаны критерии их выбора для целенаправленной модификации натуральных волокон на различных этапах формирования и отделки текстильных материалов. Основными и первичными критериями выбора ферментов, пригодных для нужд текстильного производства, из множества биохимически активных препаратов, синтезируемых на основе бактериальных и грибковых микроорганизмов, определены:

- промышленное и стабильное производство, наличие сертификата качества;
- требуемая каталитическая активность;
- способность к модификации целевого субстрата в многокомпонентных системах (окрашенное или неокрашенное волокно, пряжа, ткань...);

- высокая стабильность в условиях эксплуатации и хранения;
- включение в каталог непатогенных культур;
- гарантия дерматологической безопасности.



Рис. 1. Методология создания ферментсодержащих ТБВ и биохимических технологий подготовки текстильных материалов

Решение проблемы создания полномасштабных производственных технологий подготовки на различных этапах формирования текстильных материалов, где биохимические процессы дополняют или полностью заменяют химические, невозможно без знания специфики действия ферментов, принципиальных отличий от химических катализаторов, условий применения, методов определения каталитической и субстратной активности. Современная

микробиологическая промышленность предлагает множество ферментов, пригодных для текстильной, меховой и кожевенной промышленности и производств моющих средств. Существуют производства, ориентированные на выпуск композиционных ферментсодержащих препаратов, в основном это составы поверхностно-активных веществ, стабилизаторов, активаторов и ферментов. Поэтому, выбирая препарат для создания или применения каких-либо технологий отделки следует учитывать этот факт (рис.1) .

Оптимизация температурно-временных параметров процесса подготовки, где первая стадия ферментативная обработка, а вторая пероксидное беление, проводилась по наиболее значимым качественным показателям, характеризующим технические свойства текстильного материала и определяющим потребительские качества полупродукта или тканей. Предложенная методология создания биохимических технологий, где ферментативные процессы определяют построение подготовки в целом, использована на всех этапах работы от создания текстильных вспомогательных веществ до внедрения разработок на производстве (рис.2).

Новые экономические условия, сложившиеся в России, ставят текстильную отрасль перед необходимостью поиска новых путей повышения конкурентоспособности продукции. Перед отраслью стоят задачи повышения качества продукции, снижения ее себестоимости при существующей структуре сырьевой базы. Особый интерес в сложившейся ситуации представляет возможность решения этих задач путем разработки новых и совершенствования уже существующих технологий, не требующих обновления парка оборудования отделочных предприятий, а также поиск относительно недорогих и высокоэффективных текстильных вспомогательных веществ.

Другой не менее важный аспект совершенствования технологий текстильной промышленности связан с экологическими проблемами – переходом на применение нетоксичных препаратов и снижением сбросов вредных веществ в сточные воды. Одной из альтернатив традиционным процессам подготовки и отделки текстильных материалов являются энзимные технологии.

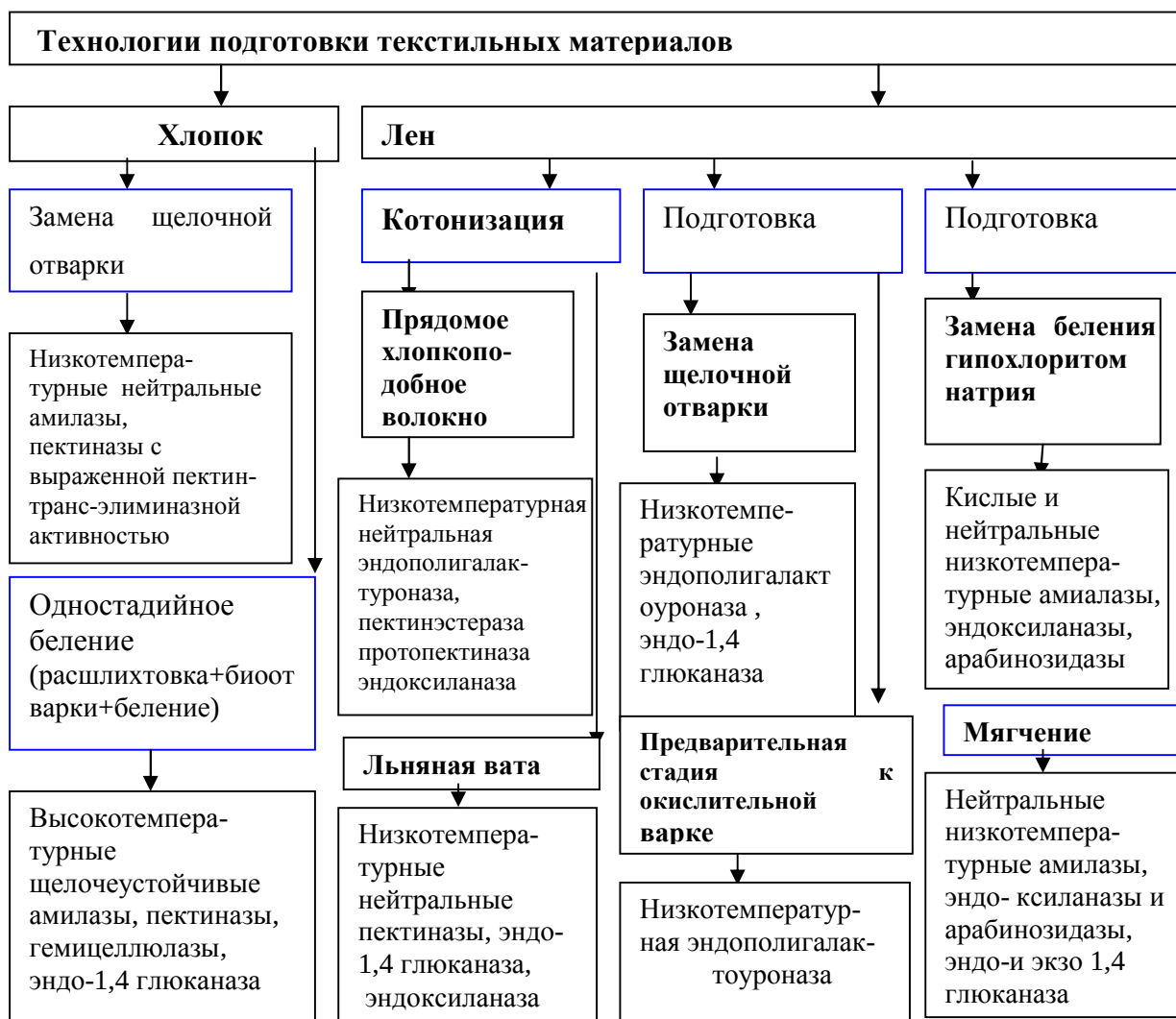


Рис.2.Области применения ферментов в технологиях подготовки целлюлозных текстильных материалов

Использование энзимов в производстве поможет решить такие важные

задачи текстильного производства, как:

- создание более чистого, мягкого, экологичного, неагрессивного и экономичного с точки зрения энергозатрат химического производства;
- более полная переработки низкокачественных натуральных (грубых шерстяных волокон, короткого льняного волокна) волокнистых материалов ;
- производство новых текстильных материалов, обладающих принципиально новыми свойствами, соответствующих по качеству требованиям и эстетическим вкусам современного потребителя.

Несмотря на широкое использование биопроцессов в различных отраслях народного хозяйства, внедрение биотехнологий в легкую промышленность сдерживается из-за отсутствия теоретически обоснованного выбора ферментов с учетом их избирательного действия на примеси льняного волокна, специфики совместимости ферментов в композиции или с другими химическими реагентами. Современная микробиологическая промышленность и научно-исследовательские энзиматические лаборатории предлагают ферментные препараты различной активности, пригодные для глубокой конверсии примесей и загрязнений волокон растительного происхождения, а также поверхностной модификации волокон без существенного нарушения их структуры и прочностных характеристик. Решение задачи практической реализации этих рекомендаций невозможно без всестороннего изучения особенностей биохимических превращений, полноты и скорости удаления примесей льняного волокна, выяснения изменений его структуры в процессе биообработки, научно обоснованного выбора ферментных препаратов и их композиций, а также оптимальных режимов осуществления биопроцессов в условиях текстильного производства.

Биохимические катализаторы (ферменты) сочетают свойства как гомогенных, так и гетерогенных катализаторов и новые совершенно уникальные качества:

- селективность (избирательность воздействия)
- 100 % биорасщепляемость (полная деструкция в сточных водах)
- «мягкие» условия проявления активности по отношению к субстрату (температура 30-70° С, рН среды – 4-9).

По данным Европейской организации экономической кооперации и развития (OECD) наиболее широкое применение биотехнологические процессы в текстильной технологии нашли в США и Германии. В текстильной промышленности стран Европы основные направления, по которым идет развитие биотехнологии, связаны с использованием ферментов при расщипловке (амилазами), антипиллинговой обработке и мягчении при

помощи целлюлаз, удалении остаточной перекиси водорода в процессах отбеливания с каталазами .

В России, на данный момент, ферментативные обработки применяются в основном для расшлихтовки. На стадии разработки, промышленного апробирования и внедрения находятся процессы мягчения, котонизации льняных материалов, совместного крашения и расшлихтовки, модификации грубоволокнистого сырья с целью повышения пряжесвойств, сорбционной восприимчивости к белящим реагентам и красителям (низкосортное льняное волокно, шерстяное волокно, целлюлозные и вискозные волокна).

Использование биотехнологических режимов в текстильной технологии требует высокой культуры производства. Необходимо учитывать, что ферментативные препараты эффективны в очень узких температурных пределах, несовместимы со многими химическими реагентами, имеют ограниченные сроки хранения и строгие условия эксплуатации.

Важно подчеркнуть, что натуральные волокна представляют собой биополимеры, состоящие из целого спектра субстратов различной природы. Биополимеры , в отличие от синтетических полимеров, образуются в процессе биосинтеза в клетках живых организмов и являются комплексом взаимно проникающих , физически и химически связанных между собой структур. Поэтому, при выборе фермента для создания конкретной технологии необходимо учитывать некоторые общие положения, характерные для ферментативной деградации компонентов биополимера или модификации структурообразующего биополимера. Во-первых, глубокая деструкция биополимеров происходит, как правило, под действием не отдельных ферментов, а полиферментных систем. Поэтому для обеспечения тополитического действия на волокнистый субстрат или с целью деструкции примесей волокнообразующего полимера необходимо применять определенный фермент, с известной активностью, или известные композиционные ферментативные составы. При использовании культуральных, мультисистемных составов требуется строгий контроль процесса

деградации многокомпонентного полимера. Во-вторых, если биополимер нерастворим, например, целлюлоза, гемицеллюлозы, кератин, многие гетерополисахариды, то важную роль в их деструкции играет адсорбция ферментов-деполимераз на поверхности субстрата. Во многих случаях растворимые продукты ферментативной деградации биополимера могут адсорбироваться на поверхности своего же исходного субстрата и ингибировать реакцию. Необходимо иметь в виду, что реакционная способность полимерного субстрата, как правило, убывает в ходе его ферментативной деградации, что зачастую приводит к фактическому прекращению реакции при неполных степенях конверсии исходного полимера.

Целлюлозосодержащие и шерстьсодержащие текстильные материалы перед процессами крашения, печатания и заключительной отделки подвергаются подготовке с целью придания гидрофильных свойств и белизны путем удаления природных примесей и искусственно нанесенных загрязнений (шлихты и замасливателей). Именно на стадии подготовки текстильного материала закладывается фундамент будущих технических и потребительских свойств изделий. В процессе подготовки необходимо не только удалить примеси, но и обеспечить условия для максимального сохранения структурообразующих волокон компонентов (целлюлозы или кератина). В области отделки текстильных материалов из природных волокон решение данной задачи возможно путем создания биохимических технологий, оптимально дополняющих химические методы воздействия на текстильный материал или полностью заменяющих их.

На данный момент сформированы различные подходы к построению биохимических технологий отделки текстильных материалов. Селективное воздействие ферментов на примеси и загрязнения волокна позволяет осуществить структурную модификацию биополимера, в результате которой изменяются в основном физико-химические, физико-механические, геометрические свойства волокна, сорбционная восприимчивость. При использовании технологий, в основе которых лежат процессы ферментативного

гидролиза целлюлозы или кератина шерсти, происходит модификация на молекулярном и надмолекулярном уровнях, следствием чего является изменение химических и физических свойств волокна, его реакционной способности. Поэтому выбор фермента или их композиций во многом определит степень и глубину биохимической модификации волокнистого материала и, как следствие, – результат операции подготовки.

1. Общие принципы строения и действия ферментов

Биохимия – одна из наиболее быстро развивающихся областей науки. Ее современные достижения находят широкое применение в различных отраслях промышленности, и поэтому вполне закономерно, что в последнее время специалисты все чаще обращаются к реакциям биоконверсии и ферментной деструкции полимерных субстратов – белков, полисахаридов, лигнина и других природных материалов. Изучение ферментов, их строения, свойств и механизма биологического действия составляет один из главных разделов биохимии и биоорганической химии. К настоящему времени охарактеризовано несколько тысяч ферментов, свыше тысячи из них получены в индивидуальном состоянии. Для многих сотен белков - ферментов выяснена аминокислотная последовательность, а самые известные из них расшифрованы до уровня полной пространственной структуры, в частности наиболее широко известна α -амилаза. На базе достижений в области исследования структуры органических соединений биологического происхождения и сформулированных основ исследования кинетики действия ферментов появилась возможность изучения их специфичности и создания принципиально новых технологических решений в сфере прикладных задач.

Решение проблемы внедрения биохимических технологий в текстильное производство, на первых этапах работы в этом направлении, несомненно, связано с исследованием свойств соответствующих ферментных и фермент-субстратных систем. Изучение теоретических основ химии ферментов,

представленных в научно-технической литературе, позволит определить нужное направление исследований, правильно осуществить выбор объектов экспериментов и сформулировать постановку частных задач.

В основе литературного обзора использована современная научно-техническая литература, охватывающая вопросы теоретических основ биоорганической химии и практического применения биохимических катализаторов в текстильных технологиях. В первом разделе литературного обзора кратко изложены основные постулаты биоорганической химии, сформулированные в трудах представителей академических институтов: МГУ, Московского института тонкой химической технологии им. Ломоносова, университетов Санкт-Петербурга, Новосибирска, Риги, Каунасса, Казани, Минска, Киева. Ведущие лаборатории, занимающиеся проблемами изучения биоорганической химии и, в частности, биохимическими катализаторами, представлены как отечественными (школа Овчинникова Ю.А., Клесова А.А., Анисимова А.А., Филиповича Ю.Б., Березина И.В., Синицына А.П и др.), так и зарубежными коллективами (Фёршт Э.Р, Элlefсен Е, Коэн Ф.Ф, Кивернсис Ю.Ю).

Ферменты – природные биохимические катализаторы селективного (узконаправленного) действия, протеины (белки) с молекулярной массой от десятков тысяч до миллиона и более, макромолекулы которых построены из аминокислот, соединенных в длинные цепи пептидными связями. Энзимы могут быть панкреатического (животного) происхождения или являться продуктами жизнедеятельности микроорганизмов (бактерии, грибы).

Являясь катализаторами, ферменты имеют ряд общих свойств с химическими, небиологическими катализаторами:

- не входят в состав конечных продуктов реакции и не расходуются в процессе катализа;
- ускоряют реакции, которые могут протекать и без них;
- не смещают положения равновесия реакции, а лишь ускоряют его достижение (рис. 3).

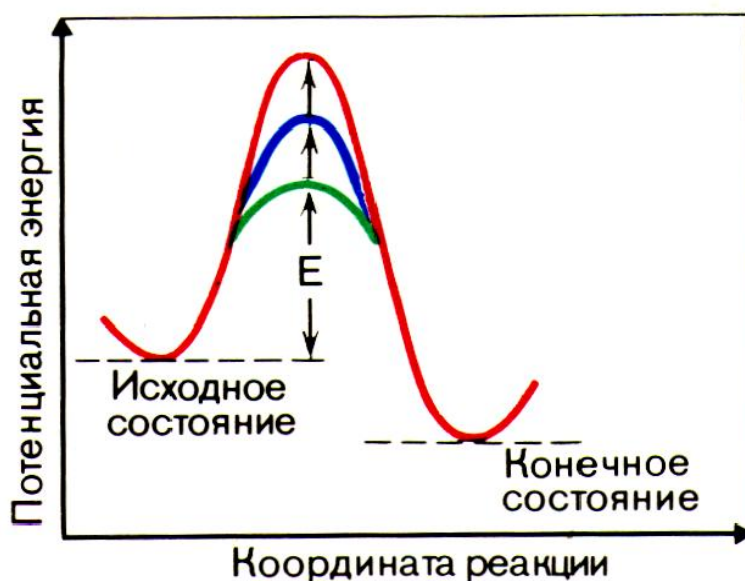


Рис.3 .Снижение энергии активации при неферментативном и ферментативном катализах

Для ферментов характерны и специфические свойства. Ферменты способны снижать энергию активации реакций в десятки и сотни раз. В отличие от неорганических катализаторов (кислоты, щелочи, окислители, восстановители и т.д.), ферменты проявляют селективное, т.е. избирательное каталитическое действие, участвуя в расщеплении или синтезе одного соединения, а в ряде случаев они влияют на превращение только одного типа связи, например, α -глюкозидной, β -глюкозидной, пептидной. Это свойство энзимов позволяет в современных биотехнологиях добиваться высокой конверсии конечного продукта и избегать побочных, нежелательных реакций и продуктов.

Ферменты отличаются очень высокой эффективностью, то есть высоким КПД, когда одна молекула фермента способна расщепить несколько миллионов молекул.

Как природные катализаторы ферменты «работают» в мягких условиях (температура 20-70 °С, среда близкая к нейтральной, атмосферное давление), что их выгодно отличает от неорганических катализаторов, чаще всего требующих жестких условий (давление выше атмосферного, температура выше 100 °С, среда сильно кислая или сильно щелочная). Однако для каждого из

ферментов температурный оптимум действия очень узкий. При повышении температуры более 70 °С происходит, как правило, денатурация белков, то есть изменение вторичной и третичной структур, и ферменты теряют свою активность. Денатурация не сопровождается разрывом ковалентных связей в полипептидной цепи макромолекулы фермента, а происходит расщепление дисульфидных мостиков, гидрофобных, ионных, водородных связей. Существуют термоустойчивые ферменты, активные при температурах от 80 °С до 110 °С. Некоторые фермента, например, каталазы активны при температурах от 0 до 10 °С.

Активность ферментов сильно зависит от рН среды, что связано с амфотерной природой белков и, следовательно, ферментов. Большинство ферментов имеют оптимальную активность при рН среды, близкой к нейтральной (5,0-8,0). Влияние концентрации водородных ионов на каталитическую активность ферментов выражается в разной степени воздействия ионов на активный центр. При разных значениях рН в реакционной среде активный центр может быть слабее или сильнее ионизирован, большее или менее экранирован соседними с ним фрагментами полипептидной цепи белковой части фермента. Кроме того, рН среды влияет на степень ионизации субстрата и продуктов реакции, определяя соотношение катионных и анионных центров фермента, что сказывается на третичной структуре белковой молекулы.

На активность и стабильность ферментов значительное влияние оказывает присутствие в системе фермент-субстрат нейтральных электролитов. В качестве активаторов могут выступать различные, специфичные для каждого из ферментов: ионы металлов Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , органические соединения. Некоторые ферменты образуют с ионами металлов устойчивые металл-комплексы. В образовании активных комплексов с субстратом ферменты белка принимают участие в состоянии, близком к изоэлектрической точке, то есть в форме биполярного иона $(^+H_3N)_n\text{-}\Phi\text{-(COO}^-\text{)}_m$. Ионы металлов повышают

устойчивость ферментов к изменению внешних факторов, защищают от денатурации белковую часть.

Ингибиторы тормозят действие ферментов. При необратимом ингибировании фермента ингибитор может не обладать структурным сходством с субстратом, но нарушает конформацию как фермента в целом, так и его активного центра. Одним из вариантов обратимого ингибирования может служить блокирование ферментов тяжелыми металлами (ртуть, мышьяк, свинец и др.), которые присоединяются к сульфгидрильным группам полипептидной цепи.

Неполярные алифатические и ароматические углеводороды разрушают внутримолекулярные гидрофобные связи белков вследствие прямого взаимодействия с их гидрофобными группами. Ионные детергенты, например додецилсульфат натрия, соединяются с противоположно заряженными группами белка. Электростатическое отталкивание оставшихся в пептидной цепи одноименно заряженных групп приводит к разрыву водородных связей и других слабых взаимодействий, стабилизирующих нативную конформацию белка.

На основе способности ферментов катализировать одну или несколько реакций одного типа принята их современная номенклатура. Ферменты сгруппированы в 6 классов в соответствии с типом катализируемой реакции. Знание класса и группы, к которым принадлежит тот или иной фермент, значительно облегчит целенаправленный выбор ферментов для решения конкретной практической задачи. Деление на классы осуществляется следующим образом:

- 1) оксидоредуктазы. Катализируют окислительно-восстановительные реакции;
- 2) трансферазы. Катализируют реакции переноса группировок с одного соединения на другое: $X \cdot R + Z \rightleftharpoons X + R \cdot Z$;
- 3) гидролазы. Ускоряют гидролитическое расщепление веществ: $X \cdot Y + H_2O \rightleftharpoons X \cdot OH + Y \cdot H$;

- 4) **лиазы.** Катализируют реакции негидролитического расщепления с образованием двойных связей или реакции присоединения по двойным связям;
- 5) **изомеразы.** Катализируют реакции изомеризации соединений;
- 6) **лигазы (синтетазы).** Ускоряют реакции синтеза с использованием энергии макроэнергетических соединений;

В пределах классов ферменты группируются в подклассы. Наименование фермента отражает название субстрата плюс окончание “аза”: амилаза- субстрат амилоза, мальтаза- субстрат мальтоза. Некоторые ферменты сохранили историческое название: трипсин, пепсин .

Общим механизмом для всех биохимических реакций, катализируемых ферментами, является образование промежуточного активного комплекса между ферментом (Ф) и субстратом (С), с которым происходят каталитические превращения. В качестве субстрата в гидролитических процессах выступают полисахариды, протеины, жиры и т. д. Та область ферментативной молекулы, в которой происходит связывание и превращение субстрата, называется активным центром. **Активный центр** образуется определенными боковыми радикалами аминокислотных остатков полипептидной цепи. Активные центры ферментов расположены в углублениях на поверхности ферментативной молекулы. Индивидуальные особенности строения активных центров различных ферментов обуславливают специфичность их действия. Многие группы в активных центрах ферментов функционируют как обобщенные :кислоты или основания воздействуют на субстрат, активируют его и тем самым увеличивают скорость катализа. В качестве обобщенных кислотно-основных катализаторов в активном центре действуют глутаминовая, аспарагиновая кислоты, гистидин, тирозин, лизин. В протонированной форме они являются кислотными катализаторами, в непротонированной – основными. Для ферментативных реакций большое значение имеет и электрофильно-нуклеофильный катализ. Сильным нуклеофилом является имидазольная группа гистидина, поэтому химическая модификация гистидина в составе активного

центра приводит к инактивации ферментов. К нуклеофильным группам относятся, например, ОН-группа серина, SH-группа цистеина.

Общую схему ферментативного катализа можно представить в следующем виде:

$$\Phi + C \longrightarrow \Phi C \longrightarrow \Phi + П$$

Фермент и субстрат образуют активный комплекс ΦC , обладающий более высокой реакционной способностью, чем исходный субстрат C , и превращающийся в конечный продукт $П$ с высвобождением катализатора фермента Φ .

Активность ферментов как белковых соединений обусловлена их специфическим строением, то есть первичной, вторичной и третичной структурами белка. Эта специфичность в строении ферментов определяет их комплиментарность, то есть химическое сродство, пространственное совпадение со строением субстрата. Все факторы, параметры, условия, которые будут способствовать проявлению комплиментарности и, следовательно, образованию активного комплекса, будут ускорять биохимическую реакцию с участием ферментов и, напротив, она будет замедляться, если условия будут препятствовать образованию активного комплекса.

Мягкие условия, в которых способны работать ферменты, позволяют создавать энергосберегающие технологии, не требующие создания дорогостоящего оборудования (автоклавы, жаропрочные и хемостойкие материалы).

1.2. Специфика действия амилаз, свойства, структура.

Ферментативная расшлихтовка тканей .

Амилазы относят к ферментам, катализирующим гидролитическое расщепление глюкозидных связей, т.е они относятся к подклассу гидролаз гликозидов (класс гидролаз). Существует несколько типов различных амилаз, например: **α -амилаза** (α -1,4-глюкан —4-глюканогидролаза) является ферментом, гидролизующим -1,4 глюкозидные связи в молекуле крахмала,

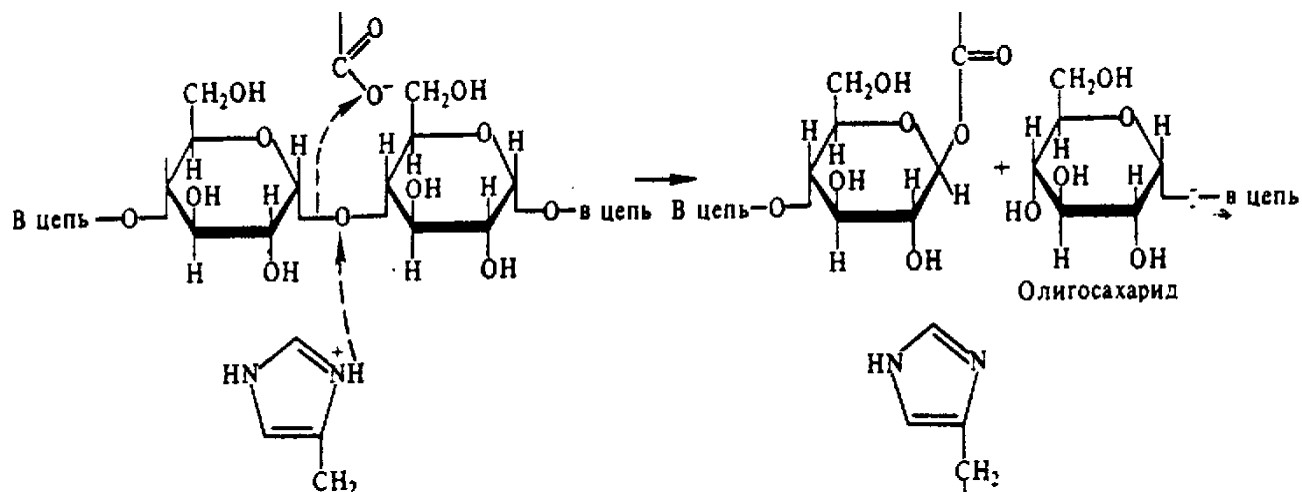
β-амилаза – фермент, катализирующий последовательное отщепление мальтозы от конца молекул крахмала и **глюкоамилаза** – фермент, осуществляющий последовательный гидролиз нескольких глюкозидных связей в одной молекуле субстрата. Молекулы амилозы, как правило, строго линейны. В них остатки α-D-глюкопиранозы связаны друг с другом исключительно α-1,4-глюкозидными связями, т.е. кислородные мостики возникают за счет глюкозидного гидроксила первого углеродного атома одной молекулы α-D-глюкопиранозы и спиртового гидроксила при 4-м углеводородном атоме другой. Амилопектин имеет сферические молекулы с радиусом вращения от 82 до 255 нм. Их сферическая форма обеспечивается тем, что молекула составлена из множества (нескольких сотен) коротких полиглюкозидных цепочек, каждая из которых в среднем содержит 20 остатков α-D-глюкопиранозы. В пределах каждой короткой цепи глюкозидные остатки соединены α-1,4-глюкозидными связями. Друг с другом цепи соединяются посредством α-1,6-глюкозидных связей.

В зависимости от характера фермента разрыв гликозидных связей между остатками α-D-глюкопиранозы в молекуле крахмала и присоединение по месту разрыва элементов воды (H и OH-группа) может происходить в различных позициях. Соответственно этому конечными продуктами гидролиза крахмала оказываются либо глюкоза, либо мальтоза, либо олигосахариды. Естественно, что в процессе постепенного укорочения молекулы крахмала в результате гидролитического отщепления моносахаридных, дисахаридных или олигосахаридных звеньев на какой-то ступени распада в качестве промежуточных продуктов возникают декстрины. Наличие и динамику их образования легко установить, прослеживая изменение окраски крахмала с йодом от синей до красно-бурой в процессе ферментативного гидролиза крахмала.

Активные центры амилаз образованы радикалами гистидина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, также тирозина. Последнему приписывают функцию связывания субстрата, а первым трем – каталитическую функцию.

В соответствии с представлениями о структуре активного центра амилаз предполагают на 1-м этапе следующий механизм распада гликозидных связей при их посредстве :

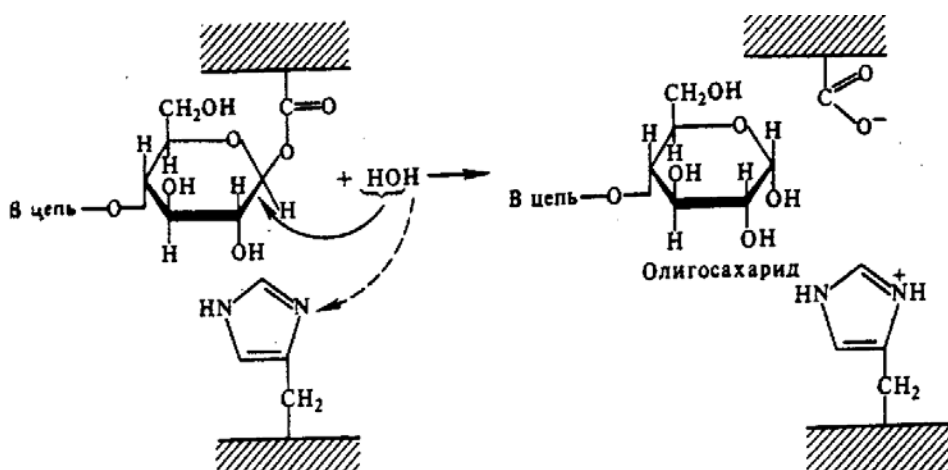
Радикал дикарбоновой аминокислоты активного центра



Протонированный радикал гистидина активного центра

На 2-м этапе в активный центр фермента входит молекула воды, присоединение OH-группы которой обеспечивает распад возникшей сложноэфирной связи и высвобождение радикала дикарбоновой аминокислоты; протон воды присоединяется к депротонированному на 1-м этапе радикалу гистидина:

2 этап



В результате восстанавливается структура активного центра фермента, и он готов к осуществлению следующего каталитического акта в гидролизе гликозидной связи. Есть достаточно оснований считать, что не только амилазы, но и все другие гликозидазы действуют в соответствии с приведенным выше механизмом.

Группа амилолитических ферментов, гидролизующих крахмал, включает: α -амилазу, β -амилазу, глюкоамилазу, изоамилазу, пуллулазу.

α -Амилаза (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза) является ферментом эндо-типа, гидролизующим α -1,4-гликозидные связи в крахмале и гликогене. Некоторые α -амилазы расщепляют α -1,4-связи в пуллулане, а в частности гидролизованном пуллулане также и α -1,6-связи. Примером является амилаза, выделенная из термофильного актинимомикета.

Действие α -амилазы на крахмал характеризуется быстрым снижением вязкости раствора и молекулярной массы олигосахаридов. Фермент имеет выраженное сродство к гликозидным связям, удаленным от конца молекулы. Атака субстрата носит случайный характер и может быть как единичной, так и множественной, когда от субстрата последовательно отщепляется несколько фрагментов. Гидролизу подвергаются олигосахариды, содержащие не менее 3 глюкозных единиц. При гидролизе амилопектина наряду с олигосахаридами линейного строения в продуктах гидролиза присутствуют α -декстрины, представляющие собой не затронутые реакцией разветвленные участки амилопектиновых молекул.

Различные α -амилазы при длительном воздействии на крахмал расщепляют его на смесь олигосахаридов с преобладанием характерных сахаров. Чаще всего основными продуктами гидролиза являются мальтоза, глюкоза, мальтотриоза.

Большинство α -амилаз проявляет активность в слабокислой и нейтральной средах. Известны продуценты кислой амилазы, относящиеся к р.р. *Bacillus*, *Clostridium*. Кислые амилазы имеют оптимум действия при pH 2...4. Некоторые штаммы *B. licheniformis* синтезируют фермент, активный в щелочной зоне, при pH 9,5. Амилазы микроскопических грибов имеют оптимум pH 4...5. Зона pH - стабильности исследованных α -амилаз широка. Так, фермент из *Bacillus* sp. АК-2 стабилен в зоне pH 5...12, из *B. stearothermophilus* – при pH 5...11, из *Clostridium* sp. – при pH 2...6.

Оптимальная температура для действия амилазы мезофильных штаммов микроорганизмов обычно не превышает 70 °С. Амилазы грибов имеют оптимум в интервале 45–60 °С. Термофильные бактерии могут синтезировать фермент с оптимумом 85–91 °С. Такие ферменты особенно ценятся в промышленном биокатализе.

α -Амилаза принадлежит к числу ферментов с достаточно высокой термостабильностью. Мезофильные бактерии продуцируют фермент, стабильный при температуре до 80 °С, чаще не выше 70 °С. Амилаза термофилов может обладать поразительной стабильностью. Так, амилаза *B.licheniformis*, выпускаемая в виде коммерческого препарата Термамил, в присутствии 1мМ соли кальция и 31,5 % крахмала не теряет активности при 90 °С, а при 100 °С время полуинактивации составляет более 3 часов. Амилаза термофильной бактерии V-2 в растворе, содержащем 10 мм хлорида кальция, сохраняет половину активности после инкубации при 93 °С в течение 15 минут. В обоих примерах присутствие соли кальция существенно для термостабильности, в первом стабилизатором является также крахмал. В отсутствие стабилизирующих добавок время полуинактивации амилазы *B.licheniformis* составляет не более 1 ч при температуре 70 °С, амилазы штамма V-2 – 15 мин при 74 °С. Амилазы кальций независимые (так называемые истинные), как правило, менее термостабильны, чем кальций зависимые .

Совершенствование технологии синтеза микробных амилаз идет по двум основным направлениям: создание препаратов высокой термостабильности для гидролиза клейстеризованного крахмала, и препаратов, пригодных для гидролиза сырого, неклеястеризованного крахмала. Второй путь обещает в будущем переход к низкотемпературному расщеплению крахмала, что существенно сократит энергозатраты и упростит аппаратное оформление процессов гидролиза в различных технологиях.

β -Амилаза (α -1,4-глюкан-мальтогидролаза) — фермент экзотипа, катализирующий последовательное отщепление мальтозы от нередуцирующего конца молекул амилозы, амилопектина, амилодекстринов. Фермент расщепляет

в крахмале только α -1,4-гликозидные связи. Амилоза гидролизуеться полностью. Минимальный расщепляемый фрагмент – Г4. От ветвей амилопектина отщепляется по 10-12 мальтозных остатков. Гидролиз амилопектина может идти до предпоследней связи, граничащей с точкой ветвления. Нерасщепленные фрагменты амилопектина носят название *b*-предельных декстринов. В результате гидролиза *b*-амилазой из крахмала образуется 54-58 % мальтозы и 42-46 % предельных декстринов. Мальтоза при отщеплении переходит в *b*-форму, что объясняет название фермента. *b*-Амилазу продуцируют высшие растения, микроорганизмы. Фермент содержится в непроросшем зерне и солоде злаковых культур. Солод злаков долгое время был единственным источником *b*-амилазы, используемым в практике. Зерновые *b*-амилазы наиболее активны при pH 4–6, стабильны при pH 4-8. Оптимальная температура действия 40-50 °C, зона термостабильности – не выше 60 °C. Зерновые *b*-амилазы – сульфгидрильные ферменты, их активность подавляют тяжелые металлы. Многие бактерии, в частности, бациллы синтезируют *b*-амилазу в значительных количествах. Фермент бацилл активен при pH 6-7,5, оптимальная температура действия фермента из разных штаммов колеблется в пределах 30-60 °C. Бактериальная β -амилаза стабильна при pH 5-9 и температуре не выше 55 °C. β -амилаза редко используется как индивидуальный фермент. Осахаривающая способность ее существенно увеличивается при сочетании с α -амилазой. Комплекс этих ферментов позволяет расщеплять крахмал на 94-96 % до мальтозы, помимо которой в гидролизате присутствует небольшое количество глюкозы и низкомолекулярные α -1,6-декстрины.

Глюкоамилаза (α -1,4-глюкан-глюкогидролаза) – экзофермент, катализирующий отщепление β -глюкозы от нередуцирующего конца амилозы и амилопектина. Глюкоамилаза расщепляет α -1,4, α -1,6 и α -1,3-гликозидные связи, с наибольшей скоростью α -1,4. Механизм гидролиза – множественная атака, то есть последовательный гидролиз нескольких гликозидных связей в

одной молекуле субстрата. Возможен и одноцепочечный механизм, когда фермент расщепляет все связи в одной молекуле. Глюкоамилаза гидролизует предпочтительно высокомолекулярный субстрат, низкомолекулярные олигосахариды расщепляются медленно.

Фермент имеет выраженную трансферазную способность, которая проявляется тем более чем выше степень гидролиза субстрата и концентрация глюкозы в реакционной среде. В результате трансферазных реакций накапливаются такие сахара, как изомальтоза, паноза, нигерооза, изомальтотриоза и другие. Появление этих продуктов снижает выход глюкозы. Поэтому в закрытой гидролитической системе теоретически невозможно достичь полного превращения крахмала в глюкозу под действием глюкоамилазы. В открытой системе, при удалении глюкозы, снижается интенсивность трансферазных реакций, повышается скорость гидролиза за счет снятия ингибирования продуктом реакции. В таких условиях можно достичь полного гидролиза крахмала до глюкозы с помощью одного фермента. Глюкоамилазы, продуцируемые микроскопическими грибами имеют максимальную активность при pH 4,3-5,7 и температуре 40-70 °C, фермент из *Asp.terreus* активен в зоне pH 2-8. Глюкоамилазы имеют низкую термостабильность, что не препятствует их применению для осахаривания декстринизированного крахмала. Глюкоамилазы мукоровых грибов гидролизуют крахмал на 95-100 %, фермент из пенициллов и аспергиллов – на 88-100 %.

α -Глюкозидаза (α -Д-глюкозид-глюкогидролаза) часто называемая мальтозой, является экзоферментом. Глюкозидаза гидролизует α -1,4-связи на нередуцирующем конце α -1,4-глюканов, отщепляя глюкозу в α -форме. Крахмал расщепляют не все α -глюкозидазы. Оптимальная температура действия фермента 35-55 °C.

Технические формы амилаз могут найти широкое применение в подготовке текстильных материалов (рис.4). Их применение позволяет совмещать операцию расшлихтовки с отваркой в непрерывных методах беления, поскольку препараты амилазы выдерживают высокую температуру (до 100 °C) и высокую щелочность (до pH 12). Перспективным направлением

использования амилалитических ферментов является интенсификация процесса крашения хлопка активными красителями . Амилазные комплексы могут быть использованы в таких технологических процессах текстильной промышленности, как:

- биохимическая модификация крахмальной шпихты;
- расшлихтовка тканей в ямах (рулонах) в мокроотжатом состоянии без подогрева;
- расшлихтовка тканей в среднетемпературных режимах (в термокамерах, запарниках);
- высокотемпературная расшлихтовка (100-120 °С), включая ассортимент тканей, подвергаемых опаливанию;
- приготовление крахмальной загустки печатных красок;
- модификация печатных красок с крахмальным загустителем для повышения степени фиксации красителей и облегчения промывки;
- приготовление компонента стабилизатора составов для ронгалитно-поташного способа печати кубовыми красителями и др.
- совмещенные режимы расшлихтовки и крашения смесовых и вискозных штапельных тканей.



Рис.4.Преимущества биохимических технологий подготовки

Некоторые препараты на основе амилаз работают при сравнительно низких температурах от 20 до 60 °С (Аквазим, Амилоризин Г10Х), другие от 30°С до 80 °С (Аквазим Ультра, Амилосубтилин ГЗХ), другие группа амилаз носит название термостойких, активность которых проявляется при температуре выше 100 °С (Термамил, Optisize НТ). Технологическая схема расшлихтовки с использованием Амилосубтилина заключается в пропитке в растворе препарата (0,1-12 г/л) при оптимальной температуре 30-70 °С вылеживании в “ямах” или “холодном” ЗВА (линия ЛЖО) или роликовой запарной камере (аппарат типа ВК-3, линия Вакаяма), или рулоне без подогрева в течение 20-60 минут. Использование термостабильных амилаз, способных проявлять активность при высоких температурах, рекомендуется для расшлихтовки хлопчатобумажных тканей и тканей из смеси хлопковых и полиэфирных волокон. Состав включает Biolase PLS 60 (или Термамил) – 1-2 г/л, Hostapal SF (или ПАВ неионногенного типа – 0,2-0,5 г/л), температура обработки 75-85 °С, pH-6,5 в течение 5-15 минут (табл. 1).

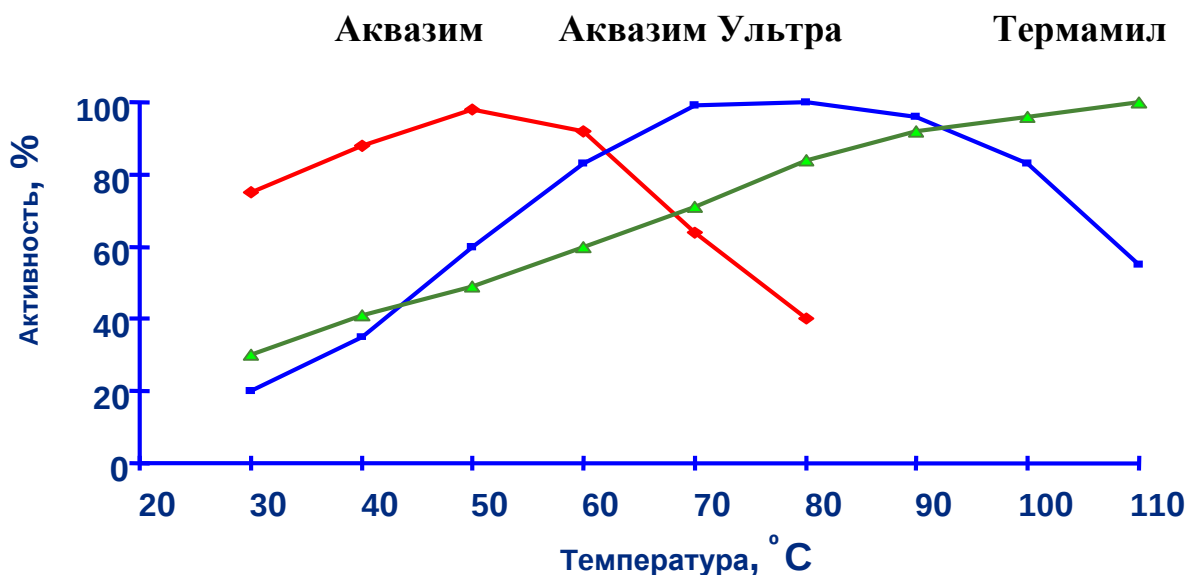


Рис. 5. Температурные профили активности амилазных ферментных препаратов

При наличии на отечественных фабриках производственных площадей для вылеживания ткани после пропитки ферментсодержащими растворами, представляется целесообразным использование ферментных продуктов,

проявляющих максимальную активность при низких температурах, т.е. при 20-55 °С, например, таких как Амилоризин, Аквазим, Optisize ТМ 40 (рис. 5).

Таблица 1

Препараты амилалитической активности.

Название	Вид активности, оптимальные условия	Культура/ производитель
Ферментные препараты		
Амилосубтилин ГХ,ГЗХ	α -Амилаза, эндо-1,3-1,4 β -глюканаза, нейтр. металлопротеаза, рН 5,4-6,2, Т=55-70 °С	B. subtilis, ОАО «Восток»
Амилоризин,ПХ, П10Х	α -Амилаза, протеаза, β -глюканаза, ксиланаза, рН 4,7, Т=45-55 °С	A.oryzae, Биохим, (Тамб.обл., Россия)
Глюкаваморин ГХ, ПХ	α -Амилаза, протеаза, ксиланаза, рН 4, Т=65 °С	A.awamori, ОАО «Восток».
Аквазим	α -Амилаза, Т=45-55 °С	A.oryzae “Novozymes” Дания
Термамил	α - Амилаза, Т=80-120 °С	B. subtilis, «Novozymes»
Аквазим Ультра	α -Амилаза, Т=70-80 °С	B. subtilis, “Novozymes ”
β -Глюканаза Г10Х	1,3-1,4- β -глюканаза, α -амилаза рН 3,5-8,0, Т=50 °С	B.Subtilis , Биохим, (Тамб.обл., Россия)
Optisize TM НТ 520	Термостабильная бактериальная α -амилаза, Т=40-110 °С, рН-5,0-9,0	GENENCOR, USA, Canada
Optisize TM 40	Бактериальная α -амилаза, Т=30-80 °С, рН-5,0-7,5	GENENCOR, USA, Canada
Амилаза НТ	Бактериальная α -амилаза, Т=53-80 °С, рН-5,0-7,5	ООО Русфермент
Зимаджунт НТ	Термостабильная бактериальная α -амилаза, Т=40-110 °С, рН-5,0-9,0	ООО Русфермент
Ликвамил 1200	Бактериальная α -амилаза, Т=53-80 °С, рН-5,0-7,5, АС 2500 ед	ООО Русфермент
Композиционные ферментсодержащие препараты (состав: амилаза, ПАВ, стабилизаторы,активаторы)		
Бактозоли MTN, NTN, PTN	α -Амилаза, ПАВ	АО “Клариант” Швейцария
Биотекс	α -Амилаза, ПАВ	Ивхимпром, Иваново, Россия
ЭКАР	α -Амилаза, ПАВ	ОООТварерс, Москва

При обработке сильно засоренных хлопчатобумажных тканей повышенной плотности с высоким содержанием остаточных воскообразных веществ и окрашенной «галочки» невозможно полностью отказаться от щелочной отварки. Для тканей такого ассортимента рекомендуется приведённая ниже технологическая схема подготовки .

Технологический процесс подготовки хлопчатобумажных и смесовых тканей (хлопок/полиэфир) с поверхностной плотностью до 120 г/м² .:

- опаливание на газоопаливающей машине;
- пропитка раствором низкотемпературной амилазы 1-2 г/л при 50-60 °С;
- лежка в ямах (или выдерживание в рулоне) – 30 минут- 2 часа;
- пропитка раствором едкого натра 3-8 г/л ;
- промывка холодной и горячей водой;
- пропитка белящим раствором, г/л:

Перекись водорода (100%)	- 4-5
Едкий натр	- 1,8-2
Силикат натрия	- 6-7
Смачиватель	- 0,5-1
Мочевина	- 5-10;
- запаривание в ЗВА или термокамере 30-60 минут $T = 100^{\circ}\text{C}$;
- промывка горячей и холодной водой;
- сушка на барабанах.

При обработке тканей малой поверхностной плотности (до 120 г/м²) амилолитическими ферментами обеспечивается удаление крахмала шлихты от 59 до 85 %, примесей до 40-50 %, ткань приобретает капиллярность на уровне 40-60 мм, что сравнимо с результатами щелочной отварки. Для тканей этого ассортимента представляется возможным исключить операцию высокотемпературной щелочной отварки и производить после ферментативной расшлихтовки пероксидное беление по известным рецептурам (табл. 2).

Особую значимость “щадящее” воздействие ферментов имеет при подготовке популярных вискозных штапельных и смесовых тканей, включающих химические волокна или катонин льна, неустойчивых к действию высокотемпературных щелочных и кислотных обработок (табл. 3).

Таблица 2

Технологический режим беления хлопчатобумажных тканей для
петания пигментами

Название операции	Действующий режим	Подготовка с ферментами
Опаливание на газоопаливающей машине		
Пропитка раствором едкого натра на мойно-материальной машине: -концентрация едкого натра; -температура раствора, °С	10-20 20-25	- -
Пропитка раствором фермента на мойно – материальной машине: -концентрация фермента, г/л; -температура раствора, °С	- -	1-2 30-35
Лежка в ЗВА: - время лежки, мин; -температура раствора, °С	60 100	60 50
Промывка на мойно-материальной машине водой: -горячей, температура, °С; -холодной, температура, °С	70-80 20-25	70-80 20-25
Пропитка на мойно-материальной машине кислющим раствором: - концентрация серной кислоты, г/л	2-2,5	2-2,5
Промывка на мойно-материальной машине: водой холодной, температура °С	20	20
Промывка на мойно-материальной машин: щелочно-перекисным раствором, г/л: - Перекись водорода (100%) - Едкий натр - Силикат натрия - Мочевина - Смачиватель	6-7 2,5 12 5 1	5-6 2 10 5 1
Промывка на 2 мойно-материальных машинах водой: - горячей, температура °С; - холодной, температура °С	70-80 20-25	70-80 20-25
Сушка на барабанах		

Таблица 3

Технологический режим беления вискозноштапельных и хлопкосиблоновых тканей на линии ЛОБ-180 или машинах рулонно-перемоточного типа

Название операции	Действующий режим	Подготовка с ферментами.
Пропитка холодной водой, тем-ра, °С	20-25	-
Пропитка раствором биопрепарата: -концентрация, г/л; -температура, °С	- -	1,0 35-40
Лежка в запарной камере: -время, мин -температура, °С	15-20 20-25	20-30 50
Промывка горячей и холодной водой, °С	60-70 20-25	60-70 20-25
Пропитка раствором, г/л - перекись водорода (100%) - едкий натр - силикат натрия - мочевины - смачиватель	4,5-5,0 1,8-2,0 8-10 5 1	3,5-4,0 1,6-2,0 8-10 5 1
Запаривание T=100 °С	60	20-30
Промывка горячей и холодной водой, °С	60-70 20-25	60-70 20-25
Сушка на сушильных барабанах		

Для подготовки вискозных штапельных тканей и тканей бязевого ассортимента под грунтовую печать или крашение в темные цвета с целью придания им гидрофильности, мягкости операция ферментной расшлихтовки является достаточной. Для совмещенных процессов расшлихтовки и беления целесообразно использовать щелочеустойчивые ферменты, например, Термамил или Зимаджунт НТ 340 (табл. 4). Полная характеристика термоустойчивых амилаз приведена в главе 5.

Актуальность внедрения в производство ферментативной расшлихтовки для льняных тканей обусловлена проблемами, связанными с выбраковкой экспортируемой ткани, содержащей остаточную шлихту. Более полное удаление крахмальной шлихты при минимальном воздействии на целлюлозу волокна уже на первых этапах подготовки обеспечивает повышение

сорбционной восприимчивости и реакционной способности ткани по отношению к белящим реагентам и как результат – качественную подготовку ткани .

Таблица 4

Биохимический режим беления вискозных штапельных тканей на линии
ЛРБ-10 или ЛОР

Название операции	Действующий режим	Подготовка с ферментами	Подготовка с ферментами	
			Линия ЛРБ-140	Джигеры
Пропитка белящим раствором, тем-ра, °C	40	40	40	40
Концентрация, г/л:				
щелочеустойчивая амилаза	-	1	1-1,5	1-1,5
перекись водорода (100%)	3,5-4,5	2,5-3	3	2,7-3,4
едкий натр	2,5-3	1,5	-	1-1,5
метасиликат натрия	-	-	2,5	-
силикат натрия	7	5-6	0,5	7
смачиватель ОП-10	0,5	1,8-2	0,6	0,5
Общая щелочность,г/л	2,5	1,8-2	0,6	1,6-2,4
Запаривание:				
-температура, °C	95-100	95-100	50	50-60
-время, мин.	10-12	10-12	20-30	20-30
Промывка горячей и холодной водой, температура, °C				
1,2-я ванны	80-90			
3,4,5-я ванны	60-70			
6-я ванна	40			
Сушка на сушильных барабанах				

Для тканей с исходной белизной менее 60 %, высоким содержанием сопутствующих примесей и повышенной поверхностной плотностью рекомендуется обработка составом, включающим низкотемпературную кислотоустойчивую амилазу (например Аквазим, Амилоризин, Амилаза НТ или препарат Биотекс) и щавелевую кислоту (0,5-0,8 г/л), рН раствора должен находиться в пределах 5-6 ед. Оптимальными условиями можно считать

пропитку ткани при температуре 30-50 °С и вылеживание в ямах или выдерживание в рулоне в течение 45-60 мин. Возможны различные варианты построения технологического режима подготовки льняных тканей с предварительной ферментативной расшлихтовкой:

Ферментативная расшлихтовка	Промывка щавелевой кислотой , 60 °С	Пероксидное беление, 85-95 °С, 20-30 мин	Гипохлоритное беление, 20 °С, 20-30 мин	Пероксидное беление, 85-95 °С, 20-30 мин
Ферментативная расшлихтовка	Пероксидное беление, 85-95 °С	Гипохлоритное беление, 20 °С	Пероксидное беление, 85-95 °С	Кислование
Ферментативная расшлихтовка	Гипохлоритное беление, 20 °С	Пероксидное беление, 85-95 °С	Кислование	

Список рекомендуемой литературы :

1. Галич, И.П. Амилазы микроорганизмов /И.П.Галич. - Киев: Наукова думка, 1987. - С.264.
2. Мельников, Б.Н.Использование биопроцессов в текстильной технологии /Б.Н.Мельников, А.В.Чешкова, В.И.Лебедева//Вестник СПГУТиД, 1997. - №1. - С.194-203.
3. Чешкова, А.В. Теория и практика ферментативного облагораживания волокнистых и текстильных материалов/А.В.Чешкова..//Текстильная химия, Биотехнология в XXI век, - 1998. - №2. - С.57-65.
4. Кричевский, Г.Е. Прошлое, настоящее и будущее биотехнологий в отделке текстильных материалов и смежных отраслях/Г.Е.Кричевский..//Текстильная химия, Биотехнология в XXI век - 1998. - №2. - С.41-57.
5. Чешкова, А.В. Текстильные биохимические технологии – сегодня и завтра: Сб.тез.докл. III Конгресса химиков и колористов. – М.:2000. - С.65.
6. Сафонов, В.В. Облагораживание текстильных материалов / В.В. Сафонов. – М.: Лепроиздат, 1991. – 288 с.

7. Elgert, K.A. Изменение вязкости концентрированных растворов крахмальной шликты при энзиматической расшлихтовке / K.A. Elgert, V. Denter, G. Heidemann // *Melliand Textilberichte*. – 1989. – Т. 70. – № 4. – С. 302-303.
8. Кивернсис, Ю.Ю. Возможность применения детергентов в процессе расшлихтовки хлопчатобумажных тканей амилоусубтилином ГЗХ / Ю.Ю. Кивернсис, С.Ю. Руткаускас. – Каунас: Политех. институт прикладной энзимологии “Ферментас”. 1990. – С. 8.
9. Патент № 3218889 ФРГ, МКН D 06 L 3/02 / Schutr R.A.; заявл. 1982; опубл. 1985, L Industrie Textile № 1160. – Р. 1075–1077.
10. Заявка № 2497274 Франция, МКИ D 06 L 3/02. Одностадийный способ расшлихтовки и перекисного отбеливания / Д. М. Холлей. – № 8027866; опубл. 02. 07. 1982, Бюл. № 11. – С. 17.
11. Танида Осану. Ферментативная обработка хлопчатобумажных тканей // *Conseny kore. Dyeing Ind.* - 1989. – Т.37. - №3. – С. 122–129.
12. Патент № 57–35070 Япония, МКИ D 06 L I/14, D 06 L 3/02 87713п / Иоцзя Минору.
13. Кокшаров, С.А. Получение и применение нативных ферментов для биохимических технологий облагораживания текстильных материалов / С.А. Кокшаров, И.В. Куликова, А.Л. Сибирев // *Текстильная химия*. – 2000. – № 1(17). – С. 78-88.
14. Чешкова, А.В. Использование биопроцессов при отделке тканей из смеси хлопка и химических волокон / А.В. Чешкова, В.И. Лебедева, Б.Н. Мельников, С.Ю. Шибашова // *Химические волокна*. – 1996. – №4 – С.52-54.
15. Чешкова, А.В. Одностадийный способ биорасшлихтовки и крашения тканей / А.В. Чешкова, В.И. Лебедева, Б.Н. Мельников // *Химические волокна*. – 1997. – №1 – С.55-58.
16. Чешкова А.В. Ферментативная подготовка тканей / А.В. Чешкова, В.И. Лебедева, Б.Н. Мельников // *Изв. вузов. Технология текстильной промышленности*. – 1992 – №2. – С. 51-56.
17. Чешкова, А.В. Применение композиционного биопрепарата для подготовки хлопчатобумажных тканей / А.В. Чешкова, С.А. Кундий, В.И. Лебедева, Б.Н. Мельников // *Изв. вузов. Технология текстильной промышленности*. – 1993. – № 3. – С. 49-53.

1.3. «Биоотварка». Назначение и свойства компонентов полиферментных композиций в процессах очистки хлопчатобумажных и льняных тканей от примесей. Особенности гидролитических реакций при участии пектиназ и гемицеллюлаз

Задачей операции отварки в технологическом режиме подготовки целлюлозосодержащих текстильных материалов является придание им высокой гидрофильности за счет деструкции гидрофобных примесей (воскообразных веществ, гемицеллюлоз, лигнина), нарушения связей между примесями волокна и непосредственно целлюлозой. Ферменты, разрушающие пектиновые вещества, называются пектинолитическими, они относятся к классам гидролаз и лиаз. Лиазы отщепляют от субстратов (в частности, от пектина) ту или иную группу с образованием двойной связи, или наоборот, присоединяют группы с двойными связями (рис.6).

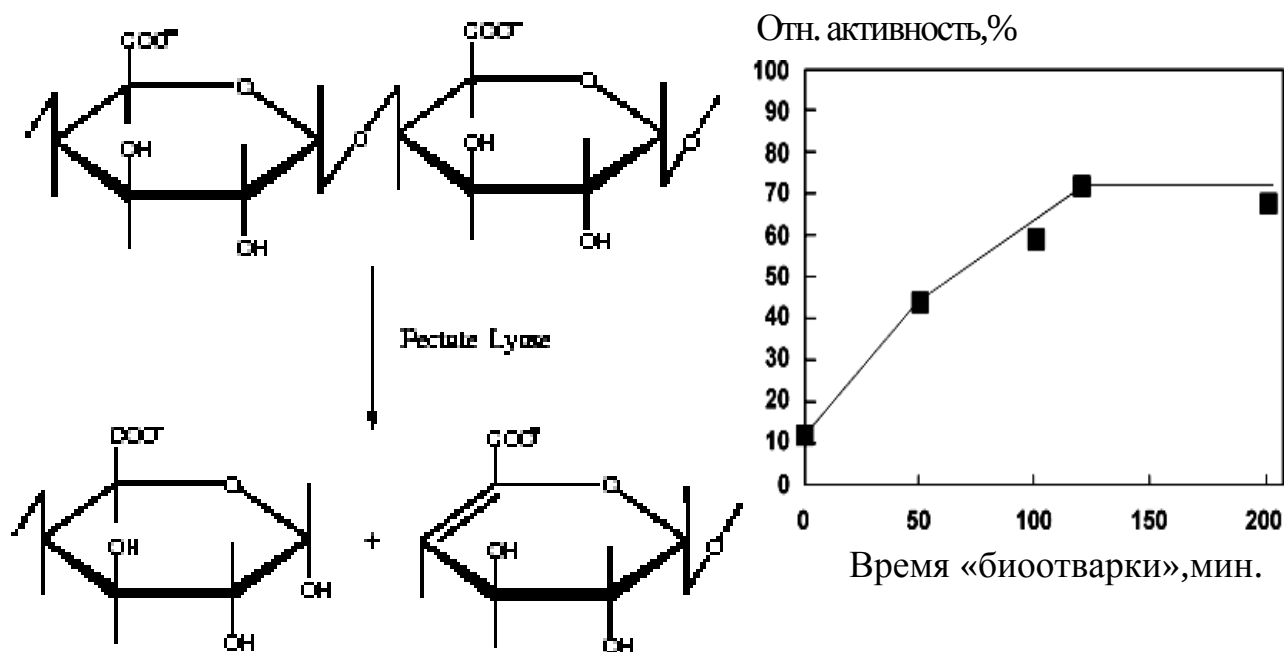
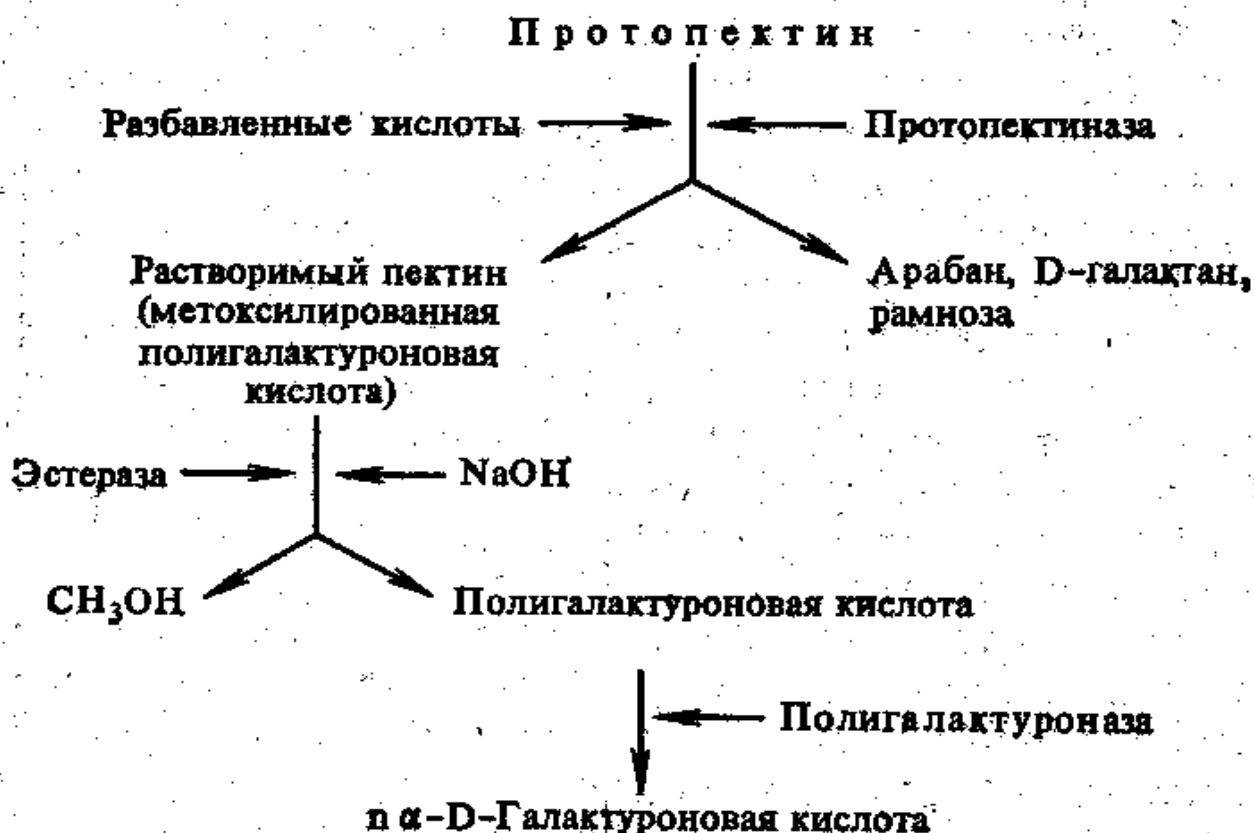


Рис.6. Влияние активности пектат-лиазы на степень удаления пектиновых веществ

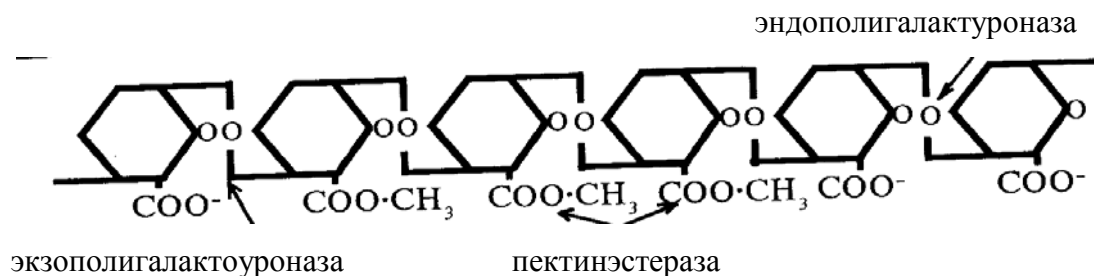
Под действием пектиназ гидролитическое расщепление пектиновых веществ происходит в несколько этапов: протопектиназа действует на нерастворимый протопектин путем разрушения связей между компонентами клеточных

стенок и пектином, в результате чего последний переходит в растворимое состояние. На растворимый пектин действует комплекс ферментов: пектинэстераза (ПЭ), полигалактуроназа (ПГ) и пектат-транс-элиминаза (ПТЭ). Фермент пектинэстераза гидролизует сложноэфирные связи пектиновых веществ. Отщепление в результате этой реакции метоксильных групп CH_3O приводит к образованию частично или полностью диметоксилированной полигалактуроновой кислоты (пектиновой кислоты) и метилового спирта:

Таким образом, ферментативный гидролиз в зависимости от



длительности и условий проведения процесса приводит к деполимеризации высокополимерной молекулы пектина с образованием галактоуридов:



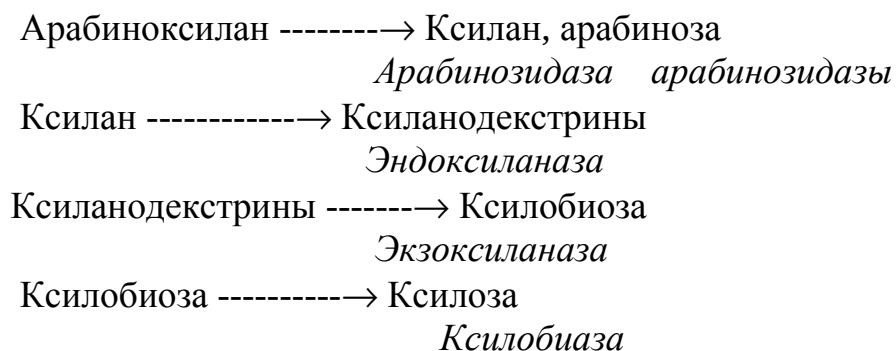
Оптимум температуры для большинства бактериальных пектолитических ферментов лежит в пределах 35-65 °C. Активность пектат-

транс-элиминазы проявляется в пределах pH 6,6-9; пектинэстеразы – pH 6,2-6,5; полигалактуроназы – pH 4,5-5,0. Накопление продуктов распада пектовой кислоты под влиянием ПТЭ происходит только при щелочном pH 8,0. Под влиянием ПГ, наоборот, при щелочном pH накапливается в два раза меньше продуктов распада, чем при кислом pH.

Оптимум температуры для бактериальных пектолитических ферментов лежит в пределах 35-45 °С. ПГ сравнительно термолабильна, т.е. не устойчива при повышении температуры. Она теряет 75 % активности при нагревании до температуры 60 °С в течение 60 мин и полностью инактивируется при температуре 70 °С через 5 мин. Кроме pH и температуры, активность ферментов в определенной степени зависит от присутствия в среде катионов. Так, катионы тяжелых металлов замедляют процесс ферментативного расщепления молекул пектина. Хлористые соли Ba, Hg, Zn, Mg в концентрациях 0,001 М подавляют активность ПКТЭ, а двухвалентные катионы – Cd^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} в той же концентрации увеличивают активность фермента.

При ферментативном гидролизе гемицеллюлоз, например, ксилоглюкана лимитирующей стадией реакции является отщепление боковых цепочек от глюкановой цепи. Гидролиз α -1,6-связи, соединяющей ксилозные остатки с глюканом, катализирует фермент ксилозидаза. После полного отщепления боковых цепочек ксилоглюкан превращается в β -1,4-глюкан, который может быть гидролизован с помощью целлюлолитических ферментов. Ксилозидаза входит в состав ферментных комплексов препаратов целлюлаз в качестве сопутствующего фермента. Препараты ксилозидазы специально не производятся.

Ферментативный гидролиз ксиланов включает несколько стадий с участием различных ферментов. Так, гидролиз арабиноксилана может протекать в четыре стадии по схеме :



На первой стадии гидролиза происходит отщепление боковых цепочек, состоящих из одного или более арабинозных остатков. Далее незамещённый ксилан гидролизуется по классической схеме расщепления полисахаридов. Возможен и другой путь: эндоксилаза, способная расщеплять арабиноксилан в обход точек ветвления, гидролизует арабиноксилан с образованием арабиноксиланодекстринов и ксиланодекстринов. Арабиноксилан освобождается от боковых цепей под действием арабинозидазы, после чего образовавшиеся на первой и второй стадии ксиланодекстрины гидролизуются с участием экзоксилазы и ксилобиазы. Существенно, что действие экзофермента возможно только после отделения боковых цепей. Некоторая часть гемицеллюлоз трудно удаляется из растительных тканей, поэтому техническое льняное волокно всегда содержит небольшое количество гемицеллюлоз.

В настоящее время разработаны технологические схемы процесса с принципиально новым подходом к использованию пектиназ и гемицеллюлаз:



Пионерские работы по данному направлению основаны на применении микробиологических процессов в процессах активирования мочки льна. Так, при использовании пектолитических ферментов для выделения длинного льняного волокна ускоряется процесс мочки, сокращается количество отходов, получаемое волокно не обладает специфическим запахом. Время мочки льняной соломы при введении в мочильный раствор диффузной вытяжки из *Asp. niger*, *Asp. awamori* и *Alternaria tenuis* (ВНИИ Синтез белок), содержащей пектолитические ферменты, сокращается с 24 до 15 часов. Процесс мочки льноволокна осуществляли при температуре 37 °С в течение 36–40 ч,

концентрация препарата в растворе составляла 0,5 % к массе соломы, pH 8–8,5. Показано, что после биodeградации волокно обладало повышенной гибкостью, прочностью, осветленностью. При внесении большой дозы неочищенного препарата (5 % от объема мочильной жидкости) в мочильную жидкость наряду с пектолитическими ферментами попадали и синтезируемые грибом целлюлолитические ферменты, что приводило к ослаблению получаемого волокна. Поэтому все препараты необходимо предварительно проверять на пектолитическую и целлюлитическую активность.

Применение препаратов Пектоклостридина ГЗХ Пектаваморина П2Х, позволяет ускорить процесс мочки (до 20-22 ч) без повреждения целлюлозы. Солому замачивают в воде при гидромодуле 1:15. Дозы препаратов составляли 0,5-3 % к массе соломы при температуре 38-39 °С. Проведение мочки льна с препаратом П2Х в воде и в ацетатном буфере с pH 3,8 - 4,2 при предварительной стерилизации соломы показало, что в нестерильной воде активность препарата снижается, а в ацетатном буфере она выше в 1,5-2 раза, оптимальным является 1 % раствор.

Культура *Cl.gurfelii*, продуцирующая комплекс пектолитических ферментов, была выделена из тресты, вымоченной на Руднянском льнозаводе при водно-воздушной мочке с протоком регенерированной мочильной жидкости. В культуральной жидкости *Cl.gurfelii* нет фермента полигалактуроназы, который активен в кислой среде при высокой пектат-транс-элиминазной активности, которая проявляется в щелочной среде (pH 8,4).

Известно использование в качестве продуцента пектолитических ферментов анаэробного бактериального штамма *Cl. Pectinofermentans* 15. Для льноперерабатывающей промышленности предложен технический препарат, получаемый из культуральной жидкости, содержащий ферменты экзоПГ, –ПЭ, –ПТЭ и ксиланазу. В НИИПОЛВ разработан сухой ферментный препарат из культуральной жидкости анаэробных пектинразлагающих клостридиев с активностью ферментов в полученном сухом препарате соответственно, ед./г: пектат-транс-элиминазы 15200; полигалактуроназы 18,6; пектинэстеразы 6,2.

Для проверки эффективности препарата его вносили в количестве 0,5 % к массе соломы и заливали буферным раствором с рН 8-8,5. Такой рН является оптимальным для проявления активности фермента пектат–транс–элиминазы. Мочка при температуре 37 °С продолжалась 36-40 ч. Полученное после ферментативной мочки волокно обладало повышенной гибкостью и прочностью, было светлое, жесткое, без запаха. Дальнейшие исследования показали, что ферментный раствор можно использовать многократно (до 6 раз).

От активности и полноценности комплексов пектолитических ферментов, синтезируемых анаэробными клостридиями, зависят время мацерации льносоломой (от 10-48 ч) в процессе мочки и выход длинного волокна. В связи с этим представляют интерес данные, полученные во ВНИИсельхоз микробиологии. Авторы изучили ферментативную активность коллекционных культур *Cl.felsineum*, выделенных с разных растений и с льносоломой в процессе ее мочки. Показано, что все штаммы *Cl.felsineum* обладают способностью синтезировать пектолитические ферменты, но в различной степени. Те культуры, которые синтезировали больше полигалактуроназы (ПГ), отличались и повышенной мацерирующей активностью, а активность пектинэстеразы (ПЭ) сохранялась на том же уровне.

Способ твёрдофазной ферментации соломы заключается в обработке волокна при влажности волокна 60-80 %. Технология обеспечивает увеличение выхода длинного волокна в 1,5 раза в сравнении с действующей технологией. В работах ЦНИИЛКА проведено сравнительное изучение влияния Пектаваморина ПГХ, Пектиназы, Пектоклостридина ГЗХ, Пектолитина (ВНИИ биотехнический институт) на качество длинного льняного волокна, выделяемого после механической обработки. Показано, что полученное волокно обладает повышенной гибкостью и прочностью к разрыву.

Способ твердофазной ферментации льносоломой с использованием комплекса пектолитических, гемицеллюлазных и целлюлазных ферментов, продуцируемого грибом *Frameters P431*, позволяет достигнуть эффективной делигнификации. При температуре 12-40 °С сырье выдерживается в течение

48-50 часов при влажности соломы 40-120 % . Практическая реализация данного способа позволила создать малоотходную технологию с минимальными затратами тепла и энергии, за счет исключения стадий отжима и промывки. Новая технология позволяет в среднем увеличить выход волокна в 1,8 раза при получении волокна лучшего качества (N18 вместо N11). Экономический эффект от реализации данной технологии складывался в основном из увеличения выхода длинного волокна на 45-50 %, от экономии электроэнергии и от значительного сокращения промывных стоков. По технологии льносолома формируется в рулоны весом 200-220 кг, которые на поддонах помещаются в специальную камеру-помещение (цех), где создается и поддерживается температура около 60 °С и необходимая влажность. Перед помещением в биокамеру рулоны опрыскиваются раствором приготовленного ферментативного препарата и выдерживаются в биокамере в течение суток. Через сутки процесс ферментативной обработки льносоломы завершается, рулоны вынимают из биокамеры, просушивают в течение 1-2 часов и поступают на существующие на льноперерабатывающих предприятиях мяльные агрегаты.

Современные биотехнологические подходы к модифицированию целлюлозосодержащих материалов используют биохимическое отбеливание, при котором обработка гемицеллюлатическими ферментами способствует удалению лигнина и, как следствие, приводит к осветлению волокон. Так, например, применение композиции манназы и ксиланазы обеспечивает удаление гемицеллюлоз из целлюлозной пульпы более чем на 80 % .

Совместно АО “Биохим” (г.Москва) и ГОУВПО ИГХТУ (г. Иваново) разработан препарат Биофлекс, предназначенный для котонизации льноотходов, например, короткого волокна № 2-4. Способ высокоселективной ферментативной котонизации в отличие от химических способов позволяет максимально сохранить целлюлозную составляющую, что подтверждается высоким показателем выхода волокна после механической обработки (50-68 %), низким содержанием непрядомых волокон пуховой фракции. Согласно технологии короткое льняное волокно, предварительно разрезанное и

разрыхленное на трепальном агрегате ТБ-3, пропитывается при рН 5,5-6,5 и температуре 35-40 °С раствором, содержащим Пектофоедин- 1 г/л (или его аналоги), выдерживается при этой температуре в течение 25-60 мин. Затем волокно отжимается, поступает на рыхлительную машину, далее питателем укладывается на транспортер сушильной машины, высушивается до 12-16 % влажности и обрабатывается на трепально-чесальном оборудовании хлопкопрядильного производства. Полученный котонин характеризуется линейной плотностью 320-480 м текс (без учета расщепленности), номером – 1220-1770, разрывной нагрузкой одиночного волокна –0,0149-0,0198 Н, удлинением одиночного волокна — 4,7-5 %, средней длиной 36,1 мм, заостренности – 0,29-1 %. Технология формирования хлопкольнай ленты предусматривает: смешение котонина и хлопка на горизонтальном разрыхлительном агрегате, загрузку в питатель, пропуск через чесальную машину, где также осуществляется смешение волокон, выравнивание и сильное утонение.

В условиях хлопкопрядильного производства хлопкоподобное льноволокно рекомендуется в качестве смесовой составляющей (20-25 % по отношению к хлопковому волокну) для получения пряжи кольцевого способа прядения № 34. По данным физико-механического анализа качества пряжи разрывная нагрузка одиночной нити составляет (Н) 2,8-3,07, что на 10-15 % выше базовой хлопчатобумажной, линейная плотность (текс) – 28,9-29,27, относительная разрывная нагрузка (Н/текс) – 0,0981-0,103, удлинение (%) – 4,9-5,0. Вложение котонина в количестве 17-19 % в хлопчатобумажную пряжу позволяет значительно улучшить гигиенические и прочностные свойства материала. Подготовленная по действующему режиму беления хлопкольнай ткань бязевого ассортимента имеет поверхностную плотность 145 г/м², белизну 81,5 %, более высокую прочность и капиллярность на 30-40 мм выше, чем базовая хлопчатобумажная ткань.

Разработаны низкотемпературные технологии подготовки льняной ровницы взамен высокотемпературным режимам щелочной отварки. Температура обработки ровницы 35-40° С при рН на уровне 5,5-6,5 в течение 60 минут. По данным деформационных диаграмм рассчитаны значения

предельно возможного разрушающего напряжения волокна (Н/текс) и предельно возможного разрывного удлинения (%), подтверждающие, что в результате ферментативной модификации клеящего комплекса срединных пластинок, удаления части сопутствующих примесей льняная ровница приобретает требуемую гибкость, прочность на разрыв и способность к вытягиванию. «Щадящие» условия обработки с использованием препаратов Пектофоетидин (и его аналогов), обеспечивают высокую сохранность целлюлозной составляющей волокна, что положительно сказывается на таких показателях, как потери массы и разрывная нагрузка. Полученная пряжа имеет следующие характеристики: линейная плотность – 120,5 текс, разрывная нагрузка – 1,33 Н, номер с учетом расщепленности – 500-1280 ед., коэффициент вариации по разрывной нагрузке – 21,0 %, удлинение – 16,1 %.

При обработке ровницы композицией ферментов пектиназ и гемицеллюлаз за счет увеличения степени удаления лигнина на 5-8 % обеспечивается не только улучшение технических свойств, но и цветовых характеристик льняного волокна, соответствующих эффектам, приобретаемым при щелочной отварке ровницы. На основе использования препаратов Пектофоетидин, Брюзайм ВGX, Фибрезайм, а также композиционных препаратов Биолён и Биофлекс, созданных в условиях химических производств АО «Ивхимпром» и ООО «Биохим» (г. Москва), разработаны рациональные технологические режимы, заменяющие операцию щелочной отварки.

Пример технологического режима ферментативной обработки ровницы для получения пряжи цвета «серого» льна №34 (Модуль 1:10, вес партии 480-500 кг)

- обработка препаратом Пектофоетидин ГЗХ и его аналогами (1-3 г/л в зависимости от активности ферментов), неионногенный смачиватель с низким пенообразованием (Феноксол БВ-0,5 г/л), уксусная кислота до pH 5,5 при температуре 40-60 °С в течение 30-60 минут;

- 1-я промывка : триполифосфат натрия 0,4 г/л , сода 1,5-2 г/л, температура 75 - 85 °С, длительность 10 минут;- далее промывка теплой водой , кислование , промывка водой.

Ферментативные технологии, заменяющие щелочную отварку в процессах подготовки хлопчатобумажных тканей, основаны на обработке пектиназами, содержащими пектат-лиазы. Кутикула хлопкового волокна, содержащая 9 % пектиновых веществ и 14 % воскообразных веществ, под действием ферментов разрушается, что при последующих промывках при температуре 70-85 °С обеспечивает частичное удаление воскообразных веществ и повышение гидрофильных свойств волокон. Ферментативная обработка хлопчатобумажных тканей с использованием кислой пектиназы G2L и щелочной пектиназы Bioprep 3000 L, Baysolex VP-SP 20022, Unisim PEC позволяет удалить более 70 % пектиновых веществ.

Обработка пектиназами *Asp.niger* в составе с ПАВ предлагается для «биоотварки» хлопчатобумажных материалов в кислой среде при pH 4. Установлено, что обработка данным составом при температуре 40 °С в течение 2-6 часов, модуле ванны 1:50 и концентрации фермента в растворе до 10 мл/л способствует увеличению сорбционной восприимчивости текстильных материалов по отношению к активным красителям

Технологический режим беления хлопчатобумажной бязи с заменой щелочной отварки на ферментативную обработку

- Пропитка суровой ткани при температуре 60-70 °С раствором следующего состава, г/л: Bioprep- 0,8; Термамил – 0,8; Неонол – 0,08 при pH 8,5 или Биофлекс 1-2 г/л или Амилаза НТ 0,5 г/л + Брюзайм 1 г/л при pH 5-6;
- термостатирование при температуре 60-75 °С в течении 30-60 мин.;
- промывка горячей (80-85°С , ПАВ концентрацией 0,5 г/л), теплой и холодной водой на 4-х машинах ;
- пропитка белящим раствором, содержащим, г/л: пероксид водорода – 3-5; едкий натр – 1,5-2; метасиликат натрия – 9-10; мочевины – 5-10; ПАВ (например Неонол БВ – 0,5 г/л);
- запаривание в течение 60 мин.;
- промывка горячей и холодной водой.

Ферментативную обработку хлопчатобумажных тканей (сатин, миткаль, вискозноштапельные и смесовые ткани) рекомендуется проводить в две стадии: на первой – Термамилем 280L при концентрации 0,05 % от массы

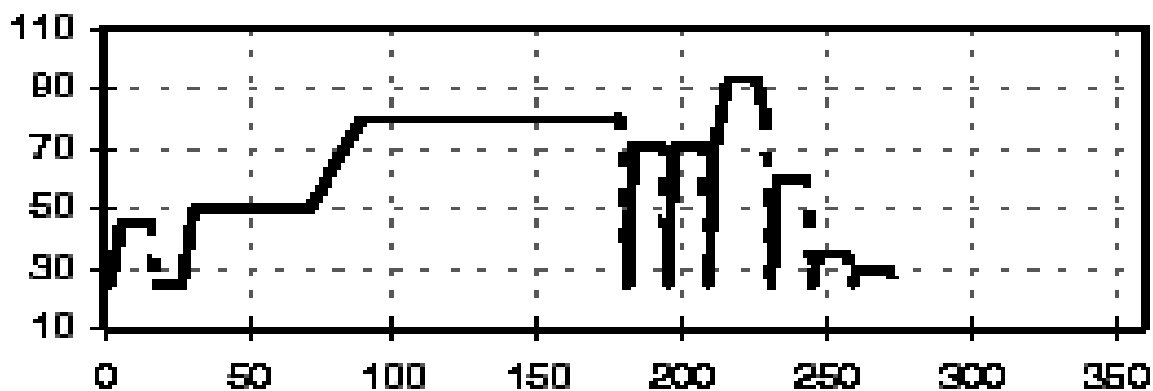
обрабатываемой ткани и pH-9,5, а на второй, непосредственно «биоотварки», пектолитическим препаратом на основе щелочной пектиназы - Биопреп 3000 L (или Скаурзим) при pH 8,5.

Технологический режим беления хлопчатобумажной марли с заменой щелочной отварки на ферментативную обработку

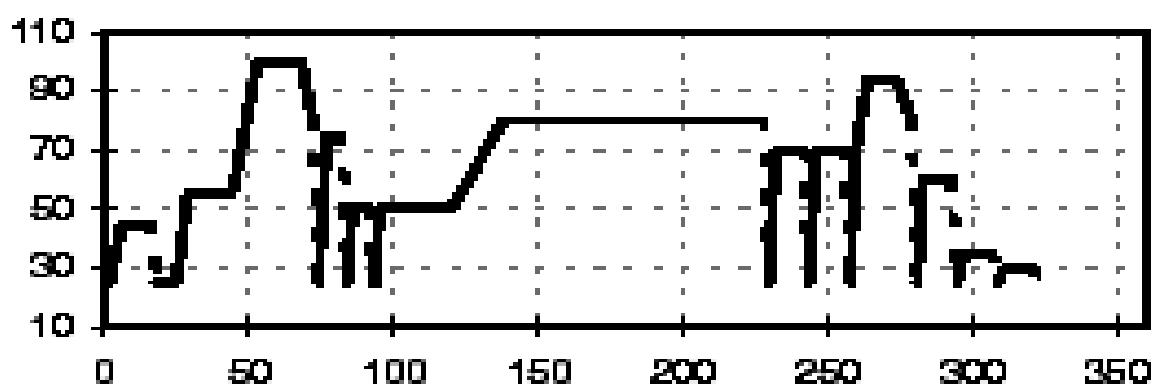
- Пропитка хлопчатобумажной марли на мойноматериальной машине раствором, содержащим препарат Биофлекс – 2 г/л в нейтральной среде или композицией Амилаза НТ 0,5 г/л + Брюзайм 1 г/л при температуре 60-70 °С, pH 5-6;
- вылеживание в котле или ямах в течение 1-2 часов без подогрева или термостатирование 50-60 °С в течение 20-60 минут;
- промывка раствором соды – 2,5-3 г/л и ПАВ 0,5 г/л при температуре 70-85 °С, далее теплой водой при температуре 50-52 °С;
- пропитка белящим раствором при 45-52 °С содержащим, г/л: перекись водорода 5-6, едкий натр 2,5-3,5, метасиликат натрия 6-8, сульфосид 0,5;
- запаривание 20-30 мин;
- кислование серной кислотой 1 г/л, 30-40 °С, далее промывка горячей и холодной водой;
- сушка на сушильных барабанах.

Показано, что ткани, подготовленные с использованием «биоотварки», окрашиваются прямыми и активными красителями более равномерно. Этот эффект обусловлен получением неповрежденной целлюлозы, характеризующейся однородностью морфологической структуры. В случае же крашения отваренных тканей, наблюдается более полное истощение красильной ванны при неравномерности окрашивания по диаметру волокна. Это явление связывают с сорбцией красителя в поверхностных структурах поврежденного волокна. Примерный технологический режим представлен на рис. 7. В первом варианте (рис. 7а.) рекомендуется использовать низкотемпературные амилазы в композиции с препаратами на основе пектат –лиаз (например Биопреп 3000 L или Скаурзим, Вискозим). Во втором варианте (рис. 7б.) высокотемпературные амилазы и пектиназы.

Температура °С



а) 1-промывка 2-обработка 3- крашение 4- промывка с ПАВ ферментом



Время процесса, мин

б) 1-промывка 2-обработка 3- крашение 4- промывка с ПАВ ферментом

Рис. 7. Варианты температурных профилей совмещенного процесса «биоотварки» и крашения без промежуточной сушки.

Список рекомендуемой литературы к главе

1. Пектинолитические ферменты *Clostridium felsineum* мацерирующие стебли льна: автореф. дис. канд. биол. наук / Капитонова Л.С. – М., 1973. – С.18.
2. Миронов К. М. Биохимическая мочка льна, конопли, кенафа, джута. – М.: Гизлегпром, 1951. – С. 124.
3. Попова, Ж.П. Пектинолитические ферменты некоторых пектинразлагающих клостридов / Ж.П. Попова // Бюллетень ВНИИ сельск. хоз. микробиологии. – 1979. –С. 18–21.

4. Выделение и свойства эндоглюканаз и ксиланаз *Chaetomium cellulolyticum*: автореф. дис. канд. хим. наук / Баразненко В.А. – М., 1999. – 23 с.
5. Bergguist, P.L. Hemicellulolytic enzymes from extremely thermophilic bacteria / Bergguist P.L. // 8 Th Int. Symp. Wood and Pulp. Chem. – Helsinki, June 6–9, Vol. – Juvaskyla, 1995. – S. 255–262.
6. Возняковская, Ю.М. Микробиология мочки льна / Ю.М. Возняковская. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 136 с.
7. Ettes, J.N. Alkaline pectinase: an eco-friendly approach for cotton preparation / J.N. Ettes, Husain and N.K. Lange // Textil Asia. – 1999. – P. 83–86.
8. Николов, А. Энзимы фирмы Ново Нордикс для текстильной промышленности / А. Николов. // Текстильная химия, 1998, №2, с. 65–67.
9. Шигаева, И.В. Экологические аспекты применения ферментных обработок при облагораживании льняной пряжи. И.В. Шигаева, Н.Р. Туркина, И.И. Шамолина // Текстильная промышленность. 2002. №4. с. 27–28.
10. Афанасьева, В. Отделка льняных тканей, проблемы и пути их решения. В. Переволоцкая, Т. Башилова. // Русская мануфактура, 2000, №2, с. 26–28.
11. Кундий, С.А. Биохимическая подготовка льняной ровницы / С.А. Кундий, А.В. Чешкова, В.И. Лебедева, Б.Н. Мельников // Актуальные проблемы химии, химической технологии и химического образования. Химия-96: материалы 1 Регион. межвуз. конф. – Иваново. 1996. – С. 176.
12. Чешкова, А.В. Низкотемпературная биохимическая обработка льняной ровницы / А.В. Чешкова, С.А. Кундий, В.И. Лебедева, Б.Н. Мельников // Текстильная химия. – 1996. – №2(9). – С. 63–69.

1.4. Перспективы использования целлюлаз и их композиций с амилазами и пектиназами в технологиях подготовки целлюлозосодержащих текстильных материалов. Технологические режимы биополировки и биомягчения

Важнейшим свойством, характеризующим целлюлазный комплекс, для нужд пищевой и деревообрабатывающей промышленности считается его способность к глубокому осахариванию и деструкции целлюлозосодержащих субстратов, так называемая «сахаролитическая» активность. Такие ферментные препараты и их продуценты эффективно осуществляют гидролиз целлюлозы до глюкозы и различаются по субстратной специфичности, адсорбционной способности и термостабильности. «Кислая целлюлаза» проявляет максимальную активность в интервале pH 4,5-5,5 и в интервале температур 45-55 °С; «нейтральная целлюлаза» – pH 5,5-9,0 и температуре 50-60 °С. В последнее время усилия исследователей направлены на поиск целлюлолитических ферментов, способных катализировать реакцию на поверхности целлюлозного субстрата, не приводящую к глубокой деструкции целлюлозной матрицы. Термин «тополитическая» активность впервые был использован на кафедре химической энзимологии МГУ для характеристики ферментов, пригодных для нужд текстильной промышленности, где не требуется глубокая конверсия целлюлозных субстратов. Актуальными направлениями исследований в этой области становятся поиск новых штаммов-продуцентов «нейтральных» целлюлаз, получение штаммов при помощи методов классической генетики или генной инженерии, а также выделение и исследование свойств гомогенных ключевых тополитических ферментов, входящих в состав известных ферментных комплексов *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Bacillus* и др. (табл. 5). Синтез ферментов с тополитической активностью открыл новые возможности их применения в текстильных технологиях: например, для депигментации текстильных (джинсовых) изделий с целью придания им более привлекательных потребительских свойств (альтернатива традиционным химическим способам «варки», а также обработке пемзой); для биополировки текстильных изделий с

целью удаления микродефектов и ворса; как компонента моющих средств и т. д. Важно отметить, что замена известных химических способов обработки целлюлозных материалов на ферментативные приводит к проведению процесса в более мягких условиях и уменьшает ущерб, наносимый окружающей среде .

Таблица 5

Препараты целлюлатической и мультиэнзимной активности

Препарат	Активность	Культура/ Производитель
Ферментные препараты		
Денимакс комби	α -Амилаза, целлюлаза	Novozymes, Дания
Целлюсофт Ультра	Целлюлаза	Aspergillus, Novozymes, Дания
Целловиридин Г20Х	Эндо-1,4- β -глюканаза, ксиланаза, целлобиаза и др., pH 4,5-5,5, T-50 °C	T.viride, ООО Русфермент (Москва)
Целлюлаза IBT-90	Целлюлаза	Aspergillus niger, Poland
Целлюлаза 100	Эндо-1,4- β -глюканаза, целлобиогидролаза, глюканаза, ксиланаза, полигалактуроназа, пектинэстераза, pH 3,5-6,5, T-40-50 °C	A.foetidus, T.Viride, Россия
Indigo ^R 2XL, 44L, RFW	Целлюлоза, T-50-65 °C, pH-4,5-5,5	GENENCOR,USA Canada
Indigo ^R MAX G	Целлюлоза, T-55-65 °C, pH-4,5-5,0	GENENCOR,USA Canada
Ферментсодержащие композиционные препараты (ТБВ)		
Биософт	Целлюлаза, T-50-65, pH-4,5-6,5	Ивхимпром, Россия
Бактозоль MTN+ Бактозоль СА	α -Амилаза, целлюлаза, pH 5, T-60 °C	АО"Клариант", (Швейцария)
Бактозоль MTN+ Бактозоль СА	α -Амилаза, целлюлаза, pH 5, T-60 °C	АО"Клариант" (Швейцария)
Бактозоль MTN+ Бактозоль СЕ или FB	α -Амилаза, целлюлаза, pH 6, T-50-60 °C	АО"Клариант" (Швейцария)
Биофлекс	Амилаза, пектиназа, гемицеллюлазы, целлюлаза	ООО «Биохим» (Москва)
Брюзайм	Гемицеллюлазы, целлюлаза	ООО Русфермент (Москва)
Зимаджунт	Гемицеллюлазы, целлюлаза	ООО Русфермент (Москва)

Полнота гидролиза целлюлозы зависит от ряда факторов: степень кристалличности субстрата, величина его удельной поверхности, состав ферментативного комплекса, используемого для гидролиза, и свойства компонентов. Нативная целлюлоза имеет очень прочную структуру и трудно гидролизуется. Легко поддается действию ферментов лишь наиболее рыхлая,

периферийная часть целлюлозных мицелл, составляющая 5-7 %. Ферменты с высокой способностью сорбироваться на субстрате участвуют не только в гидролизе кристаллической целлюлозы, но и в процессе ее диспергирования. Дальнейший гидролиз возможен только после расчленения целлюлозных мицелл (рис.8).

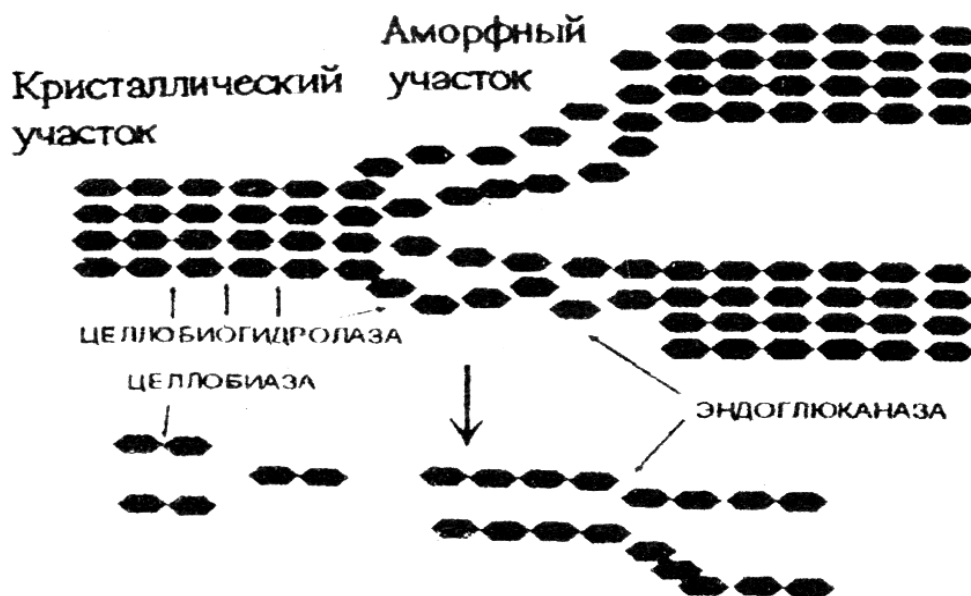


Рис.8.Специфика воздействия ферментов на целлюлозу

На участках с дефектами структуры происходит сорбция и концентрирование ферментных молекул, которые оказывают давление на стенки капилляров, пор и микротрещин целлюлозных мицелл, увеличивая расстояние между макромолекулами. В образовавшиеся пространства проникает вода, что приводит к разрыву водородных связей между макромолекулами целлюлозы, их сольватации и расслаиванию. Поскольку целлюлозные материалы являются по физической структуре аморфно-кристаллическими полимерами, большей доступностью в которых отличаются аморфные области, то с них и начинается гидролиз, так как в эти структурные области в первую очередь проникают белковые молекулы фермента – целлюлазы (рис.9).

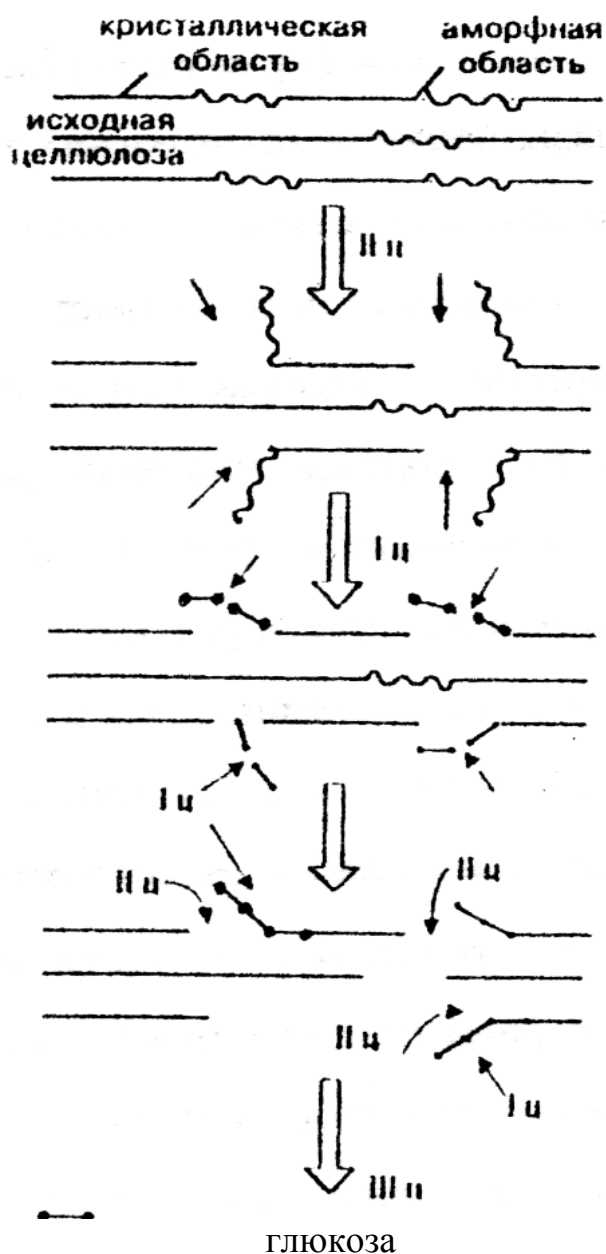


Рис. 9. Координированное действие целлюлазного ферментного комплекса на целлюлозу волокнистых материалов

В состав целлюлазного ферментного комплекса входят три типа индивидуальных ферментов, отличающихся разными механизмами гидролиза целлюлозы и, следовательно, узкой специализацией:

I Ц - фермент - эндо-1,4-β-глюканаза отщепляет димер (целлобиозу) с конца молекул целлюлозы;

II Ц - фермент - экзо-1,4-β-глюканаза (целлобиогидролаза) расщепляет макромолекулы целлюлозы в срединных участках;

III Ц - фермент - целлобиаза (β-глюкозидаза) гидролизует короткие цепи (олигомеры) целлюлозы до глюкозы .

Таким образом, варьируя условия проведения процесса ферментативного гидролиза целлюлозы и состав ферментной композиции, можно целенаправленно воздействовать на полимерную макромолекулу целлюлозы, обеспечивая эффекты «шлифовки», или иначе, «биополировки» поверхности волокон или глубокой их модификации. При разработке технологий применения целлюлаз в текстильных производствах необходимо производить контроль потери массы материала (допускается не более 5 %) во избежание

потери прочности. Технология применения целлюлаз должна предусматривать её добавление в варочные растворы при отварке хлопчатобумажных и льняных тканей на первой стадии до подъема температуры выше 60 °С. В этих условиях целлюлаза разрушает первичную стенку хлопковых волокон и способствует удалению из волокна различных загрязнений.

Широкое применение целлюлазы нашли в технологиях отделки джинсовых текстильных изделий для достижения эффекта «опаливания» или «варенки» (рис. 10-13). Так, препарат Целлюсофт L разработан для обработки хлопка, Целлюсофт Plus L – для тканей из 100 % волокна лиоцелл (новое поколение гидратцеллюлозных волокон), а Целлюсофт Ultra L – для смеси лиоцелл/натуральные целлюлозные волокна, льна, пеньки, рами. «Полировку» поверхности текстильных материалов, позволяющую удалить выступающие волокна, рекомендуется осуществлять на оборудовании полунепрерывного действия, например джигерах или фулярах. Технологические параметры варьируются в зависимости от активности ферментативного препарата: модуль ванны 1:5 - 1:20, pH 4,5-6,0, температура обработки от 45 до 60 °С, концентрация фермента от 1 до 3 % от массы ткани, время обработки 30-60 минут, инактивация фермента: pH 10; 80 °С; 10 мин. В результате «опаливания» ткани достигается лонгированный эффект мягчения, увеличение интенсивности окраски, устойчивость к образованию пиллей (рис. 11,12)..

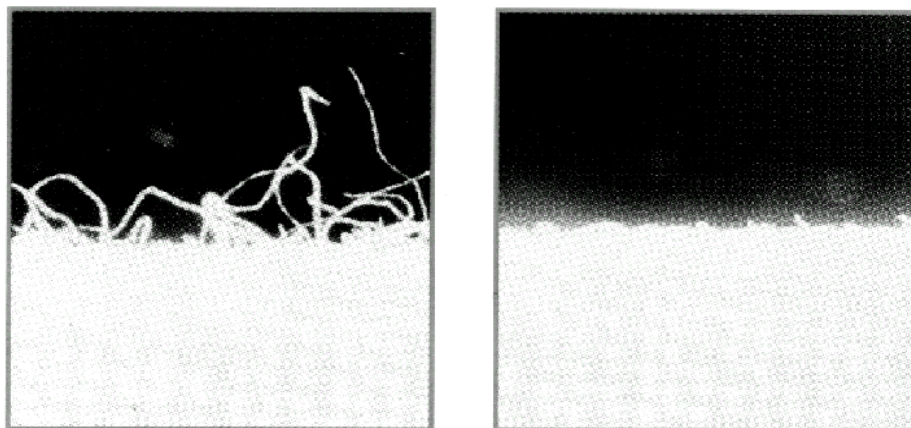
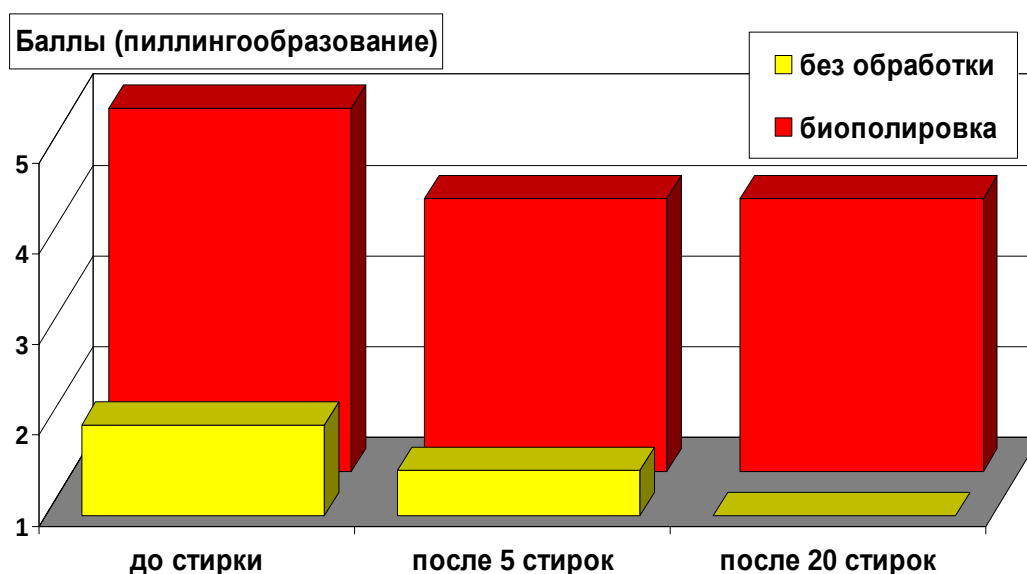


Рис. 10. Визуальный эффект «опаливания» (удаления) выступающих волокон на текстильном материале



ТЕСТ: SN198525

5 = нет пилей, 1 = максимальное число пилей

Рис.11. Сравнительные результаты пиллингообразования тканей без обработки и после обработки препаратом Целлюсофт

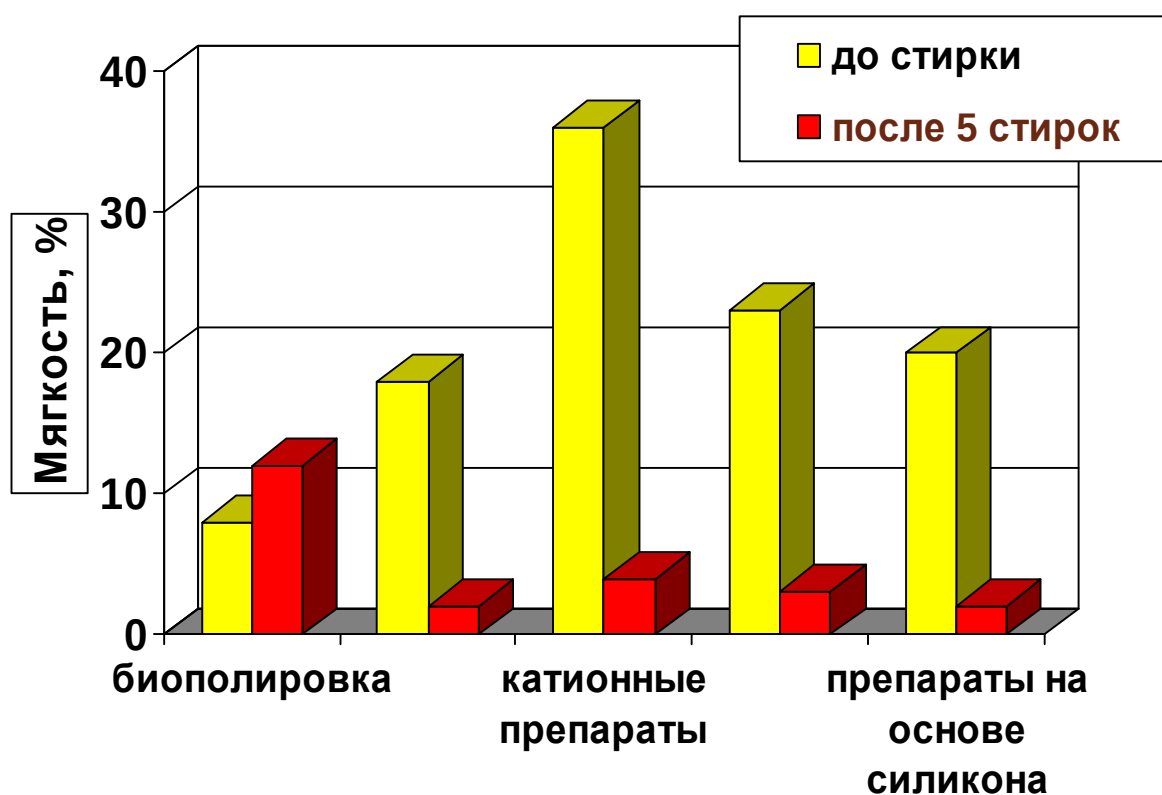


Рис.12 Сравнительные результаты устойчивости эффекта смягчения к стирке

Процесс «non stop – контролируемый гидролиз» заключается в последовательной обработке джинс: расшлихтовка Бактозолом MTN (или Аквазимом) и затем обработка Бактозолом СА (при pH 5) или Бактозолом СЕ

(при pH 6), или препаратом Целлюсофт. Применяется также одностадийный процесс с использованием Бактозоля FВ (или Денимакс комби). Благодаря такому способу обработки исключается использование механической обработки с абразивным материалом, например, пемзой или «агрессивной» отбели гипохлоритом натрия. (рис. 13)

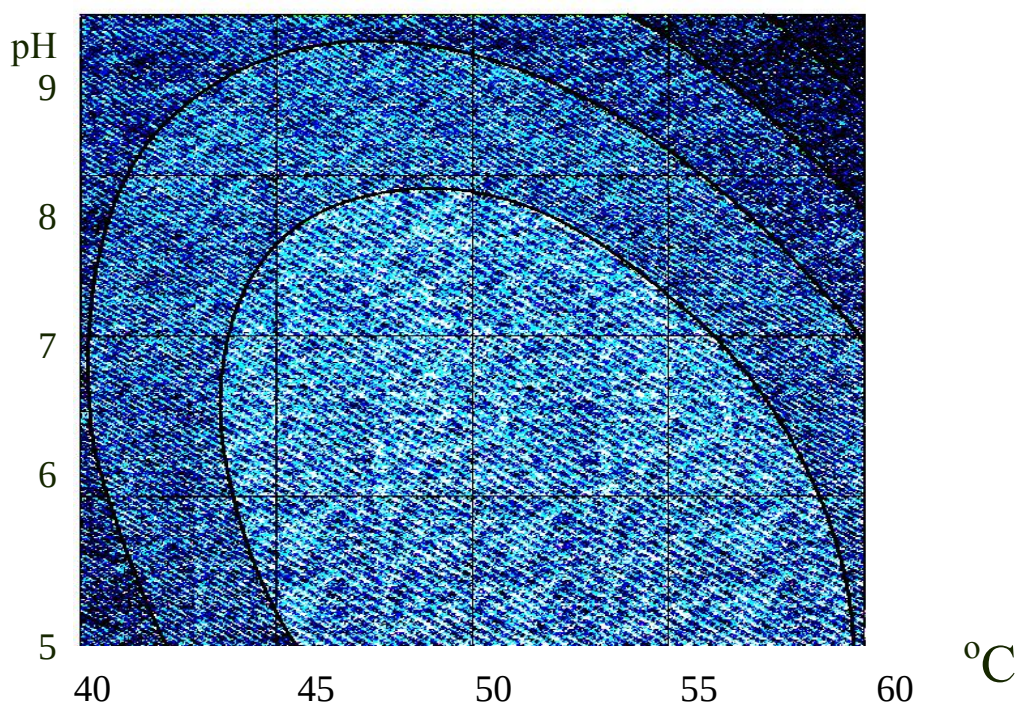
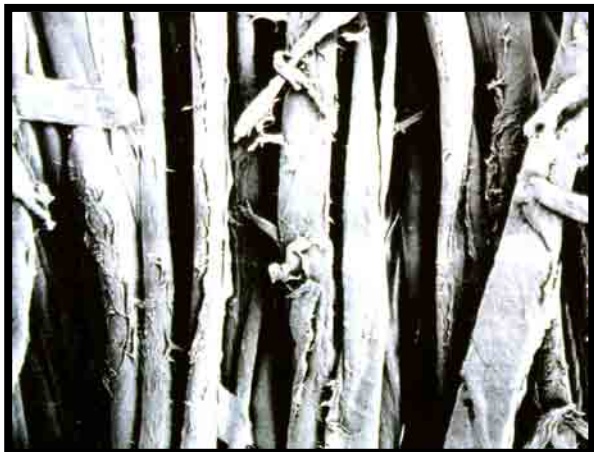
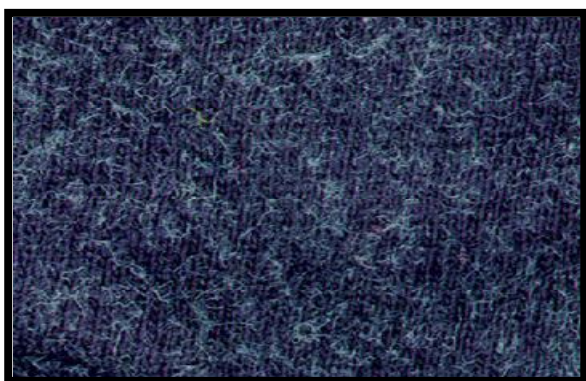


Рис. 13. Влияние pH и температуры на абразивный эффект, получаемый при обработке препаратом Целлюсофт джинсовых тканей.

Рекламируются ультрасовременные технологии ферментативной полировки волокон Тензель и Лиоцелл (гидратцеллюлозные волокна). Недостатком данных волокон является то, что при обработке в аппаратах с высокой турбулентностью (например, в эжекторах) волокно образует фибриллы, которые сильно портят внешний вид материала. Ферментативная полировка материала целлюлазами (например Целлюсофт ультра или Бактозоль СА, или СЕ) позволяет уменьшить количество макрофибрилл и улучшить качество волокна .

Отмечено повышение гидрофильных свойств текстильных материалов из целлюлозных волокон при использовании целлюлаз – продуцентов грибов *Trichoderma longibra*, *Cridfum virila*, *Fusarium solani* и других. В результате

частичного разрушения первичной стенки волокна происходит неполное удаление гидрофобных примесей и загрязнений с образованием на поверхности волокна гидрофильных участков. В процессе ферментативной обработки джутовых волокон целлюлатическим комплексом, например, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* или *Humicola insolens*, включающим ксиланазы, высокая гигроскопичность обеспечивается гидролизом гемицеллюлоз межфибриллярного пространства. Образующаяся сеть микрокапилляров повышает объём микропор. Так, например, ферментативный гидролиз целлюлозы *Asp.niger* IBT-90, содержащим в основном эндо-1,4 глюкканазу, увеличивает влагопоглощение с 176 до 226 % и белизну целлюлозных материалов на 38 %.



а) до обработки ферментом

б) после обработки Целлюсофт

Рис.14. Визуальный эффект биополировки на трикотажных полотнах

Известны способы энзиматической деполимеризации целлюлозы с целью повышения крашываемости материалов. Так называемая ферментативная «мерсеризация» вискозных тканей с использованием целлюлаз обеспечивает получение качественной окраски благодаря модификации

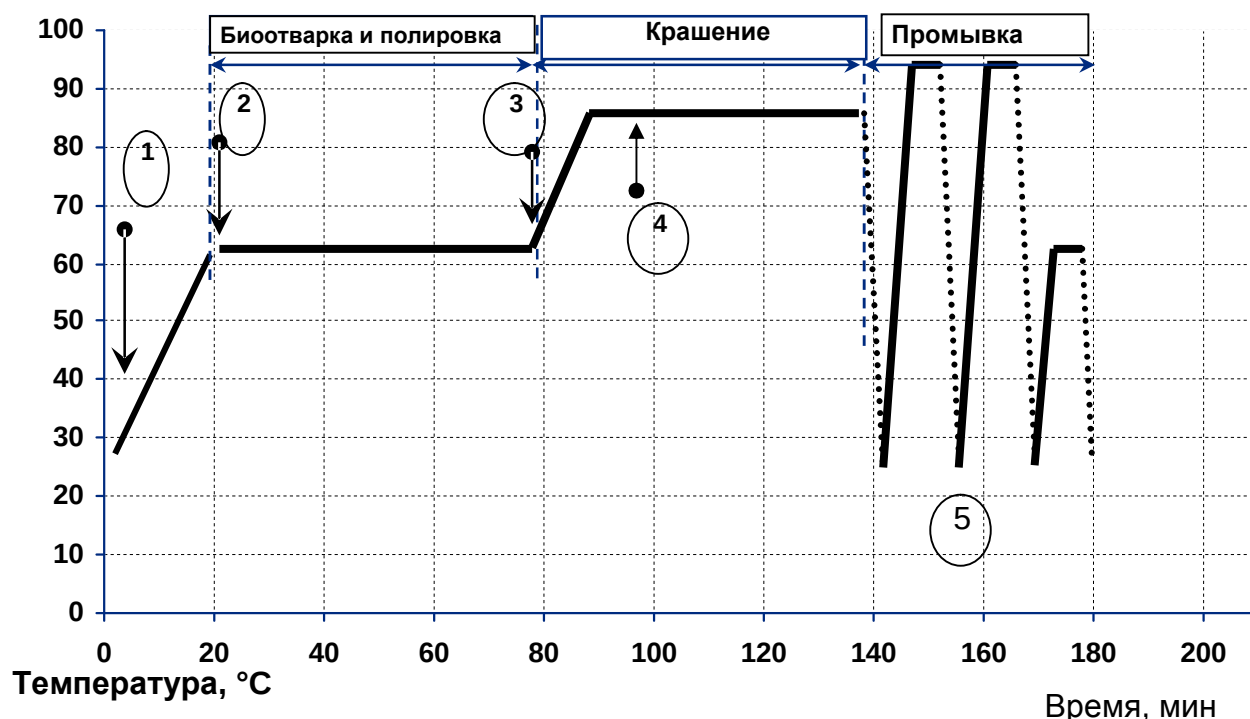
кристаллической структуры регенерированного волокна, а также изменению отражающих свойств поверхности волокон. Для тканей и трикотажных полотен ферментативную обработку целлюлазами можно проводить как до, так и после крашения при этом существенно улучшается внешний вид материала, повышается гладкость поверхности (рис.14,15). Обработку осуществляют различными составами, например, Бактозоль СА 15-60 мл/кг материала, ПАВ 2-3 мл/л при pH 5, температуре 60 °С в течение 30-90 минут или препататами типа Целлюзим, Целлюсофт 45-60 °С при pH 4,5-6. Аппаратурное оформление процесса может быть различным, но с обязательным условием механической активации, например линия ЛЖО или комбинирование оборудования обработки расправленным полотном и механических абразивных машин, например, AIRO -1000 S, ворсовальных машин и.т.д.

Разработано специальное оборудование для ферментативной подготовки целлюлозосодержащих тканей, отличительной особенностью которого является оснащение валами, на поверхности которых имеются иглы для увеличения трения. В ходе сравнительных испытаний установлено, что обработка текстильных материалов композицией пектиназ и целлюлаз в сочетании с механической активацией процесса позволяет осуществить депектинизацию на уровне 75 %, существенно повысить поглотительную способность текстильного материала.

Ферменты, вызывающие разрушение целлюлозы во внешних слоях волокна на участках с наименьшей упорядоченностью молекул, естественно, будут способствовать удалению с волокна нецеллюлозных примесей, изменению фрикционных и механических свойств, повышению гигроскопичности и сорбционной способности по отношению к красителям.

Ферментативная обработка текстильных материалов из целлюлозных волокон может привести к расщеплению концов волокон на поверхности пряжи или ткани, а также вызвать осыпание волокон в ходе последующей механической обработки, не исключена потеря прочности, поэтому необходимо строго контролировать степень и глубину воздействия ферментов, обеспечивая исключительно воздействие на поверхностные слои волокна.

Температура, °C



1- Смачиватель (ПАВ) 0,2 г/л, Амилаза NT 0,5-1 г/л (в случае подготовки тканей), 2- буфер до pH 5.5-6.5, Целловиридин 1-2 г/л г/л, Фибрезим 1 г/л, 3- соль, краситель, 4- щелочной реагент (фиксация), 5- промывка

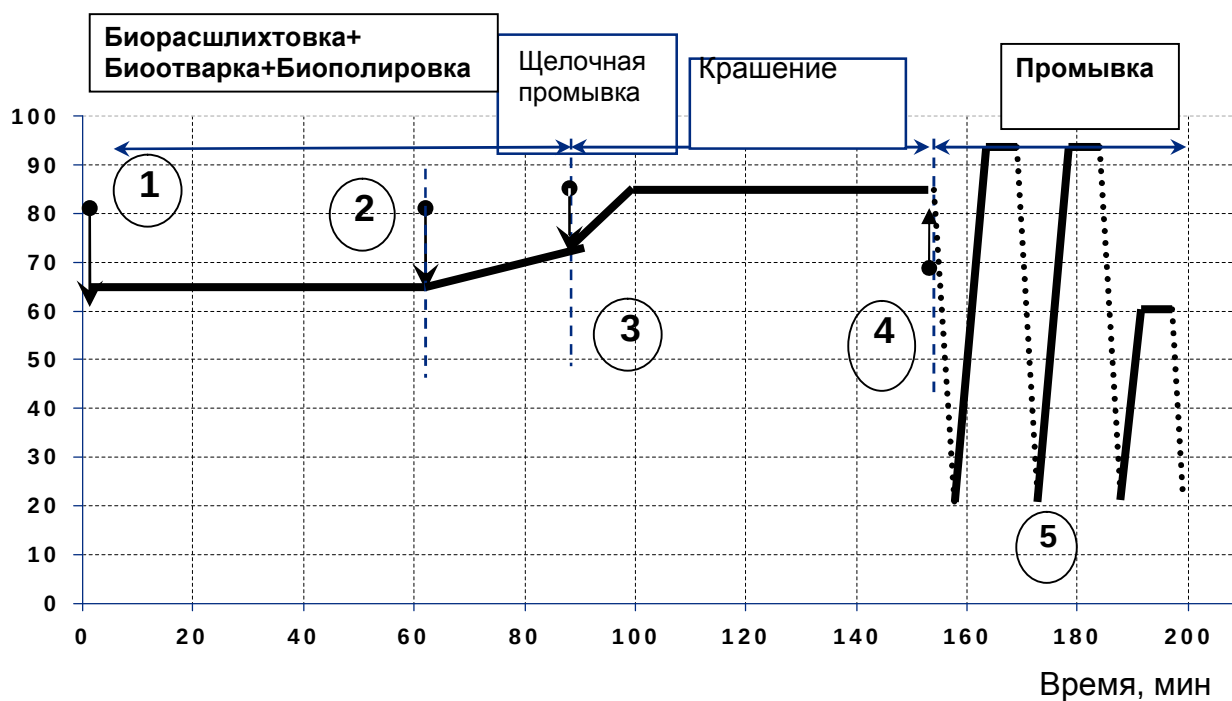


Рис. 15. Примерные температурные профили совмещенного режима ферментативной обработки и крашения целлюлозосодержащих материалов (пряжи, хлопчатобумажной, полульняной и льняной ткани)

Известны технологии ферментативной «мерсеризации» вискозных тканей с использованием целлюлаз, обеспечивающие увеличение крашываемости. Этот эффект достигается благодаря: модификации целлюлазами кристаллической структуры регенерированного волокна; вариации геометрических свойств отражения света волокнами. Как и в случае хлопка, эти изменения связаны с природой волокон. Такая обработка также повышает степень белизны на 5-8 единиц. Один из вариантов построения технологической схемы «ферментативной мерсеризации» вискозных тканей на оборудовании типа эжекторной барке или джиггере представлен обработкой составом препарата Бактозоль СА – 15-60 мл/кг материала, поверхностно-активного вещества Сандоклин РС – 2-3 мл/л при pH-5, температуре 60 °С в течение 30-90 минут.

Таблица 6

Технологии полировки тканей из волокна Тензель

Вид обработки	Ферментные препараты	Условия обработки
Расшлихтовка	Сандоклин РСJ – 1 мл/л Бактозоль MTN – 2 мл/л Сиррикс – 1 г/л	pH 6, T=60 °С, длительность обработки 20 минут, промывка водой
Отварка	Гидроксид натрия – 20 г/л Сандоклин РСJ – 0,5мл/л Имакол С – 1мл/л	T=70 °С, длительность обработки 50 минут, промывка водой
Ферментативная обработка перед крашением	Бактозоль СА – 1% Сиррикс 2UD – 1 г/л	pH 5, T=60 °С, длительность обработки 30 минут, промывка водой
Мягчение	Сандоперм MEJ – 2 % Церанин PNL - 1 %	pH 6, T=40 °С, длительность обработки 20 минут
10 минут обработка на тумблерной машине		

Рекламируются ультрасовременные технологии ферментативной полировки волокон Тензель и Лиоцелл (гидратцеллюлозные волокна). Недостатком данных волокон является то, что при обработке в аппаратах с высокой турбулентностью (например, в эжекторах) волокно образует фибриллы, которые сильно портят внешний вид материала. Ферментативная полировка материала Бактозолом СА или СЕ позволяет уменьшить количество макрофибрилл и улучшить качество волокна (табл.6).

С ужесточением современных стандартов качества продукции и норм ПДК веществ в сточных водах, предусматривающих полное исключение хлорсодержащих реагентов, разработка технологических режимов облагораживания текстильных материалов, где биотехнология заменяет экологически небезопасные классические химические методы воздействия, является весьма актуальной и своевременной. Впервые создание теоретических основ и разработка бесхлорных технологий отделки текстильных льносодержащих материалов позволили доказать возможность организации работы отечественных льняных текстильных производств на принципиально новом уровне и выпуска текстильных материалов, соответствующих требованиям ГОСТ и современным экологическим стандартам (табл. 7). Высокая экологическая безопасность предлагаемых процессов ферментативно-пероксидного беления подтверждена результатами проведенной экспертизы сточных вод. Выявлено снижение БПК с 200 до 133,2 и ХПК с 545 до 400 мг/л O_2 , повышение прозрачности сточных вод, снижение концентрации взвешенных веществ с 129,5 до 58 мг/л и уменьшение сухого остатка с 1720 до 799 мг/л.

Синергетический эффект от действия амилаз, пектиназ и целлюлаз благоприятствует увеличению сорбционной восприимчивости и реакционной способности целлюлозы по отношению к красителям. Установлено, что в процессе ферментативно-пероксидного беления достигается желаемый результат модификации целлюлозы волокна, обеспечивающий качественное крашение активными красителями в условиях регламентированных режимов. Несмотря на то, что белизна тканей отбеленных по ферментативно-

пероксидной технология в 3 стадии не превышает 74-78% для льняных тканей и 78-81 % для полульняных тканей, значения показателя K/S находятся на высоком уровне. Как показала практика отделки тканей, отбеленных по ферментативно-пероксидной технологии, в процессе крашения исключаются некоторые виды брака (белёные пятна и полосы).

Таблица 7.

Безгипохлоритные сокращенные режимы беления для линии ЛЖО, Бенингер, Вакаяма, линий «холодного» беления расправленным полотном, основанные на использовании Биотекс, Биофлекс, Биолен (общая продолжительность процесса от 3-х до 5,5 часов)

Биообработка Биофлексом, 50-60 °С, 30-60 мин, промывка щавелевой кислотой	Пероксидное беление, 85-95 °С (30-60 минут)	Пероксидное беление 20 °С (30-60 минут)	Пероксидное беление, 85-95 °С (30-60 минут)	Кислование, промывка
Биообработка Биофлексом, 50-60 °С, 30-60 мин, промывка щавелевой кислотой	Пероксидное беление, 85-95 °С (20-60 минут)	Пероксидное беление, 85-95 °С (20-60 минут)	Кислование, промывка	
Расшлихтовка щавелевой кислотой 50-60 °С, 30-60 минут	Пероксидное беление, 85-95 °С (30-60 минут)	Биообработка Биофлексом, 50-60 °С, (30-60 минут)	Пероксидное беление, 85-95 °С, (30-60 минут)	Кислование, промывка
Расшлихтовка Аквализом в присутствии щавелевой кислоты, pH 5,5, 30-50 °С, (30-60 минут)	Пероксидное беление, 85-95 °С	Биообработка Скаурзимом, pH 7-8, пропитка 60 °С, выдерживание на холоду 20-60 минут	Пероксидное беление, 85-95 °С	Кислование, промывка
Биообработка Биофлексом, 50-60 °С, 30-60 мин, промывка щавелевой кислотой	Пероксидное беление, 85-95 °С, 20-90 минут	Пероксидное беление 20 °С, 2-6 часов (в рулонах)	Кислование, промывка	
Биообработка Биофлексом, 50-60 °С, промывка щавелевой кислотой	Пероксидное беление 20 °С, 2-6 часов (в рулонах)	Пероксидное беление, 85-95 °С, 60-90 минут	Кислование, промывка	
Биообработка композиционным составом, 50-60 °С, 60 минут	Пероксидное беление, 85-95 °С, 60-90 минут	Подготовка пестротканей или льняных и полульняных тканей для крашения в темные тона		

Пример технологического режима бесхлорного беления льняных и полульняных тканей для линий «БЕННИНГЕР», « ВАКАЯМА»

1 СПОСОБ

1. Расшлихтовка: скорость 60 м/мин. Пропитка раствором фермента «БИОФЛЕКС» 0,5 -1г/л на плюсовке газоопальной машины , температура пропитки 50 – 60 °С , вылеживание в рулоне без подогрева 1 час.
2. Скорость движения ткани 40 м/ мин. Пропитка щавелевой кислотой 2,0 - 2,5 г/л, температура 60 °С, лежка в камере без подогрева 20 мин, промывка водой.
3. Пропитка щелочным раствором перекиси водорода,г/л:

Общая щелочность за счет соды	4,0 - 5,0
Активный кислород	4,5-5,5
Силикат натрия	5,0
Мочевина	5-15
Смачиватель	0,5-1
Температура пропитки	30 -35 °С

Вылеживание в камере при 85-90 °С в течение 25-30 мин.
4. Промывка на трех машинах при 75 - 70 - 65 °С.
5. Повтор стадий 2-4 для льняных тканей или стадий 3-4 для полульняных тканей.

2 СПОСОБ

1. Скорость 60 м/ мин. Расшлихтовка: скорость - 60 м/мин. Пропитка раствором фермента «БИОФЛЕКС» - 0,5 -1г/л на плюсовке газоопальной машины , температура пропитки -50 - 60° С , вылеживание в рулоне без подогрева - 1 час.
2. Скорость 45 м/ мин. Промывка раствором щавелевой кислоты - 2,0 - 2,5 г/л , температура 55-60°С, скорость движения ткани - 45 м/мин, промывка водой.
3. Пропитка щелочным раствором перекиси водорода, г/л:

Общая щелочность за счет соды	4,5-5,0
Активный кислород	5,0-5,5
Силикат натрия	5,0
Мочевина	5,0-10
Смачиватель	0,5
Температура пропитки -	30 -35 °С.

Вылеживание в камере при 75-85 °С.
Промывка на трех машинах - 75 - 70 - 65 °С.
4. Аналогично 2-3 для льняных тканей и 3 для полульняных тканей.

Технические показатели отбеленной ткани по способу 1: белизна 80-81 %, удельная вязкость 1,02 сП, капиллярность 130-140 мм.

Технические показатели отбеленной ткани по способу 2:

-белизна 80 %, удельная вязкость 1,07- 1,04сП, капиллярность 120-130 мм.

**Технологический режим ферментативно-пероксидного беления для машин рулонно-перемоточного типа (Джиггеров).
Технологический режим обработки ткани под крашение**

Наименование операций	Концентрация, г/л	Условия обработки
1. Расшлихтовка ткани		60 °С, 40 минут
Аквазим или Амилаза НТ	1	
Щавелевая кислота	1,5	
Смачиватель	0,2	
Промывка: горячая и холодная		
2. Окислительная варка		85 -90 °С, 40мин
Перекись водорода, акт.	5-5,5	
Силикат натрия	6,5	
Смачиватель	0,2	
Комплексообразователь (Трилон Б) или сульфат магния	0,2-0,7	
Сода каустическая	4,0	
Сульфат магния	0,1	
Общая щелочность	4,5	
Промывки: горячая и холодная		
3. Ферментативная обработка		60°, 40 мин
Брюзайм или Целловиридин	0,5-2	
Промывка: горячая и холодная		
4. Окислительная варка		85 -90 °С, 30 мин
Перекись водорода, 100 %	6-7	
Силикат натрия	6,0	
Мочевина	10-15	
Сода каустическая	2,8-3	
Комплексообразователь	0,2-0,7	
Смачиватель	0,25	
Общая щелочность	3,0	
Промывки; горячая и холодная		
5. Кислование		
Уксусная кислота	1,6	25 °С, 20 мин

Технические характеристики готовой ткани : ширина 153 см, поверхностная плотность 190,8 г/м², число нитей в утке 168, в основе 157, разрывная нагрузка по основе 730 Н, по утку 750 Н, белизна 78-80 %, капиллярность 70-100 мм.

Бесхлорное ферментативно-пероксидное беление для выпуска отбеленных тканей (линии ЛЖО или джиггеров системы ВК-3, «Кюстерс»)

1 вариант

- Расшлихтовка щавелевой кислотой 2-3 г/л, пропитка при 55-60 °С, выдерживание без подогрева в «ямях» или рулоне в течение 30 -120 минут;
- промывка теплой , холодной водой;
- ферментативная обработка взамен гипохлоритной обработки: Биофлекс 1 г/л или композиция амилазы (Амилаза НТ 0,5 г/л), целлюлазы и гемицеллюлазы (Брюзайм 1 г/л), температура пропитки 50-60 С, выдерживание при 50 °С в течение 60 минут;
- промывка горячей и холодной водой;
- пропитка белящим составом при температуре 40 °С: перекись водорода 5,5-6,0 г/л, силикат натрия 6,5-7 г/л, мочевины 5 г/л, смачиватель 0,5 г/л, сульфат магния 0,1-0,2 г/л, общая щелочность 4,0-4,8 г/л. Запаривание при 85-95 °С в течение 60 минут;
- промывка горячей и холодной водой;
- повтор пероксидного беления , кислдование и промывка.

2 вариант

- пропитка ферментом Биофлекс 0,5 г/л, температура пропитки 50-60 °С выдерживание без подогрева 60-120 минут;
- пропитка щавелевой кислотой 2 г/л взамен гипохлоритной обработки: температура пропитки – 60 °С выдерживание в шахте на холоду или рулоне 20-40 минут, промывка с ПАВ 0,1 г/л;
- перекисное беление: пропитка белящим составом при температуре 40 °С: перекись водорода 4,0-5,0 г/л (по активному кислороду), силикат натрия 5-6, мочевины 5 , смачиватель 0,5 г/л, общая щелочность (каустическая сода) до 4,5 г/л. Запаривание при 85-95 °С в течение 30-60 минут;
- промывка горячей и холодной водой;
- обработка щавелевой кислотой 2 г/л взамен гипохлоритной обработки;
- перекисное беление: пропитка белящим составом при температуре 40 °С: перекись водорода 5,0-5,8 г/л (по активному кислороду), силикат натрия 5-5,5, мочевины 5-10 , смачиватель 0,2-0,5 г/л, общая щелочность 3,8-4,0 г/л. Запаривание при 85-95 °С в течение 30-60 минут , промывка.

Бесхлорное беление для линии ЛЖО

- Расшлихтовка и смягчение препаратом Биофлекс 1-2 г/л, температура пропитки 50-60 °С, выдерживание в шахте при 50 °С 60 минут или ямах (60-120 минут);
- промывка;
- пропитка белящим составом при температуре 40-45 °С: перекись водорода 5-5,5 г/л, силикат натрия 4,5 г/л, мочевины 5-10 г/л, смачиватель 0,5-1 г/л,

триполифосфат натрия 1-3 г/л, общая щелочность 4-4,5 г/л. Запаривание при 80-85 °С в течение 60 минут;

- промывка горячей и холодной водой;
- щавелевой кислотой 1-2 г/л (пропитка при 50-60 °С) взамен гипохлоритной обработки, промывка;
- пропитка белящим составом при температуре 40-45 °С: перекись водорода 3,5-4 г/л, силикат натрия-5 г/л, мочевины –5-10 г/л, смачиватель 0,1-0,2 г/л. общая щелочность 3,5-4,0 г/л. Запаривание при 80-85 °С в течение 60-90 минут. Концентрация реагентов в шахте: пероксид водорода 2,5-3,5 г/л, силикат натрия 2,5-3,0 г/л + триполифосфат натрия 1-1,5 г/л, общая щелочность – 2;
- промывка горячей и холодной водой, кислование, промывка.

Специфическая делигнификация льняного волокна на стадии ферментативного и ферментативно-механического мягчения определяет особенности цветовых характеристик тканей на основе отваренной ровницы. Сохранение определенных хромофорных группировок в структурных элементах красящих примесей целлюлозы при ферментативном воздействии приводит к частичному отбеливанию. Мягкий гриф чистольняным материалам в шитых изделиях придается ферментативной обработкой мультиэнзимными препаратами, содержащими целлюлазы, например Целлюсофт (или его аналогами). Такую обработку можно проводить на джигерных машинах или аппаратах типа КТ-100, а также линиях непрерывного действия. Обработка может осуществляться до и после операции крашения и совмещаться с операцией механической обработки на машинах типа «Airo-1000s».

Установлено, что при длительности процесса ферментативной обработки 60-90 минут и последующей механической обработке на «Airo-1000s» в течение 30 минут обеспечивается повышение белизны природно-окрашенной льняной ткани на 8 ед, мягкости более чем на 40 %, капиллярности на 60 мм при незначительном снижении прочностных свойств ткани и вязкости медно-аммиачных растворов целлюлозы. Степень расшлихтовки достигает 98-99 %, суммарная степень удаления примесей превосходит результаты постадийной технологии обработки природно-окрашенных тканей путем щелочной отварки, обработки щавелевой кислотой и последующего механо-химического мягчения на 8-10 %.

Пример технологического режима подготовки тканей цвета «серого» льна и суровых полубелых тканей под крашение.

для линии ЛЖО :

-пропитка композиционным препаратом (типа Биофлекс 1-3 г/л) при температуре 50 °С , при рН 6,5-7, отжим и термостатирование при 30 -60 °С в течение 60-90 минут;

- промывка в растворе соды 1-2 г/л при температуре 75-85 °С (или щавелевой кислоты концентрацией 2-3 г/л); промывка горячей и холодной водой.

для джиггеров, линий подготовки расправленным полотном:

- пропитка ферментсодержащим составом при температуре 50-60°С, выдерживание ткани на «холоду» без дополнительного подогрева в течение 2-6 часов

- механическая обработка на AIRO-1000S в течение 30 минут (700 об/мин, производительность 250-1000 кг/час)

Совмещенный процесс ферментативной обработки и мягчения способствует снижению разнооттеночности полотен природно-окрашенной льняной ткани и повышению мягкости в 2 раза выше чем у тканей, подготовленных по действующей технологии, включающей щелочную отварку и мягчение с использованием синтетических мягчителей.

Ферментативная обработка отбеленных льняных и полульняных тканей перед крашением позволяет заметно повысить качество окраски. Практически подтверждена возможность исключения из технологического режима крашения тканей операции запаривания острым паром (10 минут) и операции обработки композицией синтетического мягчителя. Использование фермента Целлюсофт (или его аналогов) концентрацией 2-3 г/л при температуре 50-60 °С в течение 30-60 минут в нейтральном растворе позволяет значительно сократить расход ТВВ. Высокая экологичность предлагаемых совмещенных процессов подготовки и мягчения подтверждается снижением БПК с 8881 до 545, ХПК с 4991 до 180 мг/л O₂, повышением прозрачности сточных вод с 9 до 20, значительным снижением концентрации взвешенных веществ со 165,3 до 6 мг/л и существенным уменьшением сухого остатка с 4991 до 180 мг/л.

Известны биохимические режимы беления отходов льняного производства и получения ватных полуфабрикатов. В результате многоатаковости действия ферментов на многокомпонентный субстрат на первой стадии процесса происходит не только гидролитическая деструкция примесей короткого льняного волокна, частичная делигнификация, но и модификация самой целлюлозы. Изменение микрорельефа поверхности волокна в результате расщепления комплексного волокна, удаления гемицеллюлоз, выполняющих роль гидрофобного “аморфного наполнителя” и занимающих пространство между микрофибриллами целлюлозы, а также образование микронеровностей на поверхности волокон за счет действия целлюлазы приводит к увеличению площади контакта жидкости. Следствием таких изменений является высокая сорбционная восприимчивость и реакционная способность целлюлозы к белящим реагентам и как результат эффективное отбеливание льна.

Полный технологический режим беления льноотходов включает ферментативную обработку препаратом (Биофлекс или Целловиридином или его аналогами) концентрацией 0,5 – 3 г/л (в зависимости от активности ферментов в них входящих) при рН 6-7 и температуре 50-60 °С и далее щелочно-пероксидное беление по технологии, приближенной к способам подготовки хлопкового волокна. Установлено, что беление льняного волокна, прошедшего стадию ферментативной обработки, во избежание глубокой котонизации, образования фракции пуховых волокон и, следовательно, высокой потери массы, необходимо осуществлять в условиях сравнительно низких концентраций гидроксида натрия (не более 1-1,7 г/л) и концентрации пероксида водорода не более 2-2,5 г/л. Капиллярность полученного отбеленного котонина достигает 105-110 мм, поглотительная способность увеличивается до 16,9-17,1 г/г, белизна от 68 до 78 %, а потеря массы при этом не превышает 25-28 %, что на 6-9 % ниже результатов после щелочно-пероксидной обработки.

Аналогичные технические решения предлагаются для ферментативной обработки других лубяных волокон (конопли, рами, джута). Эффективное удаление лигнина и гемицеллюлоз (особенно ксиланов, обуславливающих

жесткость сырья) существенно повышает эластичность волокон в процессе прядения. Ферментативные обработки, обеспечивающие деструкцию гемицеллюлоз в низкосортном льняном сырье, используются в процессе получения нитроцеллюлозы. Снижение степени полимеризации целлюлозы и увеличение количества активных групп для нитрования, в результате ферментативного гидролиза положительно сказывается на подготовке целлюлозной пульпы. Особенно эффективны для этой цели эндоглюканазы и ксиланазы комплекса *Cellulosycticum*.

Список рекомендуемой литературы к главе

1. Целлюлатические микроорганизмы и ферменты: сб. итоги науки и техники АН СССР. Сер. Биотехнология. – М. – 221 с.
2. Клесов, А.А. Биохимия и энзимология гидролиза целлюлозы / А.А. Клесов // Биохимия. – 1990. – Т.55. – №10. – С. 1731 – 1765.
3. Fornellis. Der Einsatz von Komplexbindern in der Vorbehandlung von Cellulosefasern und deren Mischung mit Aynthesefasern // Textilveredlung. – 1982. – Vol.17. – № 8. - S. 330 – 333.
4. Митькевич, О.В. Различные механизмы гидролиза растворимой и нерастворимой целлюлозы под действием ферментов целлюлазного комплекса / О.В. Митькевич, А.П. Синицын // Химия целлюлозы. Ч.2: Материалы V Всесоюзной конф. по химии и физике целлюлозы. – Ташкент. – 1982. – С. 65–66.
5. Andoh, M. Funayama, H. Hayashi, Y. Kobayashi and Y. Maeda, Amano Pharm. KK. Japanese Patent Application WO9802531-A, Jan. 22, 1998.
6. Sakai. Biotechnological Cotton Scouring / Sakai // Dyeing Industry (in Japanese). – 1995. – № 43(4). – P. 162–175.
7. Conghlan, M.P. Biochemistry and genetics of cellulose degradation / V.H. Conghlan, L.G. Ljungdahl, J.P. Aubert, P. Begnan, J. Millet // FEMS Symposium. – London: Academic Press. – 1988. – Vol.43. – P.11–30.
8. Niels Kriebs Lange. Biopreparation mild and environmentally friendly process for cotton / IFATS Congress. – 1999. – S.408.

9. Csiszár, E. Bioscouring of Cotton Fabrics with Cellulase Enzyme, In Enzyme Applications for Fiber Processing / E. Csiszár, G. Szakács, I. Rusznák, K. Eriksson, A. Cavaco-Paulo // ACS Symposium Series 687, Washington, D.C. – 1998. – P. 204-211.
10. Гребешова, Р.Н. Использование микробных ферментных препаратов в СССР / Р.Н. Гребешова. – М.: ОНТИТЭИмикробиопром, 1982. – 44 с.
11. Чешкова, А.В. Безгипохлоритное беление льносодержащих текстильных материалов / А.В. Чешкова, А.П. Кузьмин, С.Ю. Шибашова // Изв. вузов. Технология текстильной промышленности. – 2002. – № 4-5. – С. 75-78.
12. Jimener, L. Использование ферментов при отбелке целлюлозной массы. Vti Liracion de enzimas en el blangueo de pastes celulosicas pars papel Revision Bibliografica / L. Jimener, E. Navvarro, J. Ferrer // Afinidad. – 1997. – Vol. 54. – №467. – P.38-44.
13. Vig A. Enzymatic depolymerization of cotton cellulose limited and decelerated by its preexistent azoreactive dyeing / A. Vig, E. Paszt, M. Czilik, I. Reczey, I. Rusznak, Hungary // 18 IFATCC “Congress 1999”. – Copenhagen, 1999. – S.163.
14. Biofinishing of cotton with Trichoderma reesei cellulases: 18 IFATCC “Congress 1999”. - Copenhagen. – S.193.
15. Новорадовский, А. Применение ферментов концерна “Клариант” в отделке текстильных материалов / А. Новорадовский // Текстильная химия. – 1998. – №2. – С. 73-84.
16. Чешкова, А.В. Технология биомодификации льняного волокна для получения котонина / А.В. Чешкова, С.А. Кундий, В.И. Лебедева, Б.Н. Мельников // Льняное дело. – М., 1997. – №1. – С. 35-38.
17. Чешкова, А.В. Биомодификация короткого льняного волокна / А.В. Чешкова, С.А. Кундий, Б.Н. Мельников / Перспективные материалы. – М., 1997. – №5. – С. 50-54.

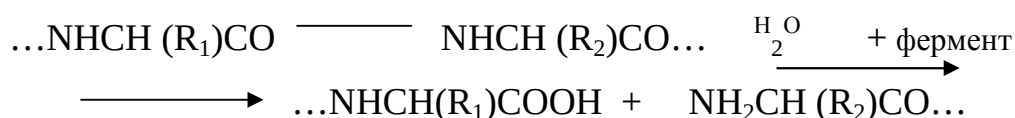
1.5. Особенности действия гидролитических ферментов на белки и липиды. Классификация протеаз

На данный момент существует две классификации протеолитических ферментов по типу активного центра (АЦ) и по типу катализирующей реакции. Исследования, проведенные на кафедре химической энзимологии МГУ показали, что каталитический АЦ карбоксильных гидролаз содержит две или несколько карбоксильных групп. В эту группу ферментов входят ферменты, расщепляющие как сложные эфиры, амиды, так и простые эфирные связи. Обычно ферменты этой группы характеризуются рН-оптимумом при относительно низких значениях рН. Протонированная карбоксильная группа принимает участие в активации субстрата в качестве обобщенной кислоты, депротонированная форма – в качестве основания при активации воды. Механизм согласованного действия двух карбоксильных групп, выступающих в качестве нуклеофила (активатора воды) и электрофила (активатора субстрата), – предмет детального обсуждения в литературе.

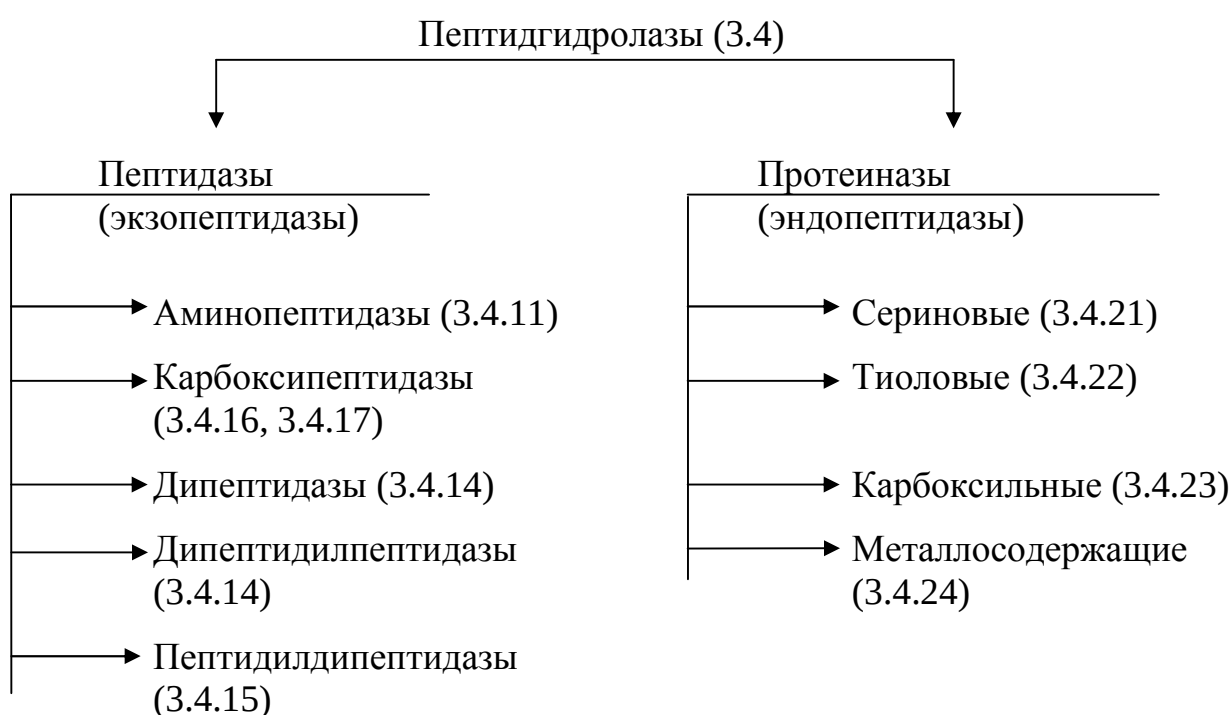
Типичными представителями Zn^{2+} -, Co^{2+} -, Ni^{2+} -зависимых гидролаз являются карбоксипептидаза А и термолизин. Ионы металла (Zn^{2+} или Co^{2+}) образуют комплексы с белком унифицированной структуры. Как известно, ионы металла в АЦ ферментов могут осуществлять функции как электрофильного агента, активирующего атакуемый реакционный центр, так и электрофильного активатора воды – генератора гидроксильных ионов. Комплекс иона металла в структуре АЦ выступает в виде электрофильного агента, активирующего атакуемый реакционный центр субстрата. Активация воды осуществляется основанием в виде депротонированной карбоксильной группы. Образование комплекса иона кобальта с субстратом приводит к индуцированию положительного заряда на реакционном атоме фосфора, что облегчает нуклеофильную атаку и нуклеофильное замещение. Второй ион металла в АЦ ортофосфатгидролазы выступает в виде генератора ионов OH^- . Ион металла выступает в качестве электрофильного агента, вытесняя протон из воды, что ведет к образованию в

активном центре подвижного и высокореакционноспособного гидроксильного иона.

Наряду с классификацией по типу активного центра существует классификация **по типу катализирующей реакции**. В подкласс пептидгидролаз (протеазы, протеолитические ферменты) включены ферменты, расщепляющие пептидную связь, которая является одной из разновидностей амидной связи. Гидролиз идет по схеме:



Расщепление пептидной связи в точках, удаленных от конца молекулы, осуществляют эндопептидазы. Их делят на четыре группы: сериновые, тиоловые, карбоксильные и металлосодержащие. Отщипление концевых аминокислот и дипептидов, а также гидролиз дипептидов катализируют экзопептидазы. Экзопептидазы включают пять групп протеолитических ферментов, важнейшими из которых являются аминопептидазы и карбоксипептидазы. Существующая классификация пептидгидролаз не является совершенной, так как в ней используются в качестве разграничительных различные признаки: деление пептидаз на группы проведено по субстратной специфичности, а протеиназ – **по структуре активного центра**. Современная структура разделения протеаз на группы представлена схемой:



На доступность пептидных связей гидролизу с участием протеаз влияют вторичная, третичная и четвертичная структуры белков. По характеру вторичной структуры различают белки: полностью α -спирализованные; белки с преобладанием складчатых β -структур; белки, в которых участки с α - и β -структурой разделены вдоль полипептидной цепи (тип $\alpha+\beta$); белки, где α и β -структуры смешаны (тип α/β). Для многих белков характерно наличие структурированных участков – доменов, соединенных между собой участками с неупорядоченной структурой цепи. Очевидно, что в упорядоченных структурах определенные участки полипептидной цепи экранированы и недоступны действию ферментов. Чем выше степень упорядоченности структуры, тем менее белок подвержен протеолизу.

Третичная структура белка, его геометрическая форма определяют соотношение экспонированной и экранированной частей молекулы (то есть доступной и недоступной протеолизу), а также колебания этого соотношения в пределах допустимого изменения конформации нативного белка. Наименее доступны протеолизу молекулы, форма которых близка к шару.

Четвертичную структуру имеют белковые молекулы, состоящие из субъединиц. Последние могут быть ассоциированы за счет ковалентных, ионных и водородных связей. Ассоциация субъединиц снижает относительную величину экспонированной части молекулы, увеличивает ее конформационную стабильность за счет внутримолекулярных взаимодействий, следовательно делает белок устойчивее к расщеплению ферментами.

Ассоциированные молекулы менее доступны действию ферментов, чем диссоциированные. Равновесие ассоциации-диссоциации сдвигается под влиянием внешних факторов, таких как реакция среды, ионная сила, присутствие хелатов, детергентов, восстановительных агентов и др. Эти факторы могут использоваться для регуляции ферментативного гидролиза белков, имеющих четвертичную структуру, к которым в частности относится протеин и кератин шерстяного волокна.

В белках и полипептидах пептидные связи по своим параметрам практически не отличаются от связей в низкомолекулярных пептидах. Однако в нативных полимерах не все связи, соответствующие специфичности используемого фермента, могут быть гидролизованы. Часть таких связей остается недоступной действию фермента из-за особенностей пространственной конформации субстрата (рис. 16).

Различия в пространственной структуре белков, их конформационной подвижности, доступности тех или иных остатков внешним воздействиям определяют разнообразие субстратной специфичности протеаз. Физиологическая роль протеаз определяется их участием в белковом обмене. Эту роль выполняют как внутриклеточные, так и внеклеточные протеазы.

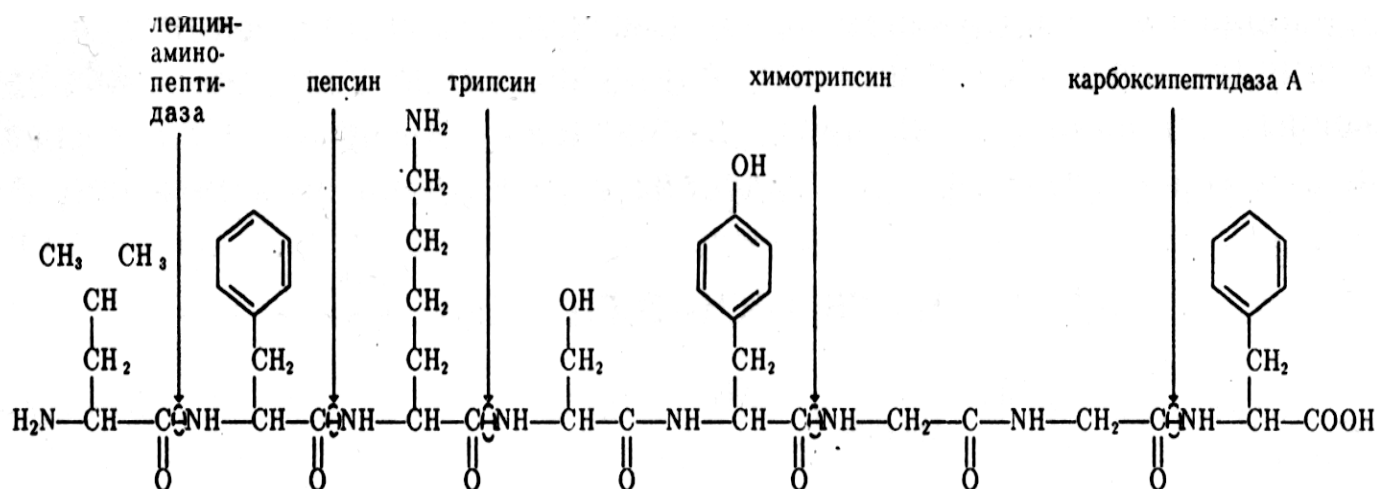


Рис. 16. Точки приложения действия протеолитических ферментов на пептидные связи в белковой молекуле.

Промышленные препараты протеолитических ферментов выделяют из сырья, содержащего секретируемые ферменты. Для выяснения причин различного действия протеаз необходимо знать особенности строения и оптимальные условия проявления каталитической активности ряда протеаз.

Сериновые протеиназы объединяют группу ферментов, имеющих в активном центре каталитически активный остаток серина. Сериновые протеиназы ингибируются реагентами, взаимодействующими с этими остатками серина, такими как диизопропилфторфосфат (ДФФ),

фенилметилсульфонилфторид, а также природными протеолитическими ингибиторами животного, микробного и растительного происхождения. Все сериновые протеиназы проявляют максимальную активность в нейтральной и щелочной средах. В группу сериновых входят многие внутриклеточные протеиназы микроорганизмов. Это секретируемые протеиназы *B.subtilis* – субтилизины А, В ВРН¹ – белки молекулярной массы 26,3-27,5 кДа, активные в зоне рН 8-11; сериновые протеиназы типа субтилизина, продуцируемые различными типами бацилл; мощные внеклеточные литические протеиназы *B.subtilis*, *Achromobacter lyticus*, *Mycobacter* – белки с молекулярной массы 20-28 кДа с оптимумом действия при рН 7,8-9; внутриклеточные протеиназы *B.subtilis*, протеиназы пекарских дрожжей.

К сериновым относятся также протеиназы актиномицета *Str. griseus* – белки с молекулярной массой 16-27 кДа с оптимумом действия при рН 8-10, входящие в комплекс проназы, а также сходные с ними трипсиноподобные сериновые протеиназы *Act. fradiae*, *Act. rimosus* и других актиномицетов.

Промышленность выпускает множество препаратов, в состав которых входят секретинные сериновые протеиназы. Это тресин, химотрипсин, панкреатин, проназа, римопротелин, щелочная бактериальная протеиназа (протосубтилин щелочной), литические протеиназы (лизосубтилин и др.). Внутриклеточные сериновые протеиназы не выделяют специально в виде препаратов, поскольку они содержатся как сопутствующие во многих гидролитических ферментных препаратах. Присутствие щелочных сериновых протеиназ в неочищенных ферментных препаратах может приводить к потере активности последних за счет протеолитической инактивации. Сериновые протеиназы могут долго сохранять активность в препаратах других белков, будучи защищены специально разработанными наполнителями.

Тиоловые протеиназы. В эту группу входят пептидгидролазы, для проявления каталитической активности которых существенна сульфгидрильная группа цистеина. Тиоловые протеиназы ингибируются пара-хлормеркурийбензоатом, йодацетатом и другими окислителями, а также

ионами тяжелых металлов. Активируются тиоловыми агентами и другими восстановителями (меркаптоэтанолом, цистеином, бисульфитом натрия и др.) Большинство тиоловых протеиназ имеет рН-оптимум в слабокислой или нейтральной зоне. К тиоловым принадлежат широко применяемые в практике протеиназы растительного происхождения – папаин, химопапаины А и В, бромелаин, проявляющие активность при рН 5-7, фицин – рН 6-9,5. Это протеиназы широкой субстратной специфичности, которые гидролизуют в белках пептидные связи, образованные лейцином или глицином. Другие типы связей, в том числе характерные для специфичности пепсина, трипсина, химотрипсина, карбоксипептидазы, также могут расщепляться, хотя и с меньшей скоростью. Благодаря этому растительные тиоловые протеиназы более глубоко гидролизуют белки, чем сериновые и карбоксильные протеиназы животного происхождения. Тиоловые протеиназы продуцируют различные микроорганизмы – клостридии, стрептококки, стафилококки. Установлено, что микробные тиоловые протеиназы наиболее активны при рН 7-8,8.

В активный центр **карбоксильных протеиназ** входят остатки дикарбоновых аминокислот. Карбоксильные, или кислые протеиназы, за малыми исключениями, проявляют активность в кислой среде. Ингибиторами активности являются диазокетоны, для некоторых представителей группы – эпоксисоединения и микробный ингибитор пепстатин. К числу кислых протеиназ относятся пепсины млекопитающих с оптимумом действия при рН 2-4. Пепсин проявляет специфичность в отношении связей, образованных аминокислотными группами тирозина или фенилаланина. Наличие свободной аминокислотной группы вблизи пептидной связи препятствует гидролизу, а карбоксильная – увеличивает его скорость. Пепсин расщепляет различные животные и растительные белки, в том числе казеин, коллаген, глютин, эластин, кератин, гистон и др. Способность синтезировать кислые протеиназы широко распространена у микроскопических грибов – аспергиллов (*Aspergillus niger*), пенициллов, мукооров, *Rhizopus*, *Trichoderma* и др. Эта группа ферментов, проявляет активность при рН 2-4, молекулярная масса большинства кислых

протеиназ грибов лежит в пределах 32-39 кДа. Внеклеточные кислые протеиназы грибов, наряду с другими видами протеолитических ферментов, входят в состав комплексных препаратов из культур микромицетов, таких как амилоризин, пектаваморин, пектофоедин, целловиридин, целлюлаза – 100 и др. Из аспергиллов выделяют очищенные препараты кислой протеиназы, предназначенные для пищевой промышленности и медицины.

Металлосодержащие протеиназы – это ферменты, в активный центр которых входит ион или ионы металлов, существенные для проявления каталитической активности. Такими металлами чаще всего являются цинк, кобальт или марганец. Некоторые металлопротеазы содержат как единственный металл кальций или магний. Кальций может входить в молекулу фермента, также как ион-стабилизатор. Так, в металлопротеазе *B.subtilis* цинк является каталитически активным металлом, а кальций – стабилизатором.

Металлы играют важную роль в каталитическом акте. С их помощью образуется тройной координационный комплекс: фермент-металл-субстрат. При этом стабилизируется высшее валентное состояние металла. Ионы металла могут образовывать координационные связи с атомами азота, серы, кислорода – атомами с неподеленными парами электронов. Отток электронов от групп $>C=O$ и $-NH-$ к иону металла облегчает разрыв пептидной связи. Все металлопротеазы ингибируются хелатными агентами. Инактивация чаще всего носит обратимый характер. При введении в среду избыточного количества соответствующего иона металла или после удаления хелата диализом, ультрафильтрацией активность восстанавливается.

Металлопротеиназы широко распространены у бактерий, встречаются и у микроскопических грибов. Бактериальные металлопротеиназы – белки с молекулярной массой 28-48 кДа, проявляющие активность в нейтральной и слабощелочной средах, при pH 6,5-9.

Нейтральная бактериальная протеиназа из *B.subtilis* 103 – белок с молекулярной массой 30,5-34 кДа, оптимум действия при pH 7-7,5 и температуре 50 °C. Фермент стабилен при pH 7-8 и комнатной температуре,

расщепляет преимущественно пептидные связи, образованные аминокетупами гидрофобных аминокислот (фенилаланина, валина, норвалина), не обладает ни амидазной, ни эстеразной активностью. Известно, что данный фермент гидролизует казеин, гемоглобин, желатину, яичный и сывороточный альбумин, белки зерновых культур и клеточных стенок микроорганизмов.

Аминопептидазы катализируют отщепление N-концевых аминокислот от молекул пептидов и белков. Большинство аминопептидаз относится к числу металлоферментов, для проявления их активности необходимы ионы цинка, кобальта, марганца, магния, кальция. В активном центре могут быть один или два вида металлов. Ионы металлов могут быть прочно связаны в активном центре (каталитически активные ионы) или выступать как активаторы, лабильно связывающиеся с ферментом. Хелаты и тяжелые металлы подавляют активность металлосодержащих аминопептидаз. Важной аминокислотой активного центра аминопептидаз является тирозин, возможно, гистидин. У некоторых аминопептидаз каталитически активной является сульфгидрильная группа цистеина, на что указывает ингибирование солями ртути и N-этилмалеинимидом. Некоторые аминопептидазы относятся к числу сериновых.

Металлозависимые аминопептидазы обнаружены в комплексных протеолитических препаратах из *B.subtilis* – бактерии, широко используемые как промышленный продуцент ферментов.

Карбоксипептидазы катализируют отщепление аминокислот от C-концов пептидов и белков. Карбоксипептидазы широко представлены у растений, микроорганизмов и животных, они играют важную роль в белковом обмене. Среди карбоксипептидаз встречаются и металлоферменты. Большинство растительных карбоксипептидаз относятся к сериновым ферментам. Карбоксипептидазы – белки с молекулярной массой от 30 до 160 кДа. Оптимальный pH для грибных карбоксипептидаз 3-5,3, для бактериальных 8-9,8. Оптимальная температура действия в частности для карбоксипептидаз *A. oryzae* 40-50 °C, *B.stearothermophilus* 55 °C. Ферменты аспергилла стабильны при температуре до 50 °C.

Карбоксипептидазы могут иметь различную структуру активного центра. Карбоксипептидазы некоторых грибов и актиномицетов являются металлоферментами, для проявления активности которых необходимы ионы цинка, марганца, магния, кальция. Цинк и кальций присутствуют в активном центре карбоксипептидазы стрептомицета (препарат проназа), цинк найден в составе карбоксипептидаз *Corynebact. equi*, *Pseudomonas*. Известны микробные карбоксипептидазы, не содержащие прочно связанных металлов, но активирующиеся в присутствии ионов металлов. Металлосодержащие карбоксипептидазы ингибируются хелатами, кислые карбоксипептидазы грибов – детергентами. Карбоксипептидазы микроорганизмов гидролизуют субстраты, имеющие на С-конце свободную α -карбоксильную группу, на N-конце предпочтительно наличие защитных радикалов – карбобензокси или гиппурила.

Для карбоксипептидаз микроскопических грибов аспергиллов и пенициллов характерна широкая субстратная специфичность. Ферменты пенициллов отщепляют от пептидов остатки пролина, лизина, аргинина, глицина, глутаминовой и аспарагиновой кислот. В случае протеазы, имеющей активность по отношению к серину и цистеину, протеолиз протекает по кислотнo-основному типу. Гидролиз субстрата происходит по механизму кислотнo-основного катализа имидазола с переносом протона, что доказывает большую роль pH среды в процессе. Анализ молекулярной массы ферментов показывает, что они содержат 240-250 остатков аминокислот в одной белковой цепи с пятью дисульфидными связями. В реакцию вступают серин, имидазольное ядро в остатке гистидина, а также гистидин (рис. 17).

Протеазы, включая подгруппы пептидаз и протеиназ, превращают молекулы белков или полипептидов в органические кислоты и амины. Эти ферменты действуют как эндопептидазы, т.е. они атакуют не только концевые пептидные связи, но и находящиеся в белковой цепи, тогда как экзопептидазы атакуют только конечные связи в цепях .

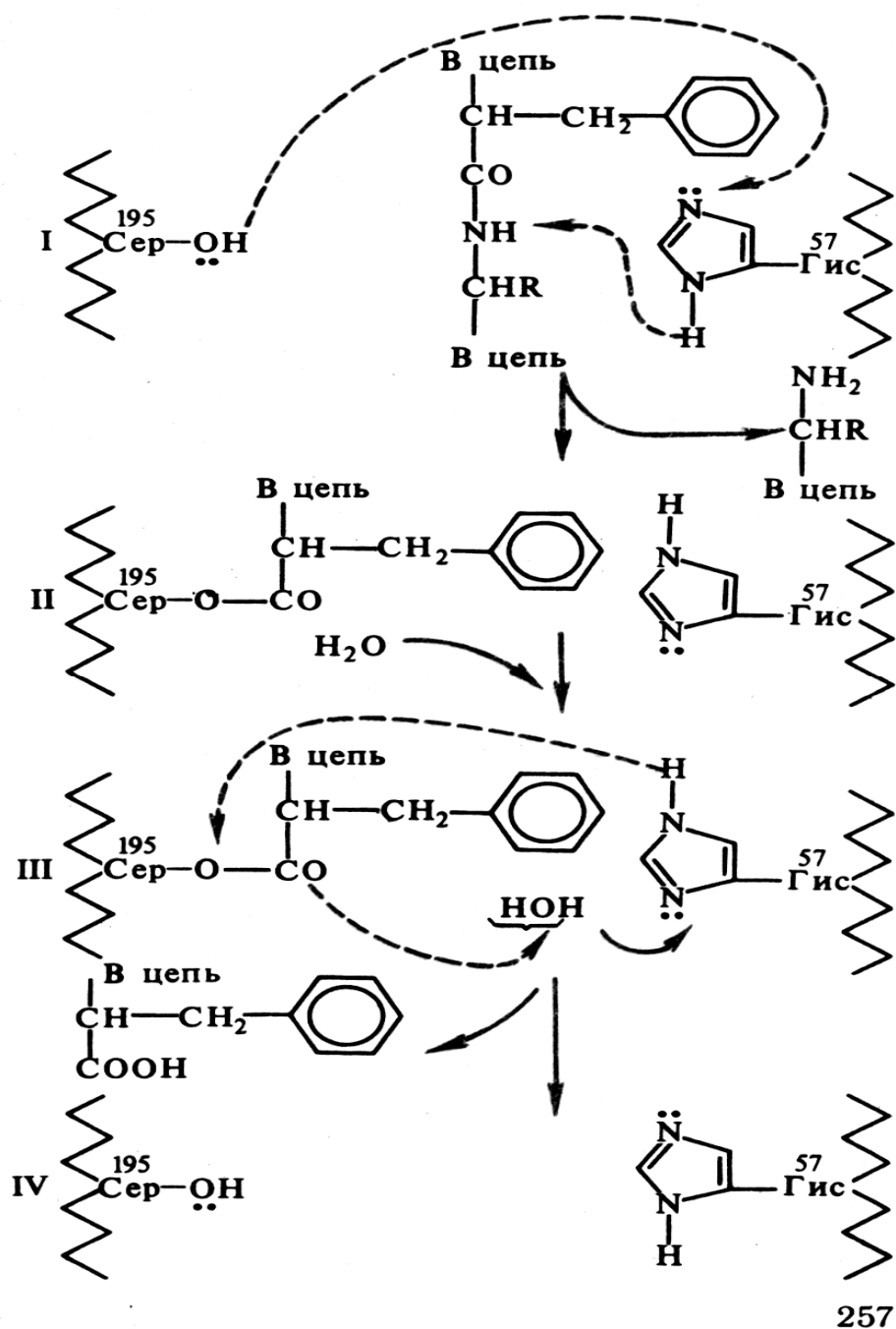


Рис.17. Упрощенная схема гидролиза пептидной связи в активном центре химотрипсина

Из приведенных литературных сведений о протеазах и липазах следует, что при выборе ферментных препаратов для конкретных технологических целей, требуется предварительная их оценка по свойствам, в частности, температурным и pH – оптимумам действия, совместимости с применяемыми химическими реактивами, которые могут являться ингибиторами ферментов. Применение протеаз в отделочном текстильном производстве можно отнести к

пионерским работам. Исследовательские работы проводятся различными научно-исследовательскими школами и фирмами в течение 5-7 лет. При разработке современных промышленных процессов наблюдается интеграция биотехнологий, которые универсально заменяют или дополняют химические технологии.

Основные направления использования препаратов на основе протеазы в текстильных производствах:

- 1) **в составе моющих средств**, в том числе используемых и в отделочном производстве на текстильных предприятиях;
- 2) **в «биоотварке»** текстильных материалов из хлопка, волокна которого содержат остатки протоплазмы, которая, в свою очередь, содержит белковые соединения;
- 3) **в обесклеивании натурального шелка** – удалении шелкового белкового клея (серицина). Для осуществления этого процесса предстоит синтезировать специальные серицинолитические протеазы;
- 4) **альтернативное «хлорирование»** для частичного **удаления чешуйчатого слоя шерсти**. Традиционно для этой цели используют различные окислители (обычно хлорсодержащие), что делает процесс экологически грязным. Кроме того, в ходе окисления может происходить потеря механической прочности шерсти. Более перспективным является синтез протеаз кератинолитического характера, что позволяет в более мягких и экологически безопасных условиях проводить отторжение чешуйчатого слоя и придавать изделиям из шерсти малосвойлачиваемость и повышенную крашиваемость;
- 5) для целенаправленной модификации внешней поверхности шерстяных и шелковых волокон чтобы придать изделиям из них новые потребительские эффекты (**эффект «лунного света», мягкость, драпируемость** и др.) с помощью протеаз кератино- и фибринолитического характера. Грубая шерсть приобретает после такой обработки свойства тонкой мериносовой шерсти, что особенно важно для российских производителей шерстяных тканей, поскольку отечественное овцеводство производит в основном полугрубую шерсть.

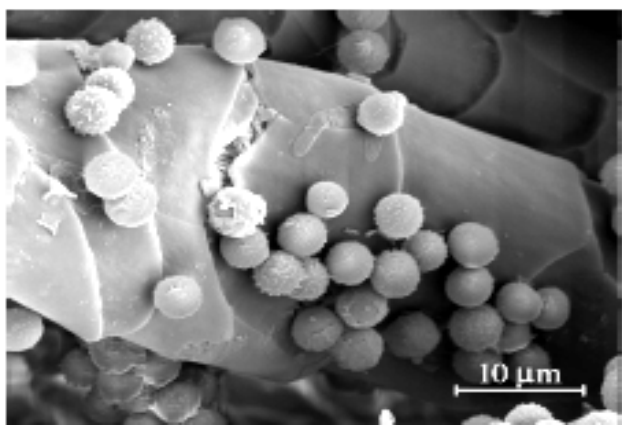
6) создание ферментативных препаратов для одновременного **умягчения** шерстяных и тонкосуконных тканей и удаления некератиновых протеинов, содержащихся на поверхности волокна. Использование этих препаратов снижает показатель жесткости текстильных полотен, уменьшает склонность полотна к образованию трудно расправляющихся заломов и заминов. Это позволяет компенсировать недостающие качества используемых анионоактивных ПАВ в сравнении с более эффективными неионогенными ПАВ, которые обладают своим недостатком – низкой степенью биоразложения в сточных водах.

7) альтернативная карбонизация шерсти с целлюлазами.

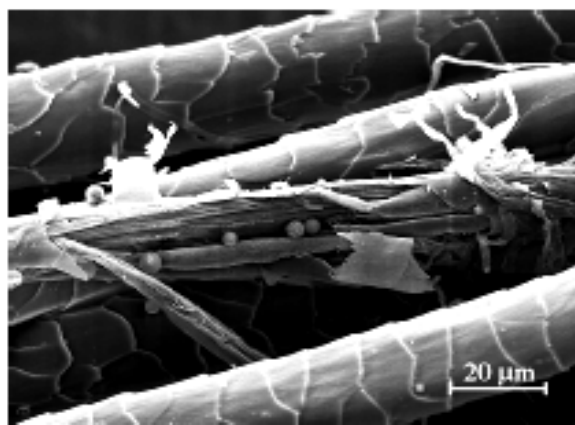
Самые ранние исследования в области применения протеолитических ферментов посвящены анализу действия микроорганизмов их продуцирующих и выбору наиболее интересных штаммов. Повреждение микроорганизмами шерстяного волокна, начавшись в руне, может усиливаться при его хранении, переработке и транспортировке в условиях повышенной влажности и температуры. В отличие от микроорганизмов, вызывающих повреждение растительных волокон, микрофлора шерсти непостоянна и представлена в основном видами, формирующимися еще в руне до стрижки овец. После воздействия спонтанной микрофлоры, бактерий *Bacillus subtilis* и микроскопических грибов *Aspergillus oryzae* на образцы мериносовой, полугрубой и грубой овечьей шерсти происходит накопление функциональных карбонильных групп. При действии микроорганизмов на мериносовую шерсть изменяется конформация белковых цепей – происходит переход от α -формы (вытянутые цепи) к β -форме (спираль). Британской научно-исследовательской микробиологической лабораторией проведено изучение биодеструкции шерсти в процессе преработки в текстильном производстве с учетом возникающих неблагоприятных условий хранения. Установлено, что процесс биодеструкции инициируется бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas indigofera*, *Chromobacterium violaceum* и различными *Bacillus spp*, которые окрашивают и деструктируют волокна, приводя к потере массы. Поврежденное волокно,

например, бактерией *Staphylococcus Epidermis* Kind HD более интенсивно окрашивается активными красителями (активный синий 28, pH 4,9, 40 °C).

На рис. 18 наглядно представлена картина деструктирующего действия ферментов протеолитической активности синтезируемых *Aspergillus flavus*.



а)



б)

Рис. 18. Микрофотографии спор *Aspergillus flavus*, атакующих шерстяное волокно (а) и эффекта их воздействия на поверхностные слои (б).

Энзимные технологии являются одной из альтернатив традиционным процессам подготовки и отделки шерстяных текстильных материалов, использование которых помогает решить такие важные задачи, как создание более чистого, мягкого, экологичного, неагрессивного и экономичного, с точки зрения энергозатрат, химического производства, а также максимально снизить повреждение волокна при одновременном повышении эффективности отделочных операций. Имеется немало работ по изучению модификации шерстяного волокна, прошедшего обработку протеазами. Волокнистый материал в результате обработки протеазами не только претерпевает изменения, но и приобретает новые совершенно уникальные свойства. Эти процессы нацелены на получение специфических свойств, таких как сокращение или устойчивость к свойлачиванию, придание текстильным материалам мягкого грифа, увеличение смачиваемости, улучшение окрашиваемости и способности к печати, без существенного повреждения

волокна. Из препаратов, включающих ферменты и ПАВ, предлагаются композиции как отечественного, так и зарубежного производства, отличающиеся активностью, стабильностью, оптимальными условиями действия и сроками хранения (табл.8).

Таблица 8

Современные ферментативные препараты протеаз и липаз для текстильной промышленности

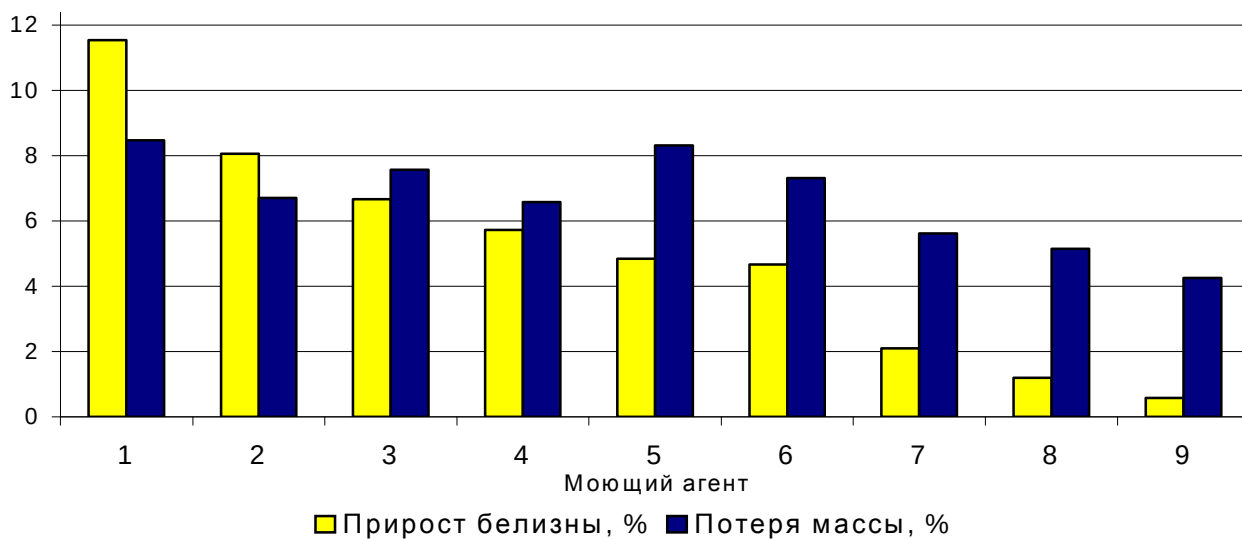
Название препарата	Культура	Оптимум действия	Фирма-производитель	Область применения
Новолан TM	Протеаза (Bacillus subtilis)	T=55 °C, pH 6	Novozymes	Удаление целлюлозных примесей, придание высокой мягкости, снижение пиллинга и пушистости
Алкалаза 2.5L, DX	Протеаза (Bacillus subtilis)	55-65 °C, pH 7-9,5	Novozymes	Удаление загрязнений, имеющих белковую основу, направленная модификация поверхности шерстяных волокон, обесклеивание натурального шелка
Савиназа 16L, EX	Протеаза (Bacillus subtilis)	45-55 °C, pH 9-10,5	Novozymes	
Эверлаза 16L, DX	Протеаза (Bacillus subtilis)	45-55 °C, pH 9-10,5	Novozymes	
Щелочная протеаза	Протеаза (Bacillus subtilis)		АОО «Восток»	
Протосубт илин ГЗх	Протеаза (Bacillus subtilis)		АОО «Восток»	
Protease NT	Щелочная протеаза (Bacillus subtilis)		Genencor	Мягчение, снижение пиллинга, дегуммирование шелка
Бактозоль WO	смесь ферментов гидролаз	30-60 °C, pH 6-9	Концерн «Клариант»	Удаление жировых и белковых загрязнений, отбеливание, придание эффекта несвойлачиваемости, мягчение

При разработке конкретных технологий необходимо учитывать сложность контроля гидролитических реакций и возможность повреждения шерстяного волокна в результате глубокого гидролиза пептидных связей. Поэтому осуществляется оптимизация условий технологического процесса и концентрации препарата, содержащего фермент.

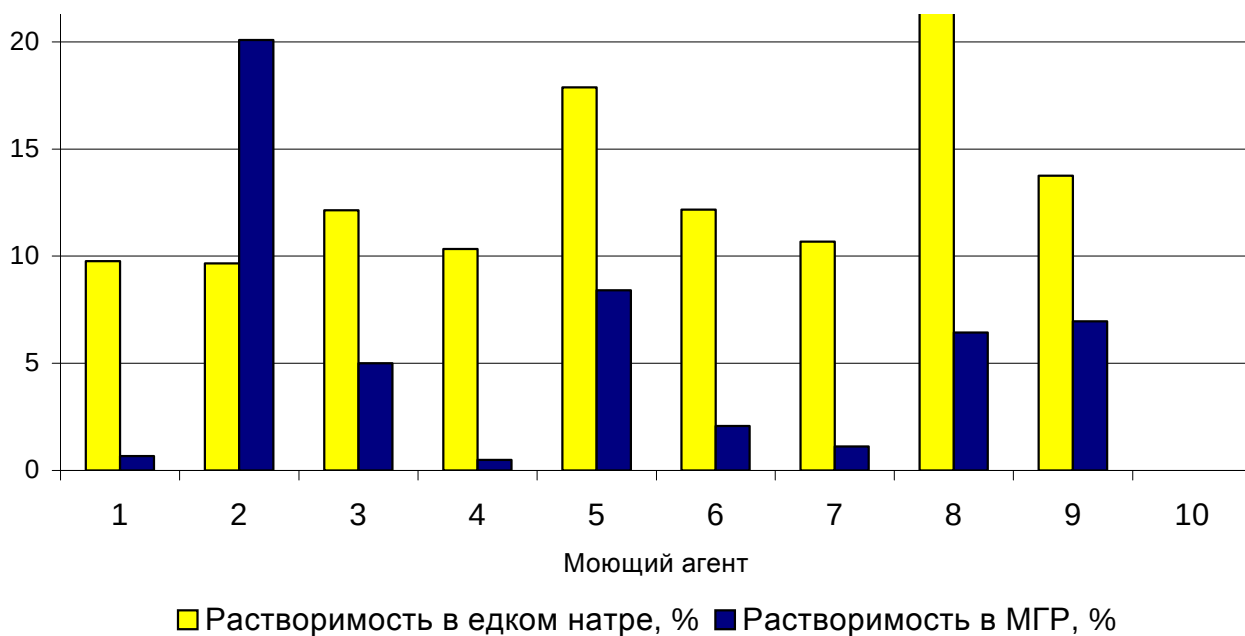
Технологии мойки шерсти на стадии первичной обработки могут состоять как из двух, так и из трех стадий. На первой стадии используются ПАВ и химические вещества, способствующие удалению легко удаляемых загрязнений. На второй стадии обеспечивается длительное взаимодействие шерсти с раствором, содержащим моющие вещества, ферменты и вещества, способствующие удалению трудноудаляемых загрязнений. Таким образом, обезжиривание грубого шерстяного волокна происходит в растворе, содержащем липолазу. Дополнительное моющее действие обеспечивается на 2-й секции раствором протеазы, а удаление с волокна и дезактивация ферментов происходит на 3-5 секции при промывке и сушке. Промывку осуществляют при температуре от 42 до 55 °С, концентрации ферментов 1-3 % от массы обрабатываемого сырья (0,003г/л) и неионогенного поверхностно-активного вещества (ПАВ) до 1,3г/л.

Преимущества промывки с использованием промышленных ферментов, которые обладают селективной активностью по отношению к жировым веществам (Липолаза 100 L и Новозим 735) или протеолитической активностью (Алкалаза 2,5 L) представлены на рис. 19. Промывка проводится в растворах ферментов (0,2 % от массы обрабатываемого субстрата) при pH 6,1, температуре 40-43 °С, модуле 1:50. Данная технология рекомендована для пятисекционной шерстомойной машины МП-5Ш. При промывке с липазой в течение 10 минут степень удаления жировосков сопоставима с результатами промывки с ПАВ, и остаточное содержание загрязнений составляет 2,38%, а при промывке с протеазой в течение 60 мин – не более 2,4 %, что соответствует удалению загрязнений на уровне 73,6 %. Обезжиривание шерстяного волокна при промывке протеазами происходит за счет повреждения чешуйчатого слоя, а удержание перешедших в раствор липидов – посредством образования комплексов или коллоидных частиц с белковыми молекулами фермента, которые в этом случае выступают в качестве ПАВ. Определенный вклад в обезжиривание шерстяного волокна при участии протеаз вносят реакции, приводящие

к нарушению бимолекулярной липидной прослойки за счет гидролиза включенных в нее белковых веществ кератиновой природы.



а

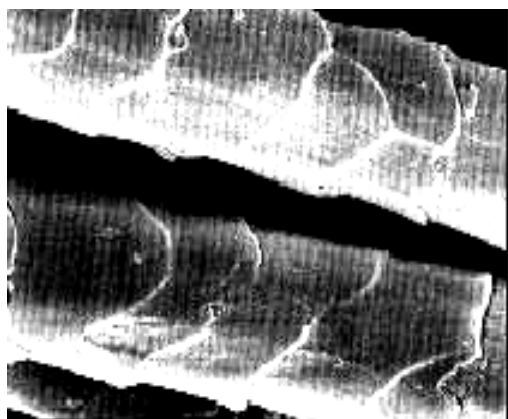


б

Рис.19. Технические показатели промывного волокна: 1 – Алкалаза 2,5L DX; 2 – Савиназа 16L EX; 3 – щелочная протеаза; 4 – Липолаза 100L EX; 5 – Протосубтилин ГЗХ; 6 – Эверлаза 16L DX; 7 – Новозим 735, 8 – ПАВ (Сульфанол+Превоцелл WOF); 9 – мыльно-содовый раствор.

Использование энзимов предлагается как альтернатива экологически не безопасным процессам хлорирования. Эффект антисвойлачиваемости обусловлен преобразованием N-acyl групп и частичным скалыванием чешуек

(рис. 20). Снижение свойлачиваемости происходит при сравнительно низкой концентрации протеолитического фермента , например, Perizym AFW (1,5 г/л) и одновременном увеличении потери массы и растворимости в мочевино-бисульфитном реагенте. Необходимо учитывать, что приобретение антисвойлачиваемых свойств в результате обработки ферментами Subtilisin сопровождается высокой степенью повреждения волокна до (80 %).



Нативное шерстяное волокно

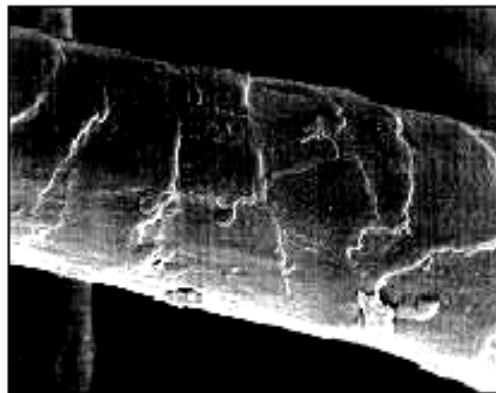


обработка 1,5 г/л Perizym AFW



Нативное шерстяное волокно

а



обработка 3 % Basolan DC

б

Рис. 20. Микрофотографии поверхности нативного шерстяного волокна (а), после воздействия препарата Basolan DC (3 % от массы материала) и препарата Perizym AFW (1,5 г/л) (б)

Известны способы антисвойлачиваемой ферментативной обработки с использованием различных протеаз (например продуцента *Streptomyces friedai*) и их композиций с липазами, липопротеиновыми липазами, обеспечивающих дополнительный эффект обезжиривания .При обработке шерстяных нитей протеолитическим комплексом Новолан L за счет поверхностного гидролиза

волокон достигается эластичность, износоустойчивость, более высокая драпируемость и низкая свойлачиваемость получаемых тканей.

Обработка ферментами Extremozymes (ф. Tuchwerk Westmark) в сочетании с промывкой ПАВ и крашением позволяет не только получить эффект антисвойлачиваемости, но и увеличить степень выбирания красителя из красильной ванны, улучшить прочность получаемых окрасок.

Специфический протеолиз или кератинолиз сосредоточен на периферийных участках поверхности экзокутикулы шерсти. Точный анализ реакции показывает, что концентрации цистина и липидов на поверхности волокна гораздо больше, чем во внутренних зонах. Эффективная ферментативная обработка также затрачивает липопротеины, которые трансформируют дисульфидные мостики в отрицательно заряженную цистеиновую кислоту. Эта реакция позволяет экспериментально определить оптимальные условия проведения ферментативных обработок и направить их по пути модификации поверхности волокна, а не его повреждения.

На рис.21 представлены зависимости истинной длины волокна (мм), степени извитости (%), тонины (мкм), разрывной нагрузки (Н) и свойлачиваемости (г/см³) в динамике процесса ферментативного протеолиза. Изменение свойлачиваемости волокна указывает на модификацию чешуйчатого слоя и, следовательно, фрикционных свойств шерсти. По-видимому, изначально происходит частичное размягчение и разрушение поверхности чешуйчатого слоя, без скалывания чешуек. Такое состояние поверхности волокна при одновременном увеличении набухания в водных растворах и сохранении длины волокна приводит к увеличению свойлачиваемости. Этому эффекту благоприятствует утонение волокна и увеличение извитости более чем в 2 раза. Несмотря на скалывание чешуек поверхностного слоя при длительном протеолизе, волокно не приобретает свойство несвойлачиваемости, как можно было бы ожидать по аналогии с процессом хлорирования. Причина специфической модификации шерсти заключается не только в изменении размеров чешуйчатого и коркового слоев волокна, но и соотношения площадей

орто- и паракортекса, которые отличаются по физическим, химическим и упругоэластическим свойствам .

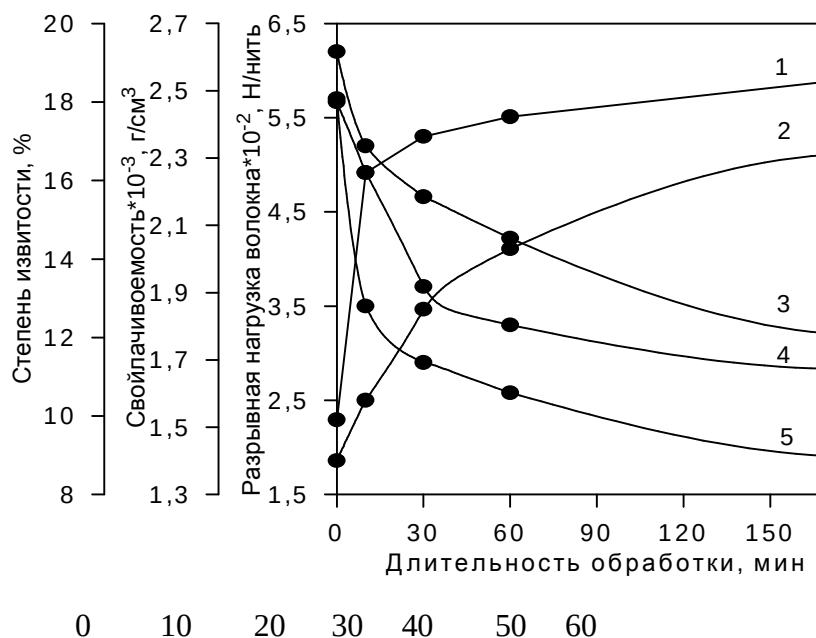


Рис.21. Изменение физико-механических свойств шерстяного волокна в процессе ферментативной модификации Эверлазой: 1 – степень извитости; 2 – свойлачиваемость; 3 – разрывная нагрузка одиночного волокна; 4 – тонона; 5 – истинная длина

Анализ физико-механических свойств волокна выявил отличительные особенности воздействия протеаз от действия хлорирующих обработок и щелочной валки. Сцепляемость волокон в процессе щелочной валки превосходит результаты для ферментативно модифицированного волокна более чем в 3 раза. Приобретаемые свойства высокой извитости при значительном утонении волокна в процессе протеолиза дают специфический эффект, что позволяет выделить ферментативную обработку шерстяного волокна как самостоятельную технологическую операцию (рис 22). Для достижения эффекта утонения волокна и повышения его извитости при минимальном снижении прочностных свойств и длины обработка ферментом Эверлазой в течение 10-30 мин является достаточной. Значительное увеличение извитости волокна будет способствовать повышению объемных свойств пряжи или ткани в зависимости от стадии ферментативной обработки и, следовательно, положительно влиять на теплоизоляционные и потребительские характеристики материала, в частности, его пушистость и пиллингуемость.

Влияние химической и ферментативной модификации на изменение гистологического строения шерстяного волокна представлено на рис. 22.

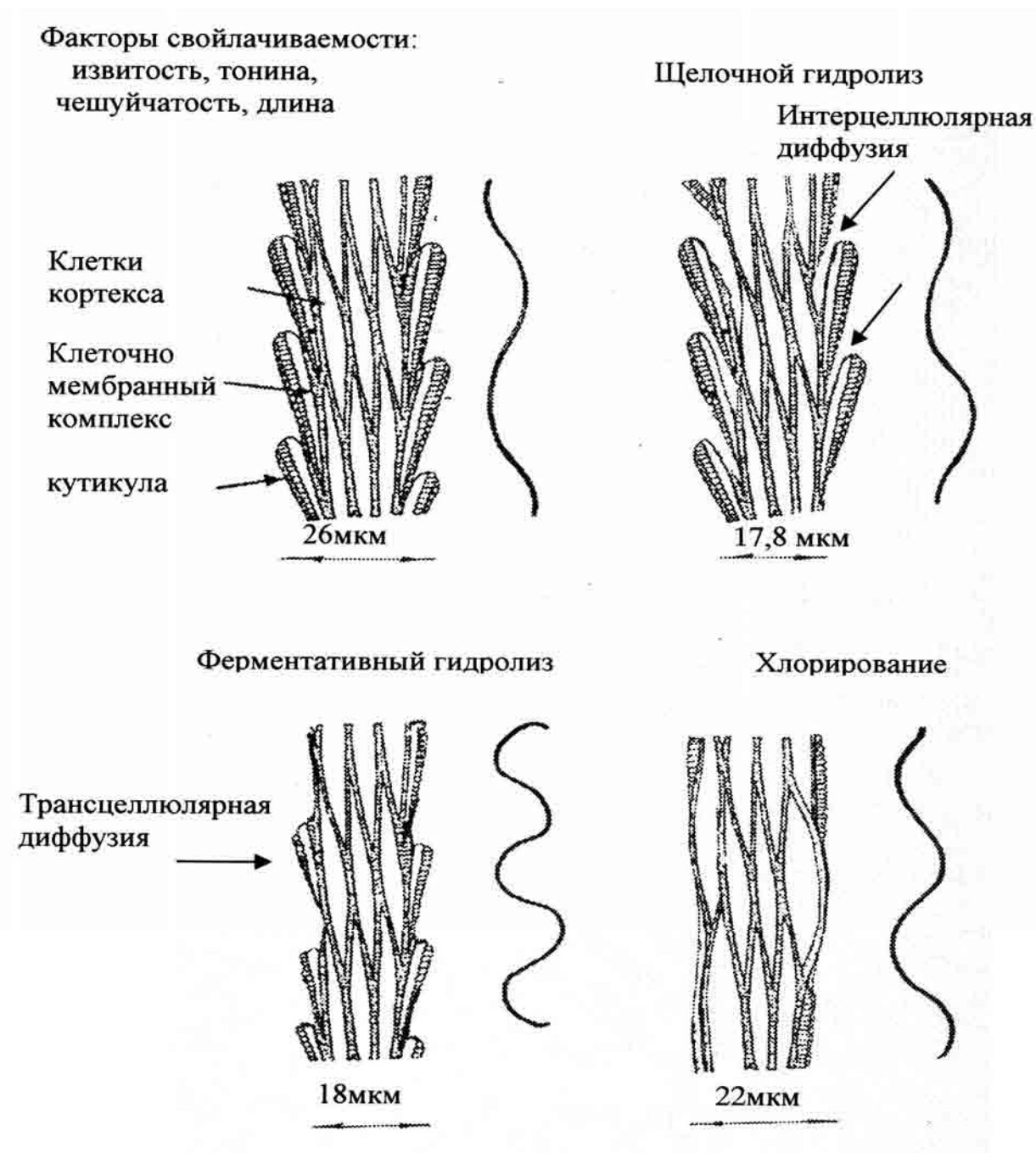


Рис.22. Гистологическое строение нативного и модифицированного шерстяного волокна

Совокупность приобретаемых шерстяным волокном свойств в процессе ферментативной обработки изменяет его сорбционную восприимчивость и реакционную способность, что наглядно видно из результатов, представленных в табл.9. Можно видеть, что ферментативная обработка по производимому

эффекту окрашиваемости сравнима с результатами хлорирования. Причем более результативна ферментативная обработка при крашении активным красителем, что, по всей видимости, обусловлено не только увеличением концевых аминогрупп в результате протеолиза, но и изменением аминокислотного состава с преимущественным содержанием аминокислот, способных взаимодействовать с активными красителями.

Таблица 9

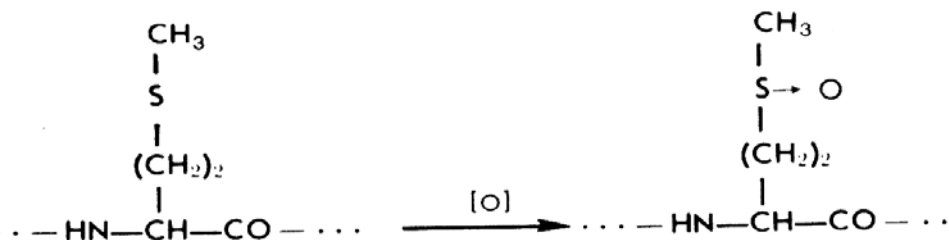
Сорбционная способность модифицированного шерстяного волокна по отношению к диазолям, основным, кислотным и активным красителям

Краситель/ реагент	K/S		
	Окислительная обработка (хлорирование)	Щелочной гидролиз	Ферментативная модификация Эверлазой
Вофалан красный ЗБЛ	3,6	2,5	2,79
Остазин оливковый НШ	2,6	1,6	3,2-3,9
Диазоль алый К	0,7	1,3	0,5-0,7
Метиленовый голубой	2,5	3,9	2,6-3,2

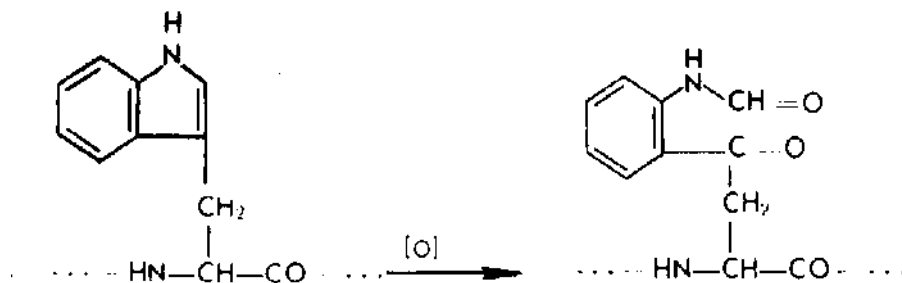
Известны технологические режимы, позволяющие увеличить степень белизны за счет совмещения перекисного беления и ферментативной обработки. Ферментативная обработка позволяет улучшить степень подготовки под крашение, достигнуть мягкого грифа, снизить концентрацию пероксида водорода и уменьшить длительность операции. Фирма Novozyme предлагает обработку протеазой Новолан, которая позволяет повысить мягкость, а в случае применения после крашения эта обработка снижает пиллинг и пушистость волокна. Длительность предварительной обработки по данной технологической схеме в сочетании с пероксидным белением составляет 60 мин при температуре 60 °С. Повышение температуры белящего раствора с 60 до 80 °С приводит к глубокой модификации шерсти в результате суммирующего действия, например, термо- и щелочеустойчивой протеазы (Эверлазы) и окисления кератина шерсти перекисью водорода.

Зависимость белизны от температуры носит экстремальный характер с оптимумом при 55-65 °С. По всей видимости, наличие оптимума обусловлено

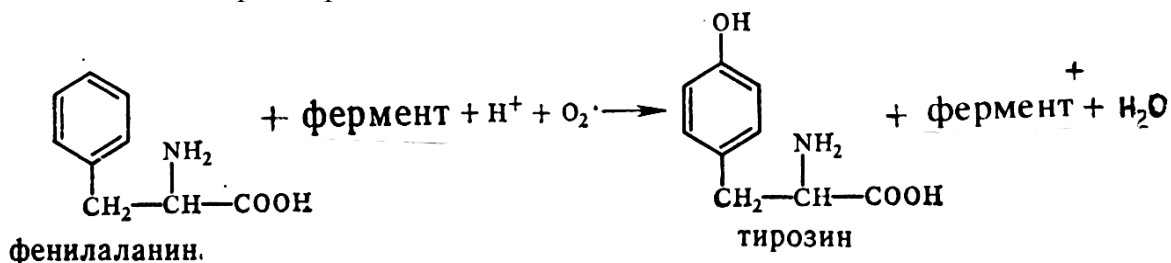
проявлением активности ферментов, а при повышении температуры его частичной дезактивацией. Возможно, что пожелтение волокна при температурах беления более 70 °С связано с преобразованием аминокислот триптофана, тирозина, гистидина в результате окислительных процессов, например, по схемам:



метионин



триптофан



фенилаланин.

тирозин

Энзимная обработка взамен операции хлорирования шерсти позволяет вести крашение при более низких температурах. При этом доказано, что обработка энзимами не ухудшает стойкость окраски к свету и стирке. Препарат Биософт РW на основе пулланазы рекомендуется для использования на стадии крашения и заключительной отделки шерстяных трикотажных изделий (рН 4,5-5,5; Т 60 °С, 2-4 % от массы обрабатываемого сырья).

Активацию процесса беления в присутствии ферментов – протеаз можно объяснить тем, что в результате гидролиза возрастает количество аминогрупп.

Это, в свою очередь, способствует увеличению количества адсорбированной перекиси водорода. Снижение белизны возможно обусловлено преобразованием карбоксильных групп дикарбоновых кислот, входящих в состав кератина, и образованием альдегидных групп. Растворимость в растворе МГР заметно увеличивается только при использовании Савиназы и Алкалазы. Сравнительно низкие значения растворимости в растворе мочевино-гидросульфитного реагента предположительно связаны с последовательными процессами гидролитического расщепления -S-S- связи под действием окислителя, который, в свою очередь, инициирует образование продуктов, содержащих связь -S-C- более стабильную и устойчивую к действию МГР, т.е. лантиониновых соединений или лизиналанина.

Оптимизированы условия ферментативно-пероксидного беления в присутствии Эверлазы и Новозима, обеспечивающие при минимальном повреждении волокна белизну на уровне 74-82 %, что на 4-12 % выше, чем при белении пероксидом водорода без фермента в присутствии аммиака при pH 9. Отмечена сравнительно низкая растворимость отбеленного волокна в растворе МГР, что может быть следствием модификации некоторых аминокислот под действием пероксида водорода и превращения части межмолекулярных цистинных связей в лантиониновые или межмолекулярной «сшивки» посредством ковалентных связей. Возможна внутримолекулярная окислительная конденсация с образованием десмозина или окисление и адольная конденсация остатков аминокислот лизина и гистидина.

Один из технологических режимов ферментативно-пероксидного беления шерстяных материалов рекомендуется проводить в следующих условиях: модуль воны 1:20, концентрация сериновой протеазы (препарат Базолан) 0,3-1 % от массы материала, пероксида водорода (32 % раствор) 0,5 %, гидроксида натрия 0,04 %, неионогенный ПАВ 0,03 % при температуре 45 °C в течение 20 минут и далее при повышении температуры до 70 °C – 45 минут. Необходимо

учитывать, что большинство протеаз устойчивы и активны до pH 9 и при температурах не выше 45° С (рис. 23, 24).

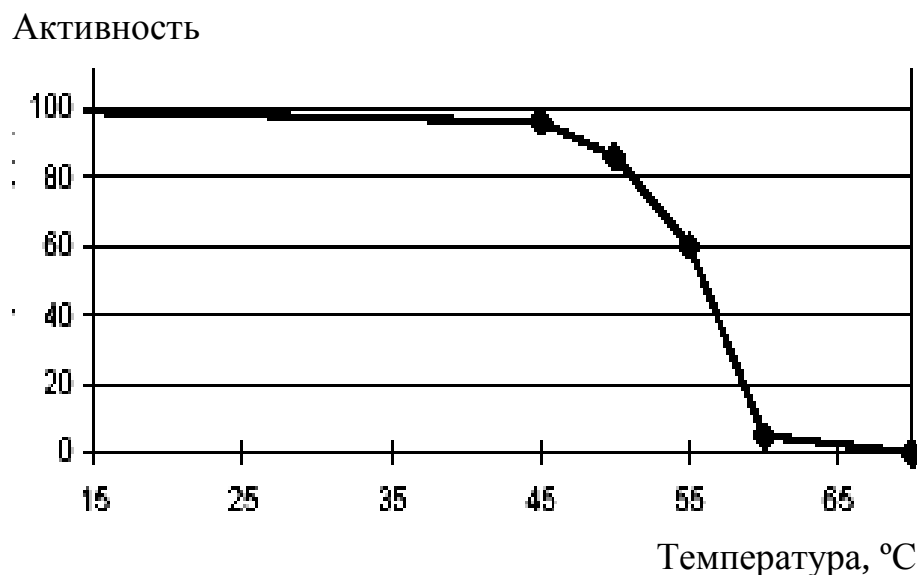


Рис. 23. Изменение активности сериновой протеазы (препарат Базолан) от температуры

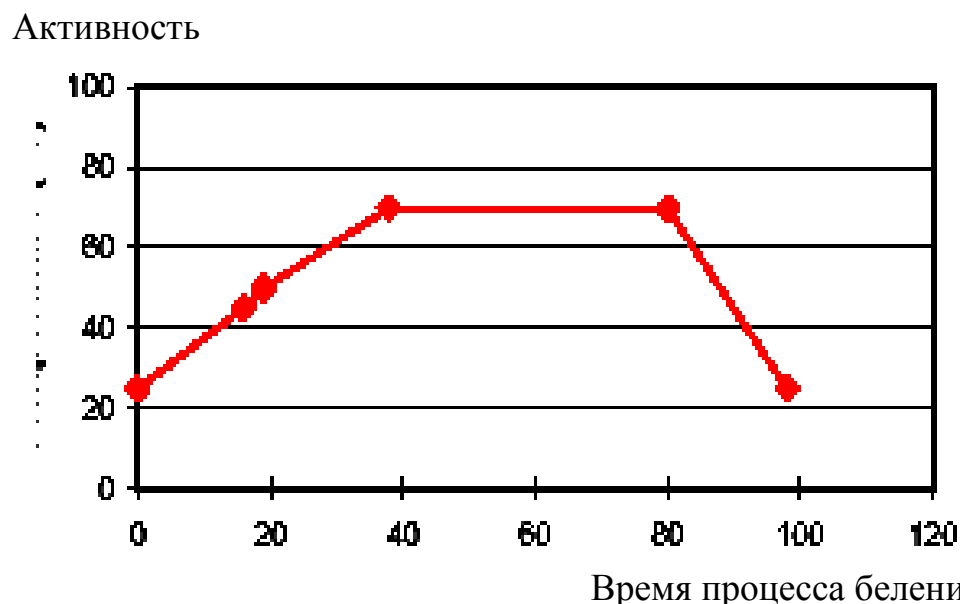


Рис. 24. Технологический режим беления с применением препарата Бизолан

Препарат Бактозоль представляет собой смесь ферментов из семейства гидролаз, который имеет протеолитические, липолитические и эфиролитические свойства. Вещества, составляющие Бактозоль W0, устойчивы и активны в растворах сильных окислителей и щелочной среде. Более того, активность ферментов усиливается с ростом концентрации пероксида водорода. Этот новый фермент открывает новые возможности в отделке текстильных материалов.

1.Био -отбеливание

Промывка

Сандоклин РС 1 мл/л

Сиррикс 2UD 3 мл/л

температура 60°C

длительность 20 мин

промывка водой

Отбеливание

Сандоклин РС 0,5 мл/л

Стабилизатор SIFA 1 мл/л

Бактозоль WO 4%

Пероксид водорода 35% 20 мл/л

pH 8,5

температура 60°C

длительность 10 мин

промывка горячей водой

Био-промывка

Бактозоль AP 0,3 мл/л

pH 7-8

температура 30 -40мин

длительность 10 мин

4. Биообесцвечивание природных пигментов

Окислительное беление

Сандоцин MRN 0,3 мл/л

Бактозоль WO 4 %

Хлорид магния 0,3 г/л

Стабилизатор SIFA 1 мл/л

Сиррикс 2UD 1,5мл/л

Пероксид водорода 33 % 20 мл/л

pH 8,5

температура 60°C

длительность 60 мин

промывка водой

Восстановительное беление

Сандоцин MRN 0,3 мл/л

Аросит BLN 3 г/л

температура 60 °C

длительность 60 мин

промывка водой

2. Восстановительное беление

Сандоцин MRN

Аросит BLN

Бактозоль WO

температура 60°C

pH 9, длительность 60 мин

промывка водой

температура 55°C

длительность 40 мин

промывка водой и нейтрализация

мягчение с получением грифа "Кашмир"

3. Удаление чешуйчатого слоя

Сандоклин РС 1 мл/л

Бактозоль РС 6%

pH 9

температура 55°C

длительность 40 мин

промывка водой и нейтрализация

Мягчение

Сандоперм MEJ 20 мл/л

длительность -120 мин

pH 6

отжим 100%

сушка

4' Био-очистка

Ферментативное удаление жировых и белковых загрязнений

Сандоклин РС 1 мл/л

Сандоцин MRN 0,3 мл/л

Бактозоль WO 4 %

Хлорид магния 0,3 г/л

Стабилизатор SIFA 1 мл/л

Сиррикс 2UD 1,5мл/л

Пероксид водорода 33 % 20 мл/л

pH 8,5

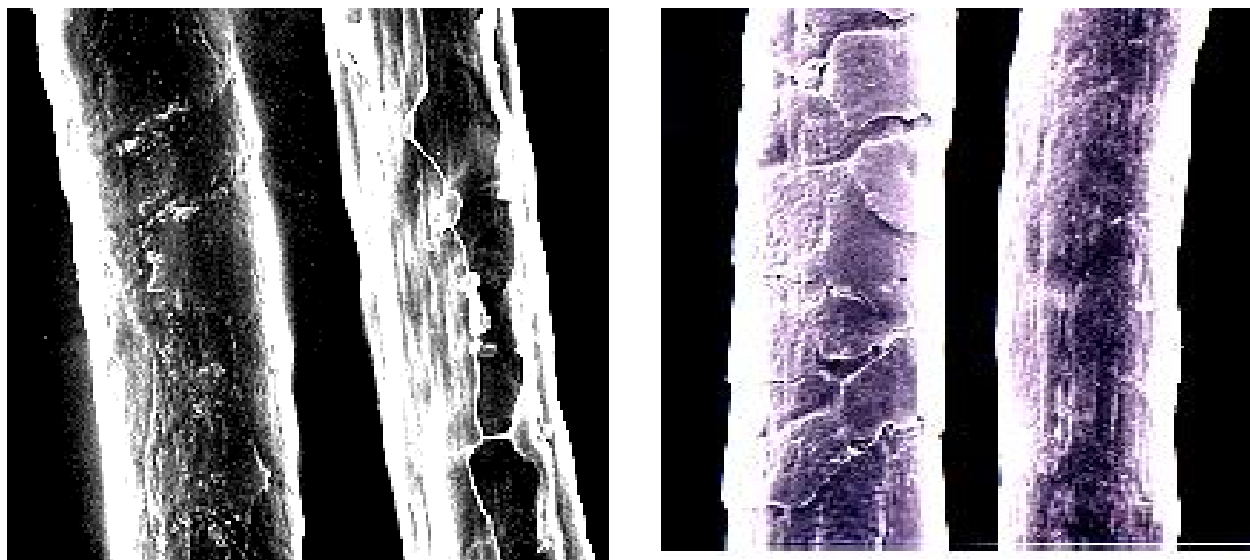
температура 60°C

длительность 60 мин

промывка водой

Представленные технологические режимы позволяют достигнуть увеличения окрашиваемости шерстяного волокна различными классами красителей: кислотными красителями до 5 %, металлкомплексными (1:2) до 27 %, активными красителями до 57 %. Предполагается, что полученный эффект достигается за счет сохранения гидрофобной природы шерстяного волокна .

При использовании ферментов Protex Multiplus L, Protex Gentle L, Novolan L и Bactosol WO, рекомендуемых для технологий обработки текстильных материалов из шерсти, оптимальные концентрации ферментов варьируются от 1-10 г/л в зависимости от активности ферментативной составляющей, условия обработки: модуль 1:20, температура 50 °С, pH 7 при длительности не превышающей 60 мин. Установлено, что кратковременное воздействие протеазой, приводящее к значительному увеличению скорости крашения шерстяного волокна, обеспечивает поверхностную модификацию чешуйчатого слоя (рис. 25).



а

б

Рис. 25. Микрофотографии поверхности шерстяного волокна после беления по классическому режиму (а) и по технологии с применением сериновой протеазы (б)

Установлена возможность моделирования потребительских свойств шерстяных и шерстьсодержащих тканей путем проведения ферментативной модификации. В процессе сокращенной технологии ферментативной

подготовки, совмещенной с заключительной отделкой, ткань приобретает низкую пиллингуемость, стойкость к истиранию, высокую мягкость, драпируемость, наполненность с ярко выраженной фактурой переплетений без образования, характерного для щелочной валки, ворсового застила на поверхности. Эффект увеличения объемности материала обусловлен повышением извитости волокна (табл.10).

Таблица 10

Влияние ферментативной промывки препаратом Биошер на основе протеаз на структурные свойства шерстяного волокна в составе текстильного материала (суконная ткань 67 % шерсти)

Образец	Тонина, мкм			Стандартная ошибка/ отклонение	Диспер- сия выборки	Степень извитости, %
	макси- мальная	мини- мальная	средняя			
*волокно	40	10	14,7	0,641/4,533	20,55	32
**волокно	54	14	18,7	0,9138/6,461	41,75	12

*- после ферментативной промывки **-после щелочной валки и мягчения с использованием синтетических препаратов.

Как показали результаты микроскопических наблюдений, волокна, выделенные из ткани после ферментативной промывки обладают извитостью 40 % и тониной на 18 % выше, чем у волокон, выделенных из ткани после щелочной валки. Необходимо отметить, что содержание грубых волокон в пряже (свыше 30 мкм) составляет менее 6,5 %. Поэтому такие ткани воспринимаются кожей человека как мягкие, подобные "кашемиру". Этот показатель для ткани, подвергнутой щелочной валке и мягчению, составляет 15,2 %. Технологии предназначены для использования на красильных аппаратах периодического действия, промывной машине ПЖ 220-III, линиях непрерывного действия типа ЛПЖ-1-III или валяльно-промывном оборудовании, например, SKT-13.

Проведённая экологическая экспертиза сточных вод после ферментативной обработки шерстяных материалов подтвердила улучшение их свойств, а именно снижение БПК на 28,3 % и ХПК на 30,6 % за счет

сокращения расхода ПАВ более чем на 90 % и гидролитического воздействия ферментов на загрязнения, перешедшие в моющий раствор.

Из литературных источников известны способы ферментативной обработки в сочетании с нетрадиционными способами обработки шерсти, основанными на использовании ультразвука, надкритических жидкостей, ферментов, плазмы. Цели, достигаемые при этом, могут включать в себя получение специальных эффектов, повышение качества продукции, сокращение расхода воды при крашении шерстяных изделий .

Список рекомендуемой литературы

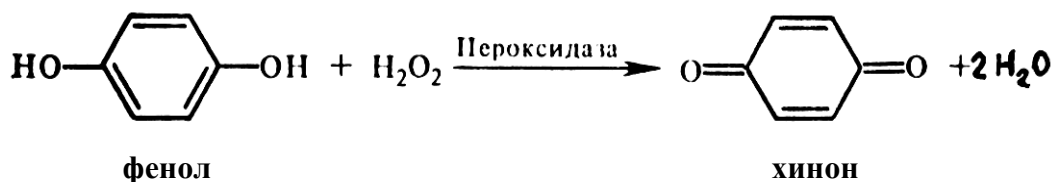
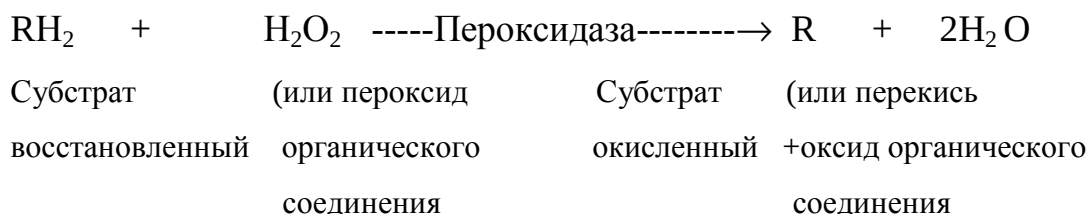
1. Влияние микроорганизмов на изменение структуры волокон шерсти /Е.Л. Пехташева, А.Н. Неверов, Н.К. Викулова, Н.М. Синицин//Тез. докл. межд. науч.-текст. конф. “Современные наукоемкие технологии и перспективные материалы текстильной и легкой промышленности” (Прогресс – 2000). – Иваново. –2000. С. 172.
2. Mangovska B. Enzyme treatments of wool //International seminar ”Textile science for XXI century”. – Portugal. 1999. P. 34.
3. Процесс мойки шерсти с использованием ферментов /Ying Saidan //J. Text. Res. 1995, №4. С. 242-243.
4. Новорадовский А.Г. Применение ферментов концерна «Клариант» в отделке текстильных материалов //Текст. химия. –1998. –№2(14).– С.73-84.
5. Breier R. Enzymatic antifelt finishing of wool //International seminar ”Textile science for XXI century”. – Portugal. 1999. P. 20.
6. George A. F. Roberts, Frances A. Wood. The influence of structure on the effectiveness of chitosan as an anti-felting treatment for wool //International seminar ”Textile science for XXI century”. – Portugal. 1999. P. 21.
7. Jovancic P., Erra P., Julia M.R. The influence of a proteolytic enzyme treatment on selected wool properties //International seminar ”Textile science for XXI century”. – Portugal. 1999. P. 33.

8. Riva A., Algaba. R. Preto. I. Effect of enzymatic treatments of wool fabrics regarding dyeing absorption, colour and colourfastness //International seminar "Textile science for XXI century". – Portugal. 1999. P. 20.
9. Machavova D., Prazil M. Enzyme treatment of wool before printing //International seminar "Textile science for XXI century". – Portugal. 1999. P. 39.
10. Mossotti R., Innocenti R., Tonin C. Anti-felting properties of wool treated with subtilisin enzymes //International seminar "Textile science for XXI century". – Portugal. 1999. P. 37.
11. Meettinen-Oinonen A. Modification of wool properties with proteases //Proc. of the 10-th International Wool Textile Research Conference, DWI, Aachen, Germany. 2000.
12. Parametros guimicos y freicos de la lana tratada euzimaficamente cok und guerafinasa /J. Cegarra, A. Riva, J. Gacen, A. Naik //Boc. Intexten. 1993, №104. S. 35-41.
13. Gupta S. Enzyme applications in chemical processing of textiles //19-th IFATCC Congress – Paris. 2002. P. 309.
14. Riva. A., Cegarra J., Prieto R. The role of an enzyme in reducing wool shrinkage //J. Soc. Dyers and Colour. 1993. 109, №5-6. P. 210-213.
15. Shrink proofing of wool fabrics by Pulse Corona Discharge and Enzymes /T. Takagishi, N. Hayashi, K. Morimoto, M. Tahara //19-th IFATCC Congress – Paris. 2002.
16. Николов А. Энзимы фирмы Ново Нордиск для текстильной промышленности //Текст. химия. –1998. –№2(14). –С.65-67.
17. Enzymes for garment dyeing and finishing of wool knitwear /S.M. Smith, J. Jackson, F. Ramazio, T.E. Nilsson, L. Dybdal, M.B. Andersen //J. International Dyers, ATMA-95. 1995. P. 10-15.
18. Шкурихин И.М., Сафонов В.В., Чалая Н.Е. Интенсификация процесса крашения шерсти кислотными красителями с применением протеолитических ферментов/сб...:научн. тр. молодых исследователей МГТУ им. А.Н. Косыгина. М.:2002. С. 31-36.
19. Hocker H. Woole aktuelle herausferder underz, ansatze und losungen //Textilverediung. 1997. – 32, №78. S. 154-155.

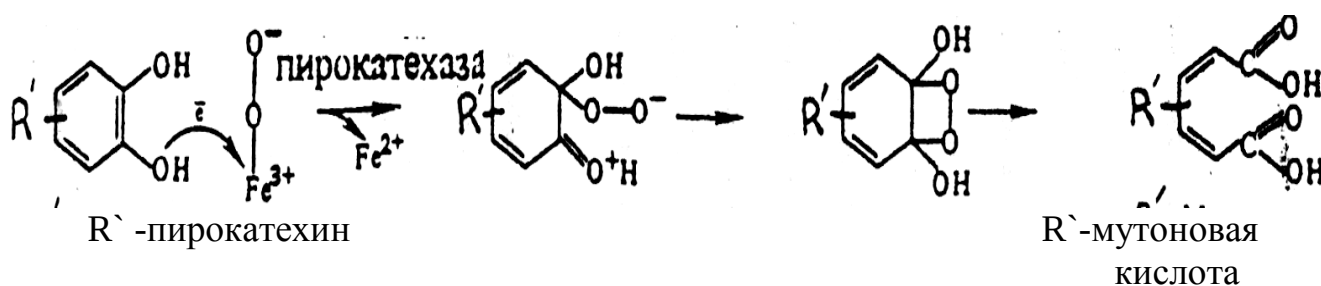
20. Popescu A., Cernat M., Dobrovat M. Modification of the wool fibre characteristics using proteolytic treatments. // International seminar "Textile science for XXI century". – Portugal. 1999. P. 34.
21. Study of wool surface modification by the use of modern analytical techniques / P. Jovancic, D. Jovic, P. Erra, M.R. Julia, M. Radetic, Z. Petrovic, B. Tomcik // 18-th IFATCC congress – Copenhagen. 1999. P. 178.
22. Schumacher K., Heine E., Hocker H. Enzymes in wool finishing effect on physical and chemical properties of the wool // Proc. of the 10-th International Wool Textile Research Conference, DWI, Aachen, Germany. 2000, p.35.
23. Gardamone J.M. Proteolytic activity of *Aspergillus flavus* on wool // 19-th IFATCC Congress – Paris. 2002. P. 319-329.
24. Bereza M., Sedelnic N. Enzymatic biotechnology for improving the quality of wool and wool fabrics // Proc. of the 10-th International Wool Textile Research Conference, DWI, Aachen, Germany. 2000.
25. Mandovska B. Dyeing properties of enzymatic treated wool // International seminar "Textile science for XXI century". – Portugal. 1999. P. 29.
26. Анкудимова, Н.В. Биохимические и физико-химические свойства ключевой тополитической эндоглюканазы целлюлазного комплекса *Chaetomium cellulolyticum* // Автореф. дис. на соискание ученой степени канд. хим. наук/Анкудимова Н.В. – М. 2000.
27. Михайлова С.Л., Чешкова А.В., Шибашова С.Ю. Изучение тополитической активности ферментов в процессе промывки грубого шерстяного волокна // Изв. вузов. Технология текст. пром-сти. – Иваново. 2001 – №3. – С. 52-55.
28. Чешкова А.В., Михайлова С.Л., Захарова И.М. Влияние ферментативного протеолиза на физико-механические и физико-химические свойства шерсти // Изв. вузов. Химия и химическая технология. – Иваново. 2003. – №1. – С. 116.

1.6. Использование окислительно-восстановительных ферментов в технологиях подготовки текстильных материалов

К окислительно-восстановительным ферментам относятся пероксидаза, каталаза, фенолоксидаза, лакказа и другие. Пероксидазы специфичны только в отношении акцептора водорода, т.е. пероксида водорода. В качестве доноров водорода они могут использовать различные соединения, например, полифенолы и некоторые ароматические соединения.



Образующиеся пероксиды органических соединений, как и пероксид водорода, могут окислять другие вещества при каталитическом воздействии пероксидазы. Например, при участии фермента пирокатехазы, молекулярного кислорода и атома Fe^{3+} происходит оксигенация субстрата по схеме :

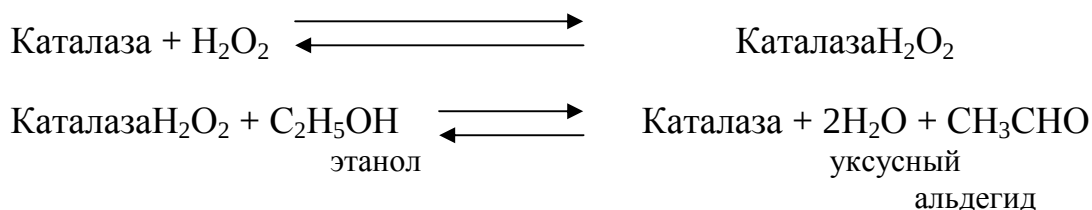


Каталаза разрушает перекись водорода с образованием воды без образования побочных продуктов согласно реакции:



Каталаза – универсальный фермент органического мира, участвующий в заключительных стадиях процессов окисления. Под действием каталазы происходит расщепление перекиси водорода на воду и кислород. Фермент

способен также катализировать окисление спиртов в альдегиды, сопряжённое с разложением перекиси водорода:

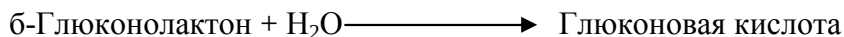
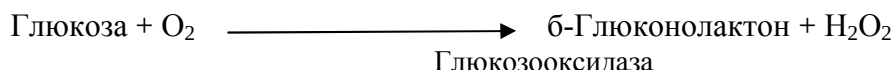


Такой тип реакции характерен для сред с низким содержанием перекиси водорода.

Каталаза – геминовый фермент, содержащий тетрапиррольное кольцо. В молекулу входит четыре атома трёхвалентного железа. Молекулярная масса фермента 240 – 300 кДа, в зависимости от источника выделения. Для каталазы характерна субъединичная структура, фермент может существовать в виде тетрамера и гексамера.

Известны препараты каталазы микробного происхождения, выделяемые из грибов пенициллов. Каталаза *P. vitale* имеет широкий pH – оптимум – от 4 до 9, стабильна при температуре до 65 °С.

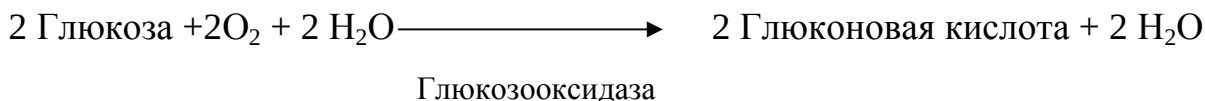
Глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы в глюконовую кислоту. Выделяют две стадии реакции. Первая является ферментативной, а вторая протекает самопроизвольно.



Окисление молекулярным кислородом происходит с участием ФАД, две молекулы которого входят в состав глюкозооксидазы.

В пищевой технологии глюкозооксидазу используют совместно с каталазой, поскольку необходимо разлагать перекись водорода, образующуюся на первой,

ферментативной стадии окисления глюкозы глюкозооксидазой. Общий баланс процессов, протекающих под действием двух ферментов, выглядит так:



Промышленные препараты глюкозооксидазы выделяют из культур микроскопических грибов. Фермент из *P. vitale* имеет молекулярную массу 150 кДа, оптимальный pH 5,6 – 5,8, стабилен в зоне pH 3 – 7, при температуре до 50°C. Ингибиторы – ионы ртути и меди, стабилизаторы – ионы кальция и аммония.

Учитывая сопряжённость действия глюкозооксидазы и каталазы, эти ферменты выделяют не только как индивидуальные, но и в виде комплексных препаратов. Грибы пенициллы и аспергиллы обладают способностью продуцировать значительные количества обоих ферментов.

Пероксидаза (донор: H_2O_2 – оксидоредуктаза) катализирует окисление органических соединений с помощью перекиси водорода и органических перекисей, например, образующихся из ненасыщенных жирных кислот, каротиноидов. Фермент переносит водород от молекулы субстрата к перекиси.

Субстратами пероксидазы служат различные соединения – фенолы (пирокатехин, пирогаллол, гидрохинон, резорцин, гваякол), ароматические кислоты (бензойная, салициловая, галловая), аскорбиновая кислота, анилин, толуидин, нитриты и другие соединения. Фермент обладает не только пероксидазными, но и оксидазными свойствами, то есть окисляет органические соединения за счёт неактивированного молекулярного кислорода.

Большинство субстратов пероксидазы – фенолы, под действием фермента они окисляются до хинонов, которые сами по себе являются сильными

окислителями. Хиноны склонны к полимеризации, в результате образуются темноокрашенные соединения.

Пероксидаза присутствует в каждой растительной клетке. Этот фермент участвует в циклах фотосинтеза и дыхания, играет существенную роль в защите растений от инфекционных поражений. Наблюдается положительная корреляция между степенью повреждённости растения, концентрацией фенолов и активностью пероксидазы. Поэтому при переработке инфицированного растительного сырья уровень окислительных процессов в целом выше, чем при переработке интактного, неповреждённого материала.

Пероксидаза – двухкомпонентный фермент, состоящий из белка – гликопротеина и геминового компонента, который включает протопорфирин IX и ион трёхвалентного железа. Геминовый компонент выполняет роль активного центра. Фермент из различных источников имеет молекулярную массу от 22 до 44 кДа, белковая часть на 43 % спирализована.

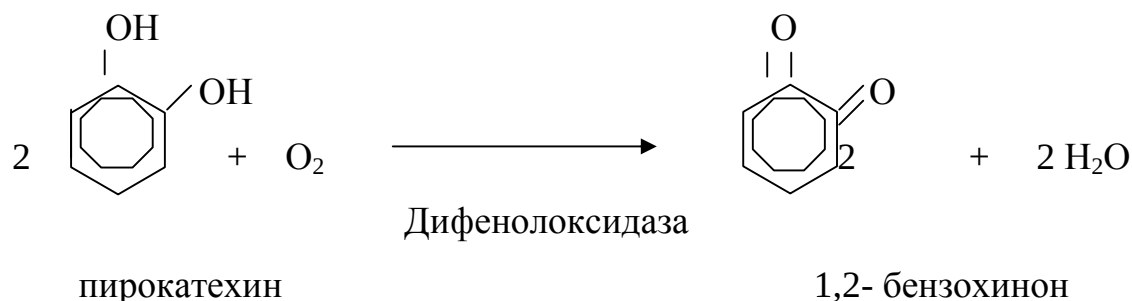
Пероксидаза представлена в растениях набором изоферментов, число их у одного вида может составить от 3 до 42. Из разных видов табака выделили 33 изофермента пероксидазы. Наличие изоферментов расширяет границы функционирования пероксидазы, она проявляет активность в зоне pH 3 – 14. При изменении внешних условий и гомеостаза растения преобразуется изоферментный состав пероксидазы, что является приспособительным механизмом.

Регуляция действия пероксидазы осуществляется с помощью ионов металлов – марганца, цинка, меди, кальция и др. Их присутствие влияет на соотношение собственно пероксидазной, оксидазной и оксигеназной активности.

Ингибиторами пероксидазы являются цианиды и хелатирующие соединения. С помощью хелатов, таких как ЭДТА, лимонная кислота и её соли, можно предотвратить окислительные реакции, происходящие в растительном сырье под действием пероксидазы.

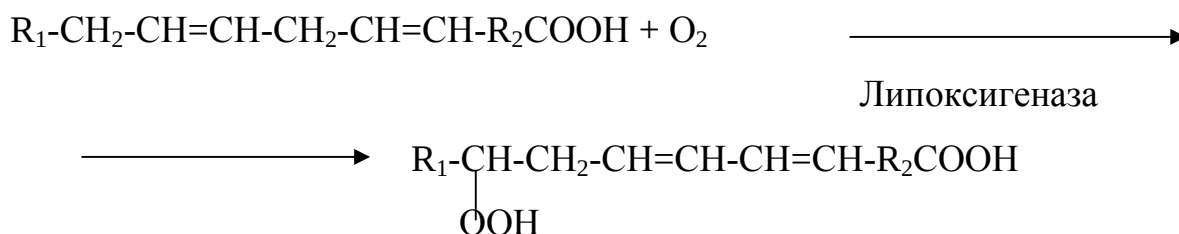
о-Дифенолоксидаза, прежнее название полифенолоксидаза, катализирует окисление дифенолов, полифенолов, монофенолов, дубильных веществ с

помощью кислорода воздуха. Наименее устойчивы к окислению о-дифенолы, у которых гидроксильные группы расположены при соседних углеродных атомах:



Дифенолоксидаза – универсальный растительный фермент, присутствующий во всех органах и тканях. Субстратная специфичность дифенолоксидазы зависит от источника выделения фермента. Она различна у изоформ, выделенных из одного растения. Дифенолоксидаза – медьсодержащий фермент. Полную инактивацию вызывает диэтилдитиокарбамат и синильная кислота. Активность снижается в присутствии хелатов (ЭДТА, лимонной кислоты и др.). Под действием дифенолоксидазы и тирозиназы, окисляющей тирозин, растительные фенолы окисляются в хиноны, которые, конденсируясь, превращаются в меланины. Конденсация хинонов протекает по свободнорадикальному механизму. Цвет меланинов зависит от их молекулярной массы. Чем крупнее молекула, тем темнее окраска. По мере увеличения молекулярной массы цвет меняется от розового до чёрного.

Липоксигеназа катализирует окисление полиненасыщенных жирных кислот (линолевой, линоленовой) и их эфиров в гидроокисикислоты. Окисление происходит за счёт молекулярного кислорода. В процессе окисления изменяется положение двойной связи:



Гидроперекиси жирных кислот – активные окислительные агенты, способные окислять ненасыщенные жирные кислоты, каротиноиды, хлорофилл, аминокислоты, аскорбиновую кислоту. Таким образом, действие липоксигеназы инициирует целый ряд различных окислительных реакций в растительном сырье. Липоксигеназа – железосодержащий глобулин. Оптимум действия при pH 6,5-7,5 и температуре 20-40 °C.

Таблица 11

Препараты на основе окислительно-восстановительных ферментов

Название	Вид активности	Культура/ производство
Бактозоль AP	Каталаза, pH-6,5-9,5, T=20-40 °C	АО "Клариант"
Терминокс™ 10L, 50L	Каталаза Scytadium, pH 4,0-5,0, T=40-45 °C	Novozymes Дания
Терминокс™ Ультра	Каталаза, pH 6-10, T=50 °C	Novozymes Дания
Catalase T100	Каталаза, T=40-110 °C	GENENCOR, USA Canada
Catalase NT	Каталаза, T=40-110 °C	GENENCOR, USA Canada

1.6.1. Технологические режимы отделки тканей, основанные на использовании окислительно-восстановительных ферментов.

Представленные процессы могут быть использованы для биохимического окисления лигнинного компонента и в процессах промывки после пероксидного беления. Знание свойств ферментов позволит исключить их возможное отрицательное воздействие на текстильный материал в процессе отделки. Так, присутствие в белящем растворе каталазы вызовет непродуктивное разложение перекиси водорода и приведет к неконтролируемому «вспениванию» раствора. Способность каталазы, разлагать пероксид водорода, используется в процессе промывки после пероксидного беления. Эта операция необходима при крашении тканей после отбеливания без промежуточной сушки. В данном случае после перекисного беления необходимо полностью удалить остатки перекиси водорода из волокна,

которые могут привести к потере цвета в результате изменения структуры многих красителей, снизить устойчивость их окраски, вызвать пожелтение белого фона рисунка, образовать муар на поверхности. Применение обычных восстановителей для удаления перекиси часто не приводит к нужным результатам из-за трудности управления реакцией (нестехиометричность). В последнее время для удаления перекиси водорода после беления стали использовать ферментные препараты каталаз (табл. 11). Например, Бактозоль АР добавляется в промывной раствор в малых количествах. Для каталазы Бактозоль АР область оптимума достаточно широка: рН от 6,5 до 9,5, что дает большие возможности при нейтрализации после беления. Чем выше температура, тем ниже активность ферментов, оптимум лежит в зоне 20-40 °С. Выбор технологии зависит от волокна, оборудования, модуля ванны и рН:

- быстрый путь: 2 мин при концентрации Бактозоля 1мл/л ;
- медленный путь: 10-20 мин при концентрации Бактозоля АР 0,1-0,3 мл/л.

Удаление перекиси водорода с использованием каталазы (фирмы Novozymes, Дания) осуществляют одновременно с крашением по режиму , представленному на рис. 26.

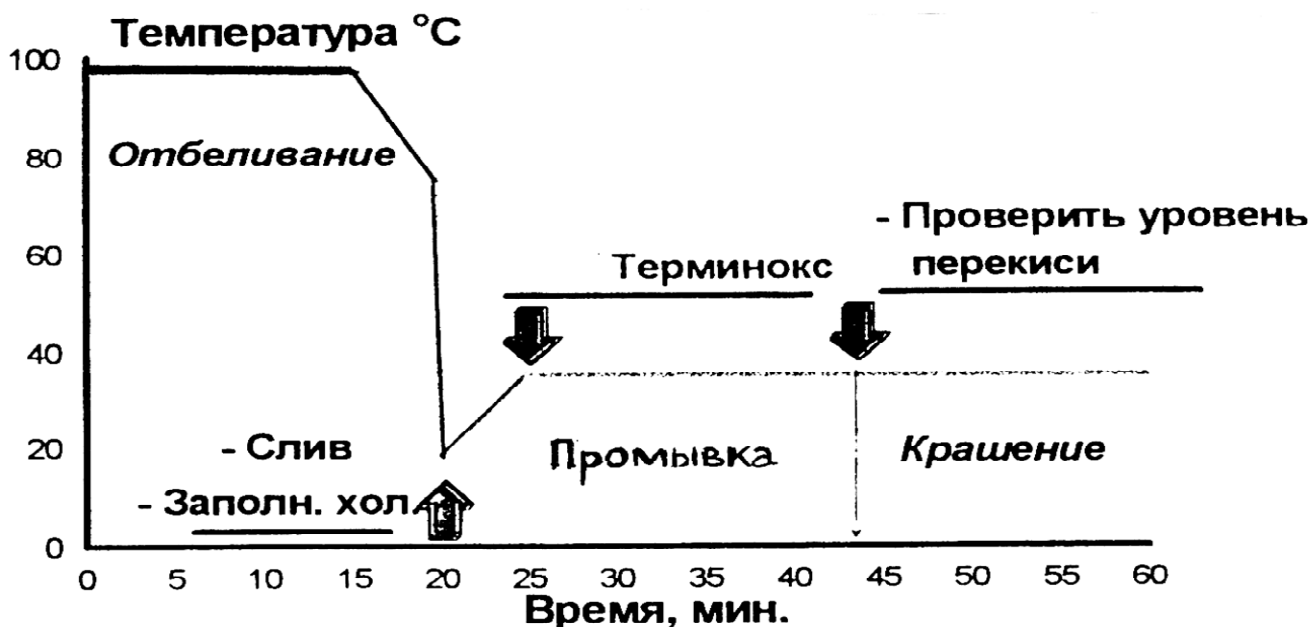


Рис. 26. Температурный профиль совмещенного процесса удаления пероксида водорода с использованием каталазы и крашения

Применение Терминокс дает, по сравнению с другими известными процессами, снижение затрат воды, времени и энергии. Например, для удаления перекиси водорода с помощью промывки водой требуется от 20 до 25 л воды на 1 кг ткани, в то время как при использовании Терминокса, расходуется всего около 5 л воды на 1 кг ткани.

Фермент фирмы «Genencor» (США), например, Catalase T100 рекомендуется применять перед крашением активными красителями, которые являются чувствительными к окислителям. Процесс проводят при pH 3-9, температура 30-65 °C, длительность обработки 10-20 минут, 0,1-0,4 % от массы материала.

-режим 1: отбеливание – промывка – сушка – промывка – окрашивание;

- режим 2: отбеливание – промывка – окрашивание.

1.6.2. Лигнолитическая активность окислительно-восстановительных ферментов

Деструкция и удаление лигнина при подготовке целлюлосодержащих материалов представляет особую трудность. Для хлопчатобумажных тканей это «галочка», которая содержит более 30 % лигнина, для льняных материалов это структурообразующий лигнин, содержание которого в волокне может достигать 9-12 %. Именно лигнин в значительной степени определяет условия и скорость процесса подготовки тканей. Лигнин гидрофобен, наличие его в волокне затрудняет адсорбцию водных растворов реагентов и уменьшает скорость их проникновения в глубь лигнифицированной частицы.

Вопрос микробной биodeградации лигнина природной целлюлозы является предметом пристального внимания исследователей. На настоящий момент выявлены более 2000 отдельных видов грибов и микроорганизмов, вызывающих гниlostные процессы в растительных лигнинсодержащих субстратах, основой которых является целлюлоза. Ферменты, способные деструктировать полимерную молекулу лигнина, специалисты-технологи условно называют лигниназами. Это комплекс окислительно-

восстановительных ферментов, в частности, полифенолоксидазы, оксидоредуктазы, пероксидазы, каталазы, лакказы. В текстильной промышленности окислительно-восстановительные ферменты на данный момент не нашли широкого применения ввиду их дороговизны и длительности процесса ферментативной деградации лигнина. К окислительно-восстановительным ферментам, вызывающих деполимеризацию полифенолов относятся пирокатехаза, циклоизомераза, ферменты, продуцируемые грибами семейства базидиомицетовых *Helephoraceae*, *Hydnaceae*, *Polyporaceae*, *Agariceae*, *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostuatus*, *Polyporus versicolor*, *Fomes fementaries*, *Collybia velutipes*.

Выявлены два механизма раскрытия ароматического кольца, которые проходят вслед за гидроксированием. Например, под действием *Nacardia corallina* имеет место орто-расщепление, а под действием *Pseudomonas desmoliticum* – мета-расщепление. В литературе сообщается о биodeградации кониферилового спирта, основного компонента лигнина, гидролитическими ферментами, что является гипотезой о деструкции лигнина по побочному метаболическому пути.

Несмотря на значительный прогресс в исследовании процессов биоконверсии лигнина, до сих пор не установлено синергическое взаимодействие между ферментами окислительно-восстановительного характера (лигнин-пероксидаза, лакказа) и пероксидазой, эстеразными и ксиланазными ферментами.

Природная деструкция растительных остатков грибами осуществляется, благодаря комплексу их внеклеточных ферментов. При этом особенности строения растительного субстрата определяют состав и свойства ферментного комплекса гриба-деструктора. Так, субстраты с высоким содержанием фенилпропанового полимера лигнина (например, древесина) эффективно разрушаются окислительными ферментами базидиальных ксилотрофных грибов. В частности, избирательной способностью разрушать лигнин обладают грибы белой гнили. В основном, это представители порядка *Aphyllorphorales* s.l.

Bjerkandera adusta, *Daedaleopsis confragosa*, *Cerrena unicolor* Murriell. и порядка *Agaricales s.l.*, *Pleurotus ostreatus* и др. Их ферментный комплекс обычно включает лигнинпероксидазу (ЛП), лакказу и Мп-пероксидазу (МП). Взаимосвязь биохимических путей превращения лигнина и целлюлозы происходит через систему H_2O_2 -продуцирующих ферментов. Присутствие H_2O_2 обеспечивает работу пероксидаз. Кроме того, многие авторы полагают, что H_2O_2 является источником активированных форм кислорода – неферментных окислителей лигнина (супероксид-анион, гидроксильные радикалы). Однако, несмотря на значительный прогресс в исследовании процессов биоконверсии лигнина, до сих пор не ясно, что именно инициирует реакции окисления лигнина, какова роль каждого из ферментов, как осуществляется взаимосвязь ферментных и неферментных факторов биоконверсии. Решение этих вопросов возможно при культивировании грибов белой гнили на лигнинсодержащем субстрате (например, на лигносульфонатах). При этом важно определить ферментативную активность грибов, а также изменения, происходящие с субстратом под действием грибов. Наконец, необходимо исследование свойств гомогенных ферментов, которые принимают участие в биоконверсии лигнина.

Относительно недавно было установлено, что многие сапротрофные дейтеромицеты, особенно представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* и др., образуют ферменты – ферулоилэстеразы, – которые способны гидролизовать сложноэфирные связи между остатками феруловой кислоты, присоединенной к полисахариду (например, к ксилану), и лигнином. Таким образом, с помощью ферулоилэстеразы возможно отделение лигнина от гемицеллюлоз и целлюлоз.

На кафедре ХТБМ ИГХТУ проведены исследования лигинолитической активности базидиомицетов *Cerrena maxima* Murr, синтезирующих пероксидазу, *Coriolus hirsutus*, содержащих преимущественно полифенолоксидазы, *Coriolus poliporizae* – комплексный препарат пероксидазы и лакказы. Полученные результаты свидетельствуют о высокой лигинолитической активности ферментов. Так, в условиях термостатирования при 50 °С, pH 7,5, и

длительности 30 минут и при совместном использовании ферментов различной субстратной активности степень делигнификации хлопковой шелухи составляет 66 %. Эти результаты превосходят делигнифицирующий эффект, достигаемый при щелочной отварке (44 %). Необходимо отметить, что ферментативная делигнификация материала обеспечивает высокую сохранность целлюлозы волокна, что обеспечивается селективностью действия ферментов на лигнин.

При ферментативном окислении лигнина при участии оксидоредуктаз происходит деполимеризация лигнина, сопровождающаяся изменением ароматических фрагментов за счет: преобразования заместителей в бензольном кольце, появлением хиноидных структур и возможным раскрытием самого бензольного кольца, реакции деметилирования не являются доминирующими. Остаточный лигнин ферментативного окисления представляет собой нерастворимый лигнин с преимущественным содержанием сиригильных структур, которые затрудняют процессы последующего окислительного беления лигнинсодержащих материалов. Это обстоятельство, а также дороговизна исследуемых оксидоредуктаз на настоящий момент, сложность контролирования процесса биосинтеза, ограничивает их использование в текстильной технологии. Несомненно, что с развитием биотехнологии базидиомицеты станут самым доступным и дешёвым источником лигнолитических ферментов.

Рекомендуемая литература к главе

1. Kurk T K Effects of microorganisms of lignin. – Ann. Res. Photopathol, 1971. – vol. 9, №1. – s. 185-210.
2. Hiroi T., Eriksson K. E. Microbiological degradation of lignin. – Svensk papperstidn., 1976. a79, №5, S. 162-166.

3. Cierer J., Opara E. A. Studies of enzymatic degradation of lignin. The action of peroxidase and laccase on the monomeric and dimeric model compounds. – Actg. Chem. scand., 1973, vol.27, p. 2909-2932.
4. Konishi K., Jnone Y., Higuchi H. Decomposition of lignin by *Coriolus vrsioolor*. IV. Effect of laccase type enzymes on the interphenylpropane linkage on lignin. – J. Japan Wood Res. Soc., 1972, vol. 18 №11, p. 571-576.
5. Андреева, В. А. Фермент пероксидаза/В.А.Андреева. – М.: Наука, 1988. –С. 256.
6. Иммобилизация внеклеточных фенолоксидаз высшего базидиального гриба *perotus ostreatus* // Тез. докл. Всесоюз. симп. по инженерной энзимологии. – Кобулетти, 1985. –Т.11.
7. Coldsby G.P., Enoki A., Cold M. H. Alkyl – phenil cleavage of the lignin model compounds guaiacylglycol and glycerol b-guaiacyl ether by *Stereum frustulatum*. – Arch. Microbiol., 1980, vol.128, №2, p. 190-195.
8. Лебедева, В.И.Использование фермента пероксидазы при подготовке текстильных материалов//В.И.Лебедева, Б.Н.Мельников, С.Ю.Шибашова, А.В.Чешкова. Изв. Вузов. Технология текстильной промышленности.– №5.– 1978,с. 151-153.
9. Koroleva, O.V. Production of lignin modifying enzymes by co-cultivated by white-Rot fungi *Cerrena maxima* and *coriolus hircutus* and characterization of laccas from *Cerrena maxima* // Enzyme and microbial technology. – 2002. – № 30. – P. 1-8
10. Лебедева, В.И. Исследование физико-химических свойств растворов окислительно-восстановительных ферментов / В.И. Лебедева, А.В. Чешкова, Б.Н. Мельников, А.А. Субботина// Текстильная химия. – 1993. – №14. – С 69-74.
11. Чешкова, А.В. Деструкция лигнина хлопка и льна ферментами / А.В. Чешкова, В.И. Лебедева, Б.Н. Мельников // Текстильная химия. – 1993. – №1(3). – С. 70-75.
12. Чешкова, А.В. Использование ферментно-перекисных растворов при белении тканей / А.В. Чешкова, В.И. Лебедева, Б.Н. Мельников // Изв. вузов. Технология текстильной промышленности. – 1995. – №5. – С .67-72.
13. The fermentaiton destruction of lignin in cotton and flax/ Чешкова А.В., Лебедева В.И.,Мельников Б.Н.// Textilt cemistry–teory,technology,equip. Nova Science Publ.Inc,Commack,NY,1997, p. 150-158

2. Ферменты для моющих средств

Значение биотехнологии, и, в первую очередь, промышленной энзимологии, постоянно растет, так как она позволяет: производить энзимы в промышленных масштабах и с низкими затратами на основе ферментации микроорганизмов и очистки протеинами; вести поиск новых энзимов, существующих в природе и на базе генной инженерии; создавать и производить на основе биоинженеринга протеинов энзимы, отличные от существующих в природе с оптимальными для технологии характеристиками.

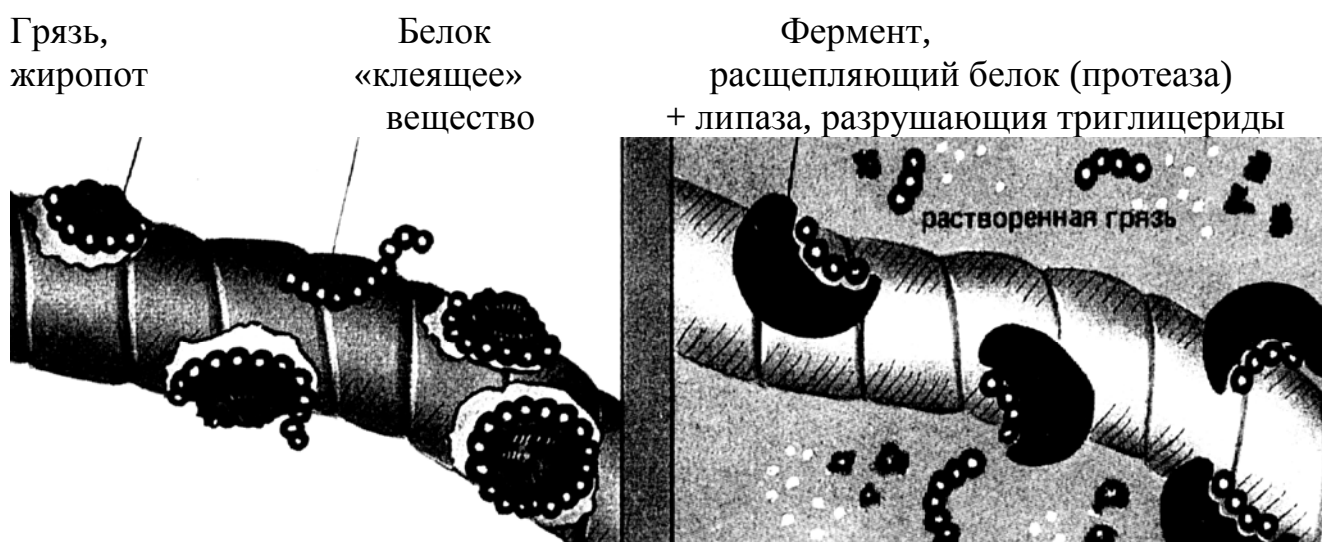


Рис. 27. Прикладное применение протеазы по отношению к текстильным материалам нашли первоначально в производстве моющих средств и стиральных порошков, в состав которых они входят и способствуют удалению загрязнений белкового характера (кровь, яичный белок, человеческий пот и т.д.)

Свойства бытовых жидких моющих средств (МС) могут быть существенно улучшены с помощью добавления энзимов. Эти энзимы относятся к тому же типу, как и энзимы, использующиеся в порошковых МС, например протеазы и амилазы (табл. 12). Действие протеазы заключается в гидролизе белковых компонентов загрязнений, в результате чего образуются растворимые пептиды, которые легко удаляются МС (рис.27). Таким же образом действует амилаза, гидролизуя нерастворимые крахмальные материалы и липаза, деструктирующая триглицериды высших жирных кислот. Так как

нерастворимые белки, крахмал, жиры способствуют сильной адгезии загрязнений на текстильном материале, удаление энзимами этих веществ повышает моющую способность МС.

Таблица 12

Ферменты и композиции фирмы Новозайм (Дания) для производства стиральных порошков

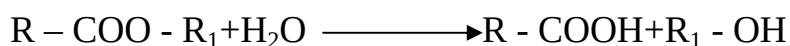
Энзим или смесь энзимов	Дозировка, %	Комментарии
Савиназа 6.0Т	0,5-0,7	Стандартный порошок с «биодобавками» (удаление белковых загрязнений)
Савиназа/ Темамил 4.8/12	0,6-0,9	Комплексное удаление белковых и крахмальных загрязнений. Хорошо подходит для детского белья
Савиназа/ Липолаза 4.8/20	0,6-0,9	Смесь для порошков с «липосистемой» (удаление белковых и жировых загрязнений). Для максимальной эффективности липазы необходимо, чтобы доля неоновых ПАВ была не менее 33 % от их общего количества.
Савиназа/ Карезим 4.8/180	0,7-1,0	Смесь для порошков типа «колор»: удаление белковых загрязнений в сочетании с антипиллинговым эффектом и освежением цвета. При высоких значениях pH(>10,5) эффективность действия Карезима существенно снижается
Савиназа/ Термамил /Липолаза 3.8/16/10	0,7-1,1	Мультиэнзимная композиция: комплексное удаление белковых, крахмальных и жировых загрязнений. Очень хорошо подходит для детского белья
Савиназа/ Термамил /Целюзим 4.2/10/0.1	0,7-1,0	Комплекс энзимов: удаление белковых и крахмальных загрязнений, «мягкий» антипиллинг и освежение цвет (для СМС типа «колор»)
Эверлаза 6.0 Т	0,5-0,7	Стандартный порошок с отбеливателем и «биодобавками» (удаление белковых загрязнений)
Эверлаза/ Дурамил 4.8/12	0,6-0,9	Комплексное удаление белковых и крахмальных загрязнений. Хорошо подходит для детского белья
Эверлаза/ Липолаза 4.8/20	0,6-0,9	Смесь для порошков с «липосистемой» (удаление белковых и жировых загрязнений). Для максимальной эффективности липазы необходимо, чтобы доля неоновых ПАВ была не менее 33 % от их общего количества

Энзимные жидкие МС особенно удобны для предварительной обработки пятен, то есть для обработки сильных загрязнений с помощью неразбавленного МС в течение нескольких секунд с последующей обычной стиркой. Эффект от использования энзимных препаратов в таких условиях особенно заметен. Как и в случае использования порошковых МС, необходимо тщательно подбирать состав жидкого МС для достижения оптимального действия энзима и его стабильности.

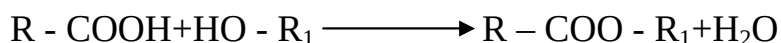
2.1. Свойства липаз, ферментативные препараты на их основе

Липазы (триацилглицеролацилгидролазы) являются универсальными ферментами, используемыми для преобразования липидов, животных и растительных жиров в водорастворимые производные. Очень важно, что эти процессы протекают не при высоких температурах (60-100 °С) и в щелочной среде, как в классических процессах стирки текстильных материалов, а в мягких условиях (при температуре до 60 °С и растворах при pH близком к нейтральному). Субстратами липаз являются глицериды и другие сложные эфиры. Липазы обладают способностью катализировать различные типы реакций:

1. Гидролиз эфиров

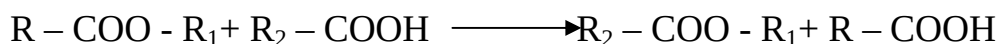


2. Синтез эфиров

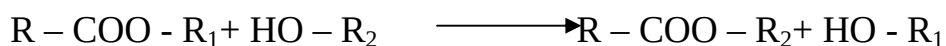


3. Трансэтерификация

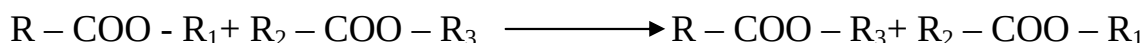
3.1. Ацидолиз



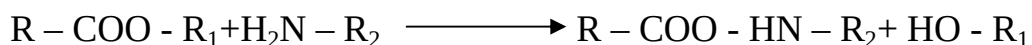
3.2. Алкоголиз



3.3. Интерэтерификация



3.4. Аминолиз

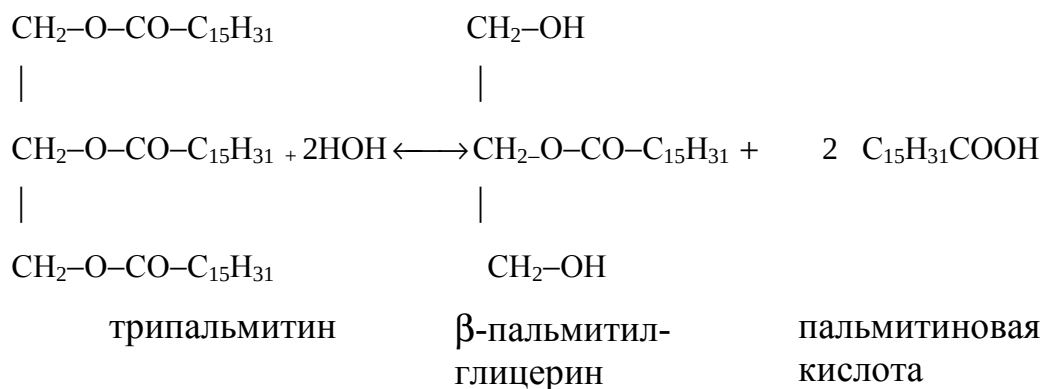


Гидролитическое расщепление жиров липазами протекает с заметной скоростью в средах с концентрацией воды не ниже 1%. Реакция происходит в гетерогенной среде на границе раздела липиды – вода, скорость ее зависит от степени дисперсности субстрата. Липазы проявляют специфичность в отношении оптических изомеров эфиров (стереоспецифичность) позиционную, глицеридную и жирнокислотную специфичность. По позиционной специфичности липазы делят на две группы: позиционно неспецифичные, освобождающие при гидролизе триглицеридов жирные кислоты из всех трех позиций, и 1,3-специфичные. При длительном гидролизе глицеридов 1,3-специфичные липазы способны отщепить жирные кислоты из всех положений, поскольку 2-моноглицериды и 1,2-диглицериды как менее конформационно стабильные самопроизвольно изомеризуются в 1-моноглицериды и 1,3-диглицериды. Жирнокислотная специфичность липаз выражается в предпочтении к жирным кислотам определенной длины цепи. В целом липазы легко отделяют жирные кислоты средней длины. Это характерно для липаз микроскопических грибов, за исключением пеициллов. Липаза *Pen. Roqueforti* предпочитает жирные кислоты с короткой цепочкой и практически не катализирует отщепление длинноцепочечных жирных кислот. Липазы *Candida* и *Pseudomonas* не ограничены в специфичности к длине цепи жирных кислот, а липаза *G. Candidum* специфична по отношению к длинноцепочечным жирным кислотам, содержащим цис-двойные связи в омега-9позиции, такими как олеиновая, линолевая, линоленовая и т.п.

Микробные липазы – ферменты с молекулярной массой 30-55 кДа, оптимальная температура действия не превышает 65 °C, оптимальный pH большинства исследованных липаз лежит в слабокислой или нейтральной зоне. Липазы микроорганизмов имеют умеренную термостабильность. Потери активности за полчаса составляют для липазы *R. Niveus* 40 % при 50 °C, *Ps. Fluorescens* – 40% при 60 °C, *R/ japonicus* – 50% при 55 °C. Термостабильность липаз снижается в микроводных средах.

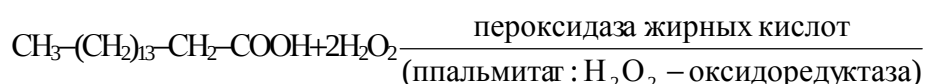
Липазы – продуценты *Mucor pusillus*, *Aspergillus orizae*, *niger*, *Candida lipolytica*, обеспечивают деструкцию масло- и жиросоставляющих загрязнений. Торговые отечественные препараты используются в основном в пищевой промышленности –

Липоризин ГЗХ, Липоаэрузин ГЗХ, Г20Х). Гидролиз α-сложноэфирных связей в молекулах триацилглицеринов протекает по схеме:

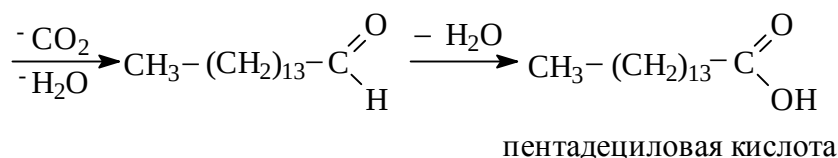


Активный центр липазы включает радикалы гистидина, серина, дикарбоновых аминокислот и изолейцина. Радикал гистидина служит для переноса протонов, а радикал серина – для ацептирования ацильной группы, высвобождающейся в момент распада сложноэфирной связи в молекуле триглицерида. Радикал изолейцина взаимодействует с углеводородным радикалом остатка высшей жирной кислоты и способствует закреплению молекулы триглицерида в активном центре фермента (рис. 28).

Липооксигеназы катализируют окисление полиненасыщенных жирных кислот (например, линолевой). К ним относятся полифенолоксидазы, лакказы (оксидоредуктазы) пероксидазы базидиомицетов *Coriolus hirsitus* и *Coriolus poliporazeae*. α-Окисление высшей жирной кислоты представлено схемой :



пальмитиновая кислота



Альдегид высшей жирной кислоты окисляется посредством дегидрогеназы в высшую жирную кислоту, и процесс повторяется снова. Образующиеся в результате окисления жирные кислоты с укороченной углеводородной цепочкой имеют более низкую температуру плавления и могут быть удалены с текстильного материала при температурах моющих растворов 40-60 °С.

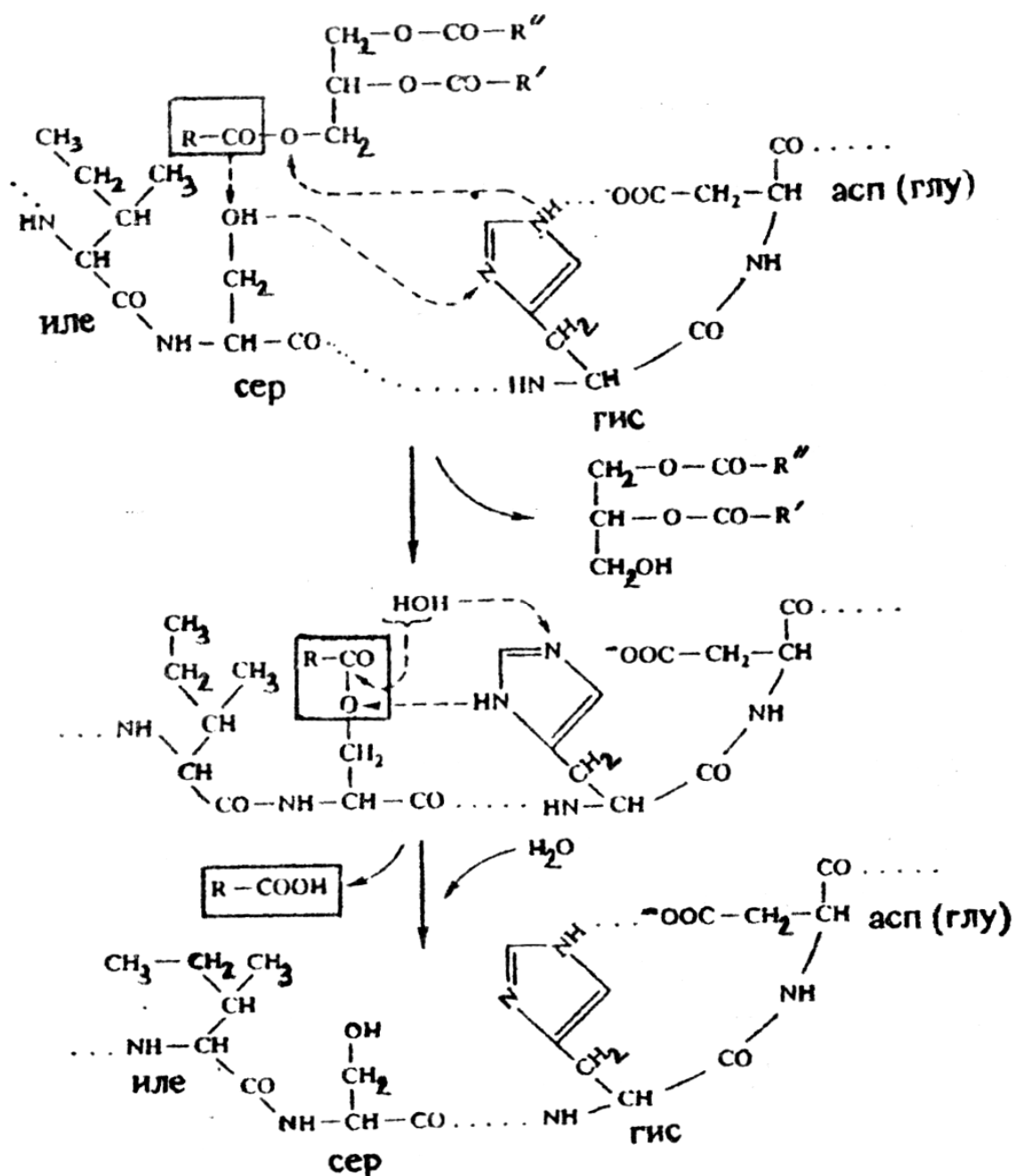


Рис. 28. Механизм гидролиза триглицеридов

Обработка липазами рекомендуется для удаления масляных пятен в процессах стирки, которые попадают на ткань после ткачества. Триглицериды, входящие в состав масляных загрязнений, не полностью удаленные на ранних стадиях обработки, могут создать осложнения в процессе отделки, привести к снижению белизны и другим бракам. На текстильных фабриках с целью

удаления масляных загрязнений операцию «замывания» производят вручную, путем смачивания препаратами на основе перхлорэтилена (например, Тесфон).

Дурамил (Duramyl) – устойчивая альфа-амилаза

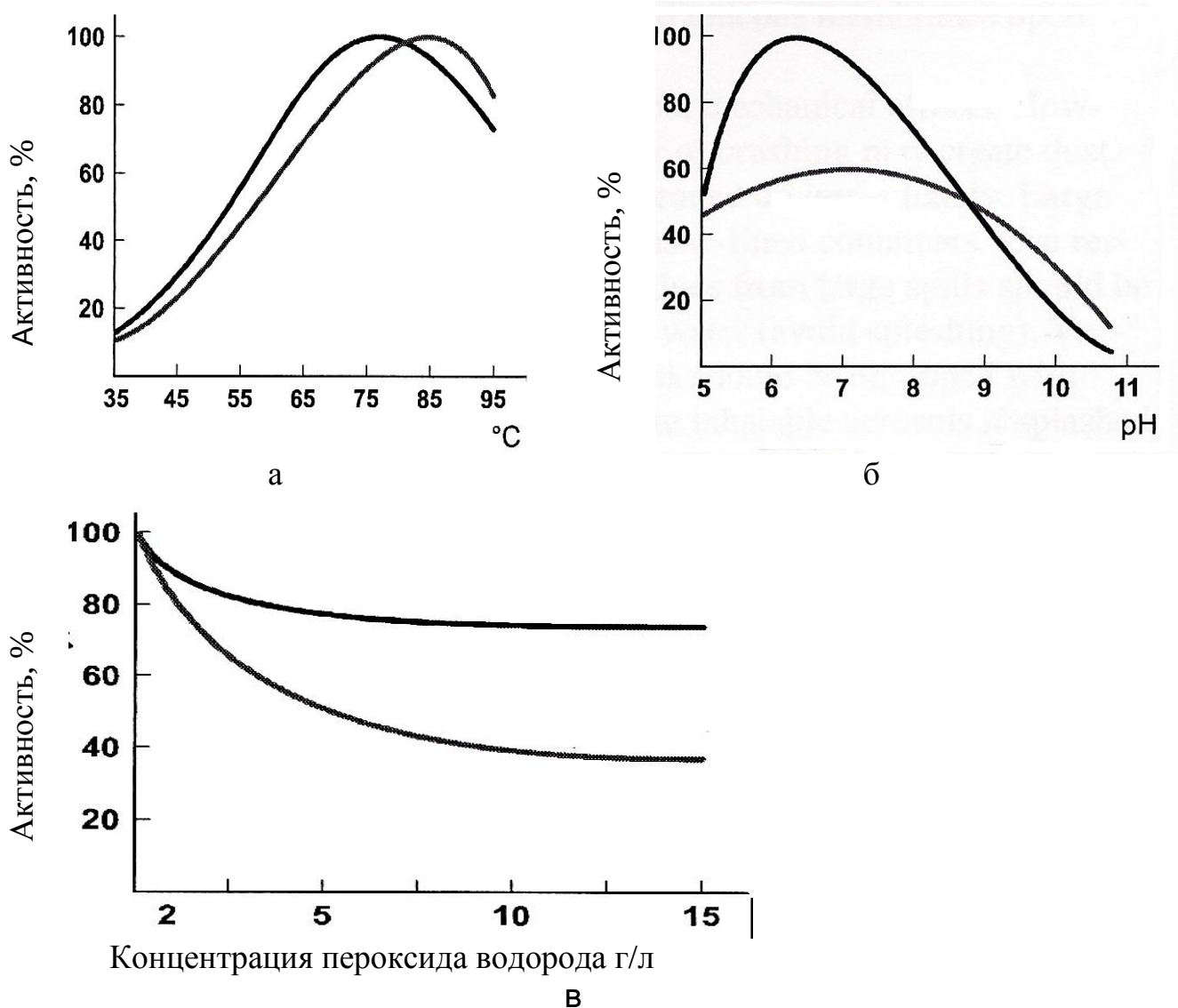


Рис. 29. Относительная активность Duramyl в сравнении с препаратом Термамил при различных температурах (а), pH раствора (б) и концентрации пероксида в рабочем растворе (в)

Для бытовых неструктурированных жидких МС могут использоваться следующие препараты: Алкалаза 2.5. SL, Алкалаза 2.5. L, Эспераза 8.0 SL, Эспераза 8.0. L, Савиназа 8.0 SL, Савиназа 8.0 L, Термамил 300 L., Дурамил (рис 29 а-в). Препараты SL – неводная суспензия энзима в этоксилированном алифатическом спирте. L жидкие препараты – растворы энзима в смеси

растворителей, состоящей из 1,2-пропандиола и воды. Все препараты хорошо растворимы и легко смешиваются с МС.

2.2. Приготовление жидких моющих средств (МС).

Не существует единой методики для приготовления энзим-содержащих МС. Способ приготовления зависит от предполагаемых условий использования, доступности сырья и совместимости индивидуальных компонентов. До некоторой степени разработка для приготовления энзим-содержащих МС проводится методом подбора. Этот процесс может быть значительно облегчен при использовании некоторых основных сведений о свойствах энзимов, компонентов МС и их взаимном влиянии. В то время как опасность того, что энзим неблагоприятно повлияет или разрушит тот или иной компонент МС минимальна, более вероятно, что некоторые компоненты МС окажут влияние на энзим. Для того чтобы энзим оставался активным, первичная структура вокруг активного центра не должна быть нарушена. Это означает, что следует избегать использования веществ, которые вступают в химическое взаимодействие с аминокислотами. Примерами таких веществ могут быть формальдегид, сильные окислители и восстановители, ионы тяжелых металлов. Большинство изменений в первичной структуре и конформации энзима может происходить под действием сред с высоким значением рН или при высокой температуре. Такие изменения практически необратимы, и их следует избегать. Ниже приведены несколько условий и параметров, которые влияют на стабильность энзимных препаратов.

Поверхностно-активные вещества , например, анионные ПАВ, мыла и неионные ПАВ наиболее часто используются в жидких МС. Анионные, например сульфозефиры спиртов (AES), линейные алкилбензосульфонаты (ЛАБС) и сульфонаты альфа-олефинов (AOS) применяются при общей концентрации в пределах 10-20 %, а мыла, например , натриевые соли олеиновой и лауриновой кислот – в общей концентрации 0-15 %. Неионные ПАВ, например этоксилаты спиртов или этоксилаты алкилфенола,

используются в составе МС в общей концентрации 10-20 %. Упомянутые выше ПАВ в обычных условиях могут быть совместимы с энзимами, но при выборе ПАВ следует провести проверку на стабильность энзимных препаратов. Катионные ПАВ имеют тенденцию оказывать негативное влияние на стабильность энзимных препаратов.

Для обеспечения оптимальной стабильности при хранении небольшие количества кальция должны присутствовать в жидком МС. Обычно необходимое количество кальция составляет от 100 до 500 ppm (частей на миллион), однако это зависит от состава МС и должно быть оптимизировано экспериментальным путем. Такие небольшие добавки кальция несущественно снижают эффективность работы МС. Заполнители типа триполифосфат натрия, NTA, EDTA, которые сильно связывают кальций, уменьшают стабильность энзимов. Данные заполнители использовать не следует.

Такие соединения, как формиаты, ацетаты, глицин, глутаминаты и ацетамиды, могут оказывать стабилизирующий эффект на энзимы при использовании в концентрациях 1-5 %. Спирты (такие как этанол) и гликоли (например полипропиленгликоль) часто обладают стабилизирующим влиянием на энзимы при их использовании в концентрациях от 5 до 20 %. Очень высоких концентраций спиртов или других органических растворителей следует избегать, так как они могут вызвать выпадение энзима в осадок.

При составлении композиций МС необходимо иметь ввиду, что содержание воды более 30 до 55 % воды может привести к заметному уменьшению стабильности энзима и к его микробиологическому загрязнению. Значение pH должно быть оптимизировано как с точки зрения моющего эффекта, так и стабильности энзима в процессе хранения. Оптимальное значение pH для обеспечения стабильности при хранении обычно находится в пределах 7-9,5. Значение pH моющего раствора обычно ниже, чем pH МС, благодаря наличию кислот в загрязненной одежде. Это падение значения pH должно быть минимизировано посредством введения буфера в жидкое МС. Буферы (амины), например, триэтаноламин часто успешно используются в концентрациях от 4 до

8 %. Наличие буфера также важно, если применяется антиоксидант, так как антиоксиданты могут спровоцировать падение pH в условиях хранения, что может привести к снижению стабильности энзима.

Рекомендуемая дозировка для энзимов в составе жидких МС составляет 0,4-0,8 % и зависит от состава МС и его значения. Энзимы не должны подвергаться воздействию высокой температуры, больших значений pH или веществ, которые могут дезактивировать энзим или вызвать выпадение его в виде осадка. Эти требования накладывают ограничения не только на конечный состав МС и условия хранения, но и на условия приготовления: энзим необходимо добавлять по возможности на самой последней стадии процесса приготовления, чтобы быть уверенным, что температура не будет превышать 30-40 °C и значение pH будет находиться в пределах 7-9,5, кроме того, как стабилизатор энзима, так и менее совместимые с энзимом препараты должны быть хорошо перемешаны с МС перед добавлением энзима.

Если есть необходимость, энзимный препарат может быть смешан с водой или неионногенным ПАВ. Предварительное перемешивание с простыми спиртами или неполярными растворителями может вызвать осаждение энзима, его следует избегать. Следует избегать также присутствия большого количества растворенного кислорода. Этого можно достичь путем тщательной укупорки в герметичные ёмкости с узким горлышком. Смешивание энзимного препарата с МС и розлив готового продукта должны производиться таким образом, чтобы минимизировать образование воздушных аэрозолей и частиц пыли во избежание вдыхания энзимного препарата. Протеолитические энзимы являются активными веществами, разрушающими белок, в связи с этим следует применять предосторожности во избежание прямого попадания на кожу концентрированного энзима. При работе с пастой энзима или жидким энзимом необходимо использовать защитные очки, обеспечивающие полную защиту глаз, резиновые или пластиковые перчатки, фартук и специальную обувь. Любой пролитый ферментсодержащий раствор должен быть смыт водой во избежание образования пыли после высыхания.

Примеры рецептур различных моющих средств с энзимами

Обычное моющее средство с отбеливателем, %:

• Анионные ПАВ	5-12
• Мыла	0-4
• Неионогенные ПАВ	1-7
• Триполифосфат натрия и цеолит	5-30
• Перборат/перкарбонат натрия	10-20
• Активатор отбеливателя	2-7
• Силикат натрия	0-10
• Кальцинированная сода	2-15
• Комплексообразующий агент	0-1
• Поликарбоксилаты	0-5
• Оптические отбеливатели, отдушки	0,4-0,5
• Энзимы:	
• Савиназа 6.0 Т, тип W	0,3-1,0
• Липолаза 100 Т	0,2-0,8
• Термамил 60 Т	0,2-0,8
• Целлюзим 0.7 Т	0,4-1,2
• Сульфат натрия, вода и пр.	До 100
• рН	9,5-10,5

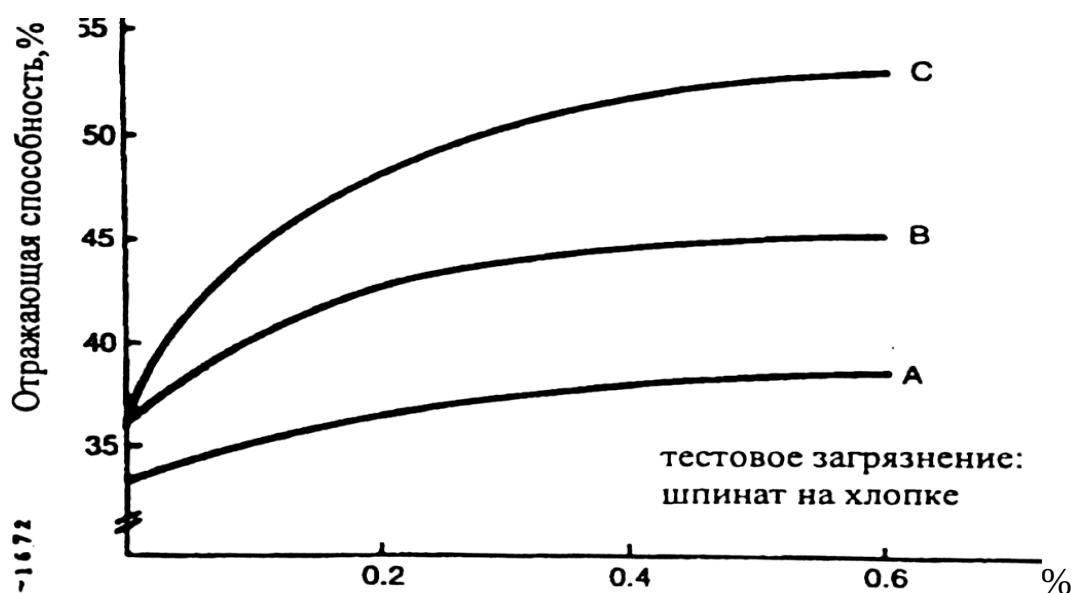
Моющее средство компактного типа с отбеливателем

• Анионные ПАВ	5-30%
• Мыла	0-5
• Неионогенные ПАВ	1-15
• Триполифосфат натрия и цеолит	5-40
• Перборат/перкарбонат натрия	10-2
• Активатор отбеливателя	2-7
• Силикат натрия	2-10
• Кальцинированная сода	5-20
• Комплексообразующий агент	0-1
• Поликарбоксилаты	0-3
• Оптические отбеливатели, отдушки	0,4-0,6
• Энзимы:	
• Савиназа 6.0 Т, тип W	0,6-1,5
• Липолаза 100 Т	0,3-0,8
• Термамил 60 Т	0,2-1,0
• Сульфат натрия, вода и пр.	До 100
• рН	8–10

2.3. Свойства энзимных жидких моющих средств (МС). Моющая эффективность протеазы

На рис. 30 для сравнения приведены данные для трех протеаз. В данном МС все три протеазы дают одинаковый моющий эффект без особенных различий между собой. Низкие значения рН моющего раствора (7-8,5) более благоприятны для Алкалазы, а высокие значения $\text{pH} > 8,5$ – для Савиназы и Эсперазы. Эспераза и Савиназа способны выдерживать более высокую температуру, чем Алкалаза. Это преимущество очевидно, когда для стирки используется температура выше $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. На рис.31. показано влияние дозировки энзима и различных условий стирки на эффективность работы Алкалазы.

Эффективность работы фермента повышается при увеличении температуры и концентрации фермента, а также при проведении предварительного холодного замачивания. Принимая во внимание некоторое снижение активности фермента в процессе хранения, рекомендуемая концентрация Алкалазы 2.5L находится в пределах от 0,5 до 0,8 %.



Количество Алкалазы 2.5 L в % от веса моющего средства

Рис. 30. Влияние концентрации фермента и различных условий стирки на моющую способность средства. Условия стирки: стиральная машина: Launder-Ometer. МС -5 г/л, концентрация энзима- 0,5 % от количества МС, рН: 8,4 – 8,6, жесткость воды: 15° по шкале жесткости.

Условия стирки: А- $15\rightarrow 40\text{ }^{\circ}\text{C}/47$ минут стирки, В- $25\rightarrow 60\text{ }^{\circ}\text{C}/40$ минут стирки, С- $20\text{ }^{\circ}\text{C}/17$ часов замачивания, а затем условия В.

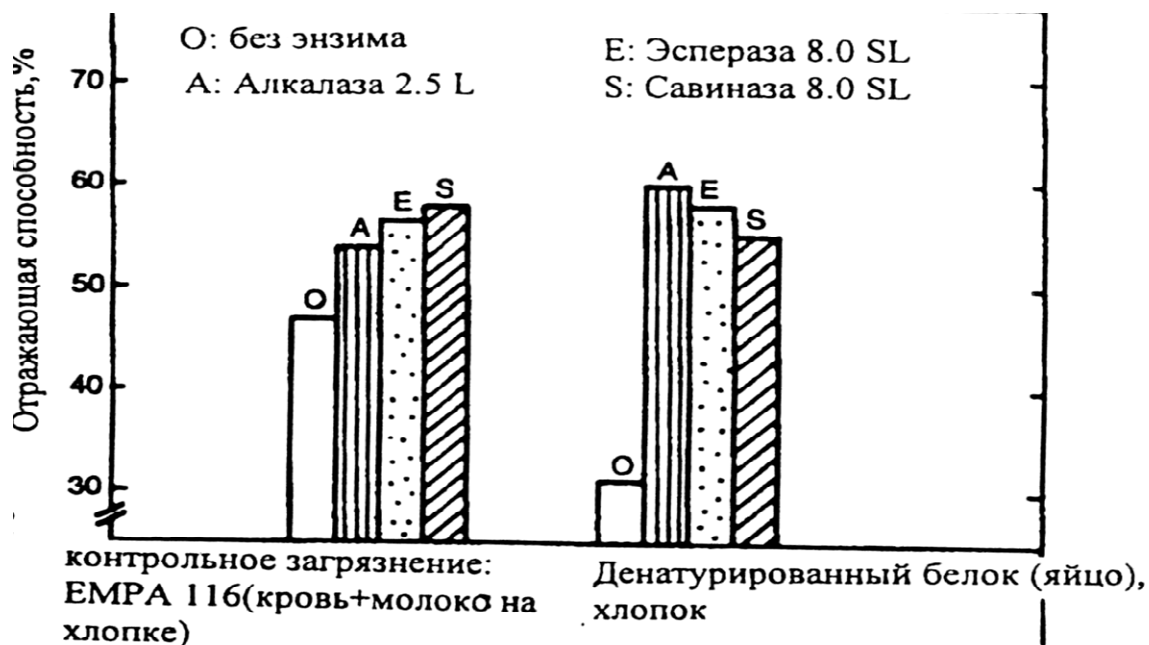


Рис. 30. Моющая эффективность протеазы

Условия стирки: стиральная машина: Launder-Ometer. концентрация энзима 0,5 % от количества МС, рН: 7,7. Температура: 25→60 °С, время стирки: 40 минут, жесткость воды: 10° по шкале жесткости.

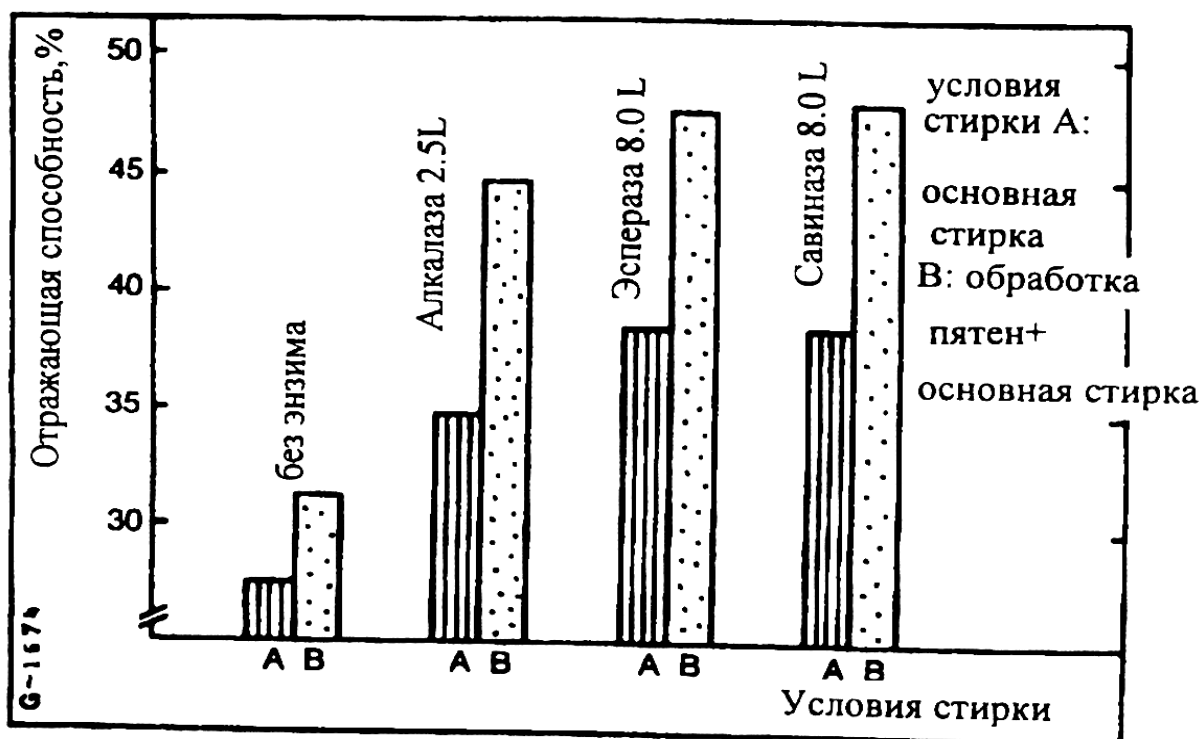
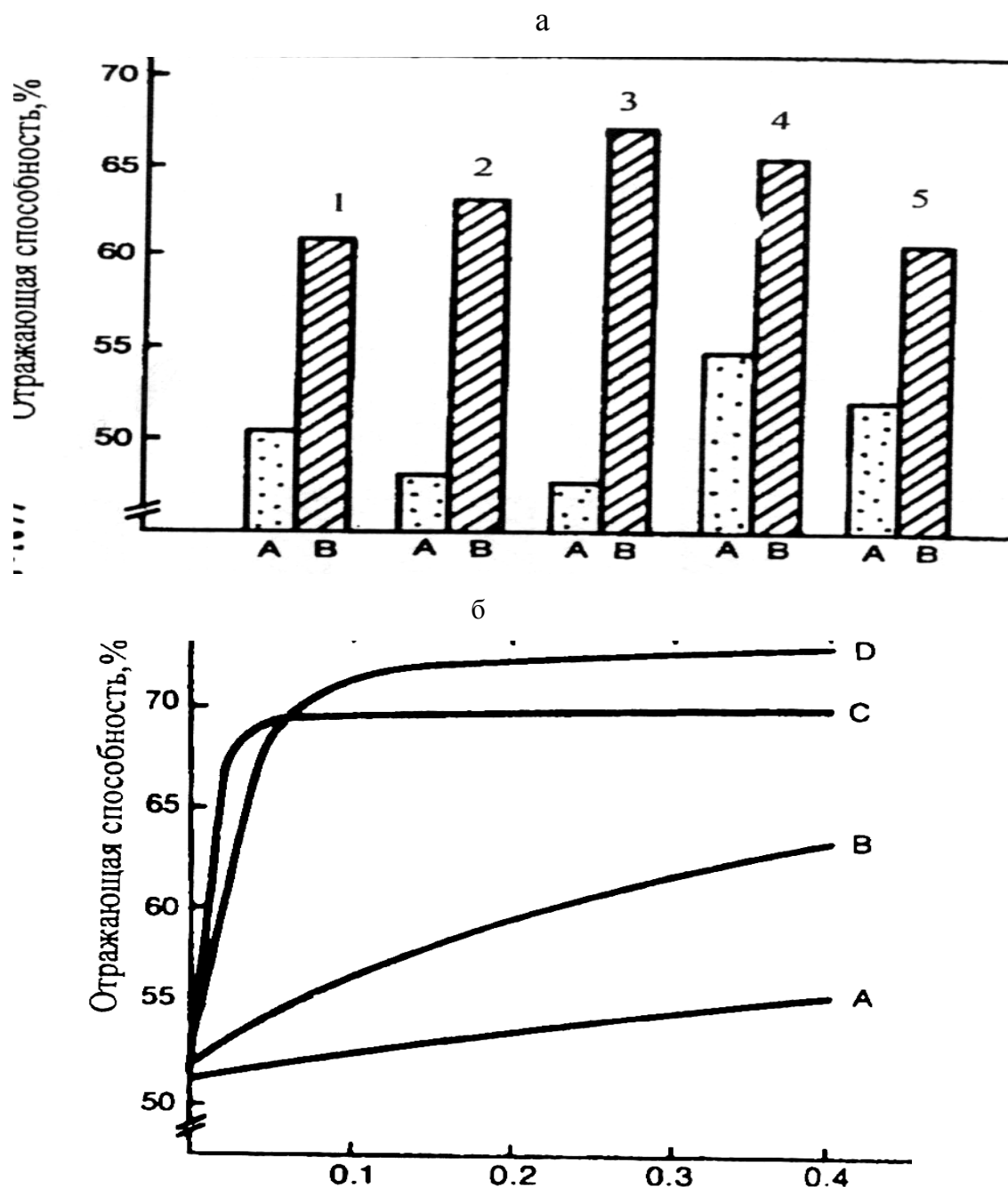


Рис. 32. Моющая эффективность ферментов

Одной из наиболее важных областей использования ферментсодержащих жидких МС является предварительная обработка особо загрязненных мест или

пятен. Пятно обрабатывается концентрированным МС и оставляется на пятне на 10-30 секунд, затем проводится стирка обычным способом. На рис.32. сравнивается моющая эффективность Алкалазы, Эсперазы и Савиназы.



Количество Термамила, %термамила от веса моющего средства

Рис.33 Моющая активность Термамила 300 L. а)А:без энзима, В: с- 4 %Термамила 300L в МС : 1-крахмальные загрязнения полиэфир/хлопок; 2-пшеничный крахмал, полиакрил; 3-кукурузный крахмал, полиакрил; 4-пшеничная мука, хлопок; 5-кукурузная мука, хлопок. б)Условия стирки: МС 1 г/л, рН: 8,4 – 8,9.Тестовое загрязнение: картофельный крахмал на хлопке: А: 25 °С/ 20 минут , В: 50 °С/ 10 минут , С: 30 сек. обработка пятен, затем условия А, D: 20 °С/ 17 часов замачивания, затем условия А

Термамил вносит существенный вклад в способность жидкого МС удалять крахмальные пятна (рис. 33.а,б). Как и в случае протеаз, высокая концентрация энзимного препарата, повышенная температура, предварительное замачивание и предварительная обработка пятен повышают эффективность Термамила. Термамил может быть использован в составе жидкого МС вместе с протеазами без опасности дезактивирующего взаимодействия между ними.

В табл.13,14 приведены результаты по стабильности энзимов в жидких МС при хранении.

Таблица 13

Стабильность ферментов при различных температурах

Фермент	остаточный % активности после			
	1 месяц 25°C	6 месяцев 25°C	1 месяц 30°C	1 месяц 37°C
Алкалаза 2.5 L, 0.5%	95	66	85	75
Эспераза 8.0 L, 0.5%	100	91	97	93
Савиназа 8.0 L, 0.5%	99	88	97	92
Термамил 300 L, тип D, 0.2%*	100	90	100	96

*МС содержит 0,5% Алкалазы 2,5 L.

Таблица 14

Примерные значения оптимальных рН и температуры

Энзим	Диапазон рН	диапазон температур
Алкалаза	7-9,5	10-65 °C
Савиназа	9-10,5	10-65 °C
Эверлаза	9-10,5	10-65 °C
Эспераза	10-11,5	40-75 °C
Термамил	8-11,5	10-90 °C
Дурамил	8-11	10-75 °C
БАН	7-9,5	10-40 °C
Липолаза	7-11	5-45 °C
Липолаза	7-11	5-45 °C
Ультра		
Целлюзим	7-9,5	20-70 °C
Карезим	7-10,5	20-55 °C

Ферментсодержащие жидкие МС, особенно в случае использования протеазы, являются продуктами, которые могут вызывать раздражение кожи и

слизистых оболочек, за счет совместного действия протеазы, ПАВ и растворителей. Поэтому очень важно в случае случайного пролива промыть загрязненные поверхности большим количеством воды.

Примеры ферментных моющих составов

Стабилизированный ферментный жидкий моющий состав: 3-35 % неионогенный ПАВ, 1-10 % стабилизатор, в частности вещества формулы $(R^{\pm})_m N(CH_3)_2-(CH_2)_n-COO^-$, где $m=0$ или 1, R =алкил C1-C12 или (C11-C17)-алкил-CONH-(CH₂)_n, $n=1-3$, фермент, в частности грибковую протеаза, амилаза или целлюлаза, или липаза, 1-40 % наполнитель, до 20 % растворитель и 20-70 % вода. Состав может быть использован для очистки и стирки текстильных изделий в промышленных масштабах и домашнем хозяйстве. Пример: питательный состав содержит 25 % Н.ПАВ, 5 % А.ПАВ, 5 % триэтаноламина, 20 % спирта, 5 % стабилизатора, 1 % протеазы, 0,3 % амилазы, вода.

Жидкое ферментативное моющее средство: ПАВ, комплексообразующие добавки, щелочная протеаза (в пересчете на активность 400 тыс. Д. ед/г), 5-20 % ди- или тринатриевая соль нитрилуксусной кислоты, 5-30% К- или моно-, ди- триэтаноламиновое мыло на основе жирных кислот с C10-C22 ,0,1-4 % тринатриевой соли моноакилоктадециламидаэтилендиаминотетрауксусной кислоты, 1-10 % натриевая соль алкилполиглицолевого эфирсульфата или алкилсульфата или алкилсульфината с алкильной частью из C8-C22 или октил- гексадецил тензосульфоната натрия или калия или моно- триэтаноламиновой соли, 1-20% оксиэтилированный жирный спирт или алканоламид с алкильной частью из C8-C22 и степенью оксиэтилирования 3-20 или их смеси, 1-60 % вода или спирт изопропанол.

Состав для отбеливания текстильных материалов и изделий: пербораты, перкарбонаты щелочных металлов, аддукты H₂O₂ их смеси. Гранулы фермента состоят из ядра, представляющего собой фермент гидролизу и растворимого в воде ПК из силиката щелочного металла.

Ферменты для моющих средств, применяемых в домашнем хозяйстве: «Махамyl» – щелочная α- амилаза, Bacillus lichen formis, устойчивая к действию окислителей, «Махасal» – щелочная протеаза Bac, alcalophulus (Голландская

фирма «International Bio-Synthetics B.V»). Состав порошкообразного МС для использования в автоматических машинах: 2-40 % карбонита или цитрата щелочных металлов, 1-17 % низкомолекулярного полимерного наполнителя, 1-12 % жидкого неионогенного ПАВ, 3-30 % силиката щелочных металлов, 0,1-1,5 % противоспенивателя, 0,5-15 % протеазного фермента, получаемого из микроорганизмов *Bacillus alculopheplus*, 0,3-8 %-амилаз, 8% воды, отбеливатель активного беления (перборат Na) NaOH pH-10,5, 1,9 % липаз.

Активное моющее средство. Состав: ферменты, отбеливатели активного отбеливания, красители, кондиционирующие ткань вещества, которые смешиваются с анионными, неионогенными, катионными или амфононными ПАВ для последующей АД на пористом гидрофобном материале, например, SiO₂ и нанесения на адсорбированные вещества слоя гидрофобного покрытия (например, силиконового масла), петролатума, воска, КМЦ, поливинилового спирта, капролактама. В качестве фермента используют: протеазу, липазу, амилазу, целлюлазу, оксидазу, пероксидазу и их смеси.

Пример: раствор ферментов совместно с ПАВ адсорбируют на SiO₂, затем диспергируют в силиконовом масле. Полученную дисперсию вводят в моющий состав, содержащий 10 % линейного алкилбензолсульфоната, 4 % алкилсульфоната, 9 % этоксилированного спирта жирного ряда C₁₂-C₁₅, 5 % жирной кислоты, 4 % олеиновой кислоты, 5 % лимонной кислоты, 5,4 % NaOH, 1,5 % пропандиоля, 5 % прочие ингредиенты.

Моющее средство с ферментативной отбельной системой: отбельная система, которая может образовывать пероксид водорода при определенных условиях применения, состоит из глюкозооксидазы и глюкозы, 5-70 % ПАВ, 10-65 % неорганического наполнителя, до 15 % неорганических солей, 5 % комплексообразователя для связывания солей тяжелых металлов, 3 % ингибиторов потемнения, 5 % веществ замедляющих перенос красителя, 5 % антивспенивателя, 6,7% фермента. Активность отбеливателя 30-20000 ед/г. Средство может представлять собой сыпучий порошок с насыпным весом 300-1200 г/л, либо водный или неводный пастообразный состав.

Моющее средство, содержащее ферменты: 12-25 % анионного ПАВ, алкилбензолсульфонатного и/или алкилсульфитного типов, 2-25 % неионогенного ПАВ типа алкилгликозидов и/или этоксилированных либо пропоксилированных спиртов C10-C22 с прямой или разветвленной цепью, 10-65 % водорастворимых неорганических наполнителей (алюмосиликатов щелочных металлов), 1-10 % водорастворимых наполнителей (солей поликарбоновых кислот), ферменты (протеазу, целлюлазу 500-2000 с 1-4 ед/г). МС отличается эффективным моющим и смягчающим действием, пригодно для стирки окрашенных текстильных изделий .

Пример: 18 % алкилбензолсульфоната Na, 1,5 % этоксиэтилированного спирта, 1,3% смеси этоксилированных цетилового и олеинового спирта, 8 % натриевого мыла, 50 % ут NaOH, 1% Na₂SO₄, 5 % СПЛ акриловой и малеиновой кислот, 3 % янтарной, глутаровой и адипиновой кислот, 14 л 5 % воды, 0,6 % протеазы, 0,4 % целлюлазы.

Жидкое моющее средство, содержащее α-аминобороновую кислоту: 1-80 % ПАВ с моющим действием, 0,0001-0,3 % протеолитических ферментов или их смесей с целлюлазой или амилазой subtilisin BPN или ее смеси с липазой, целлюлазой и амилазой, 0,0001-5 % α-аминобороновой кислоты формулы PNH₂C(R)NH₂(OH)₂, где R=H или (AA₂)_m-(AA₁)_n- аминокислоты, благодаря их введению регулируется активность ферментов.

Пример: 5 % C12-C15- алкилсульфата Na, 6 % этоксиэтилированного C14-C15- алкилсульфата, 6 % амида глюкозы C12, 7 % этоксиэтилированного спирта C12-C15, 3 % олеиновой кислоты, 5 % лимонной кислоты, 2 % C12-C14- алкилзамещенной янтарной кислоты, 4 % NaOH, 3 % спирта, 5 % 1-2 пропандиола, 1 % кумолсульфоната Na, 0,1 % амилазы, 0,4 % савиназы, 0,5 % экспериментальных ферментов (липаза-микроорганизма Pseudomonas pseudocaligenes, Mr = 30323 дальтон. Активность этой липазы при 30 °C и pH 9 по отношению к триолеиновому субстрату составляет 8000 ед/г белка, может вызывать гидролиз триглицеридов C2-C18) , 0,08 % α-аминобороновой кислоты, 1 % полимеров, способствующих удалению грязи, 4 % жирных кислот, вода .

Список литературы к главе

1. Stabilised enrymatic liquid detergent composition: Пат.5156773 США, МКИ С // D 1/90, С // D 7/42 / Kochavi Daniel, Lentner Vicki; Navo Narolisk AIS – N 448973; Заявлено 12.12.89; Опубликовано 20.10.92 НКИ 252/547.
2. Encapsulated enryme in dry bleach composition: Пат.5167854 США, МКИ С 01 В 15/055 / Delecuw D.L., Steichen D.S.;The Clorox Co. – N 402207; Заявлено 1.9.89; Опубликовано 1.12.92.
3. Enrymes for household detergents / Kochavi Daniel // Int. News Fats, Oils and Pelat. Mater. – 1993 – 4, №9 – с.990, 992, 994-995- Англия.
4. Van. E.E., tan H., Van Rijswijk Willem C., Bollier Marc // Chim. oggi.- 1992-10, №8-9-с.21-24.
5. Пат.5173207 США, МКИ С // D 3/395, С // D 3/381 / Drapier Julien; Colgate – Palmoliv Co.–N 708576; Заявлено 31.5.91; Опубликовано 22.19.92; НКИ 252/99.
6. Detergent additives: Заявка 0383512 ЕПВ, МКИ С // D 17/00 / Surufriidis Alhanasios, Jones Roges J.; The Procter and Gamble Co. – N 92202534.1; Заявлено 18.8.92; Опубликовано 23.2.94.
7. Waschmittel mit enzymatischem Bleichsystem: Заявка 4231767 ФРГ, МКИ С // D 3/386, С // D 17/00 / Andexer Heidi, Vpadek Horst; Henkel KGa A. – N 423/767.3; Заявлено 23.9.92; Опубликовано 24.3.94.
8. Enrymhatiges Waschmittel: Заявка 4224947 ФРГ, МКИ С // D 3/386, С // D 1/83 / Sandkuhler Peter, Caspec Hannelore; Заявлено 29.7.92; Опубликовано 3.2.94.
9. Заявка 0583536 ЕПВ, МКИ С // D 3/386 / Labegue Regine, Lenoir Pierre; The Procter and Gamble Co.–N 92870123.4; Заявлено 14.8.92; Опубликовано 23.2.94.
10. Enrymatyciny ciektу srodek do prania j sposob jego wytwarenia: Пат.158507 Польша, МКИ С // D 1/831 / Kotas Andrrej; Stotecrne Zaktady Chemii Gospodarcrej «POLLENA», Nowy Dwoz Marowiecky, - N 277669; Заявлено 10.2.89; Опубликовано 30.9.92.
11. Detergent enzymes / Christonsen Poul N., Gomsen Erik // Chim. oggi. – 1993.-11, №10 – с.15-17.

3. Ферментативные технологии для отделки кожи и меха

3.1. Ферменты для отделки кожи и меха

Для кожевенного и мехового производств наибольший интерес представляет действие протеолитических ферментов (протеиназ) на коллаген. По воздействию на коллаген ферменты подразделяют на неспецифические, например трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин, щелочная и кислая протеазы, и специфические, например коллагеназа. Наиболее изучено действие на коллаген трипсина и пепсина.

К факторам устойчивости неизмененного коллагена к действию **трипсина** относят наличие:

- поперечных ковалентных -CO-NH- и эфирных связей между главными цепями коллагена, которые препятствуют доступу трипсина к основным пептидным связям, находящимся в самих цепях коллагена. Кроме того, для действия трипсина на коллаген необходимо наличие свободных амино- и иминогрупп. Поскольку свободных концевых аминок групп в нативном коллагене очень мало, а аминок группы боковых цепей принимают участие в образовании поперечных ковалентных и электровалентных связей, трипсин не может присоединиться к нативному коллагену;

- большого количества пролина и гликоколя в коллагене, связь между которыми характеризуется большой прочностью;

- спиральной структуры молекул коллагена, стабилизированной различными связями (водородными, электровалентными, ковалентными и гидрофобными) и четвертичной (субфибриллы, фибриллы, волокна, пучки волокон), а также особой морфологической надфибриллярной структуры дермы, препятствующей взаимодействию реакционных групп нативного коллагена с трипсином.

Трипсин действует на измененный коллаген, подвергавшийся предварительным обработкам (нагревание, сваривание, обработка щелочами, кислотами, солями, пепсином), при которых происходит расщепление

коллагена и прежде всего разрыв поперечных (межмолекулярных) ковалентных связей, а также частичная деструкция. На измененный коллаген, подвергавшийся предварительным обработкам, приводящим к образованию в нем новых поперечных связей (сухое нагревание, формалирование, дубление), трипсин не действует (или действует очень слабо), что определяется степенью предварительных воздействий. Трипсин действует на пептидные связи в главных цепях измененного коллагена и не действует на межмолекулярные связи. Механизм действия трипсина на коллаген заключается в присоединении трипсина, с одной стороны, к свободным аминок группам коллагена, наиболее близко расположенным к пептидным связям (прежде всего к аминок группам боковых цепей), с другой - к NH-группам пептидных связей и OH-группам энолизированных пептидных связей с последующим каталитическим воздействием на гидролиз этих пептидных связей в главных цепях коллагена, т.е. происходит деполимеризация (деструкция) цепей. Трипсином расщепляются не все пептидные связи коллагена, а только те, в образовании которых участвуют карбоксильные группы аргинина и лизина и аминок группы других аминокислот, но не участвуют иминокислоты. Связи $-CO-N=$, в которых участвуют атомы азота остатков пролина и оксипролина, трипсином не расщепляются. Оптимальные условия действия трипсина на коллаген: pH 8-8,2, температура 37 °C.

Пепсин действует на неизмененный коллаген. Предварительные обработки коллагена щелочами, кислотами, солями, а также частичная механическая деструкция увеличивают действие пепсина. Однако усиливающее действие этих обработок возрастает до определенной степени расщепления коллагена, чего не наблюдается при действии трипсина. Отщепление телопептидов способствует действию пепсина на трехспиральные молекулы коллагена. Ослабляют действие пепсина на коллаген сухое нагревание, глубокая механическая деструкция, формалирование и дубление. Пепсин катализирует гидролиз пептидных связей между цепями коллагена и частично в главных цепях. Механизм действия пепсина на коллаген заключается в

присоединении пепсина к свободным карбоксильным группам коллагена и к одной из групп тех связей между цепями или пептидных связей в главных цепях, гидролиз которых катализирует пепсин. Расщепляемые пепсином пептидные связи обычно образованы остатками глутаминовой кислоты, фенилаланина и тирозина. Деструкция (распад) коллагена под действием пепсина обуславливается разрывом связей в главных цепях, выплавляемость — разрывом межмолекулярных связей. Полному распаду коллагена под действием пепсина способствует двустадийная обработка. В первой стадии коллаген сильно набухает, в раствор переходит около 10 % белка. На второй стадии обработкой в свежем подкисленном растворе пепсина достигается полное растворение коллагена. Оптимальные условия действия пепсина на коллаген: рН 1,65—2, температура 37 °С.

Считают, что протеолитические ферменты действуют на пептидные связи неспирализованных участков одиночных пептидных цепей (телопептидов), находящихся на концах тропоколлагеновых частиц и участвующих в продольной агрегации этих частиц.

Изучение действия трипсина и пепсина на проколлаген показало, что при температуре 20°С происходит выделение кислых неколлагеновых фрагментов и фракции, богатой оксипролином. Глубокие изменения проколлагена с образованием низкомолекулярных пептидов происходят при температуре 41°С, превышающей температуру его денатурации. Зрелый нерастворимый коллаген после обработки протеиназами становится кислоторастворимым. Получаемый таким способом растворимый коллаген только по некоторым отдельным свойствам отличается от проколлагена.

Действие коллагеназы (штамм *Clostridium hystolyti*-kum и *Clostridium perfringens*) может осуществляться как на волокнистый нативный коллаген, так и на трехспиральные тропоколлагеновые частицы. Коллагеназа гидролизует субстраты, имеющие в структуре остатки пролина или оксипролина, N-концевой аминокислотой всегда является глицин, а C-концевой аминокислотой в большинстве случаев — оксипролин. В то же время существенное влияние на

взаимодействие субстрата с ферментом и на скорость гидролиза оказывают пирролидиновые кольца, имеющие гидрофобный характер. Участие аминокислотного остатка глицина в образовании чувствительной связи к действию коллагеназы также имеет существенное значение. Скорость гидролиза замедляется, если в положении R находятся остатки аргинина (особенно глицина) и глутаминовой кислоты. Важное значение имеет блокирование иминокислотной группы у N-концевого остатка пролина в молекуле субстрата, хотя природа маскирующей группы X незначительна. В положении Y могут находиться как аминокислотные остатки, так и амидные и эфирные группы.

Специфика действия на коллаген коллагеназы, как и других ферментов, определяется особенностями не только химического состава и первичной структуры коллагена, но и других уровней организации его структуры. Оптимальные условия действия коллагеназы: pH 7—9, температура 37 °C.

Деструктивное расщепление нативного коллагена может производить один из ферментов, выделяемых из культуры плесени *Asp. oryzae*. Его оптимальная активность проявляется при pH 9—10. В отличие от коллагеназы фермент гидролизует более полярные участки молекул коллагена, а также эфирные связи в его структуре.

Проназа — комплексный ферментный препарат, выделенный из культуры *Streptomyces griseus* и состоящий из двух пептидаз и четырех протеиназ, различающихся по своим физико-химическим свойствам и специфичности, обладает широкой субстратной специфичностью. Оптимальное pH действия проназы 7—7,5. Длительное воздействие проназы на молекулы тропоколлагена приводит к их гидролизу до отдельных аминокислот даже при относительно невысоком соотношении фермент:субстрат. В результате действия проназы на кислоторастворимый коллаген уменьшается его агрегационная способность, что сопровождается снижением вязкости коллагеновых растворов. При этом спиральная структура коллагена не нарушается. Обработка проназой зрелого коллагена ведет к превращению его в кислоторастворимую форму без денатурации, что свидетельствует о действии

проназы на межмолекулярные связи коллагена. Таким образом, в зависимости от условий проведения ферментативной обработки можно получить различную степень расщепления структурных элементов коллагена.

Протелин (штамм *Streptomyces griseus*) и **римопротелин** (штамм *Actinomyces rimosus*) — комплексные ферментные препараты с высокой протеолитической активностью. Оптимальное pH действия протелина 7–7,5, римопротелина — 6,8–7. Оба препарата расщепляют проколлаген значительно более глубоко, чем, например, трипсин. Так, число распавшихся пептидных связей на 1 моль белка составляло для протелина 20,5, для римопротелина 17,8, а для трипсина 3,2. Протелин и **римопротелин** активно действуют на неденатурированный белок. Степень гидролиза протелином такого проколлагена на отдельные аминокислоты достигает 70 %. Данные ферменты способствуют гидролизу внутри- и межмолекулярных поперечных связей коллагена. Последовательная обработка коллагена обоими ферментными препаратами дает больший эффект, чем действие каждого из них в отдельности, что позволяет сделать вывод о содержании в них протеиназы различной специфичности.

Субтилизины (штамм *Bac. subtilis*) расщепляют денатурированный коллаген с большей скоростью, чем нативный. При длительном действии, а также при высокой концентрации фермента субтилизины гидролизуют коллаген глубже, чем такие ферменты животного происхождения, как пепсин, трипсин или химотрипсин. При этом субтилизины могут гидролизовать связи как в главных цепях, так и поперечные внутри- и межмолекулярные, отщепляя свободные аминокислоты. С наибольшей скоростью субтилизины гидролизуют связи, образованные карбоксильными группами аминокислот с гидрофобными боковыми цепями лейцина, фенилаланина и тирозина. Оптимальные условия действия субтилизинов: pH 8–10,5.

Нейтральная протеиназа (*Bac. subtilis*) — один из наиболее активных протеолитических ферментов, известных в настоящее время. Специфичность определяется природой остатка, которому принадлежит аминная группа

гидролизуемой связи. Нейтральные протеиназы расщепляют в коллагене связи, образованные аминными группами аминокислот с гидрофобными боковыми цепями (валина, лейцина или фенилаланина). Оптимальные условия действия нейтральной протеазы: pH 6,5—8.

Альфа-амилаза плесневых грибов *Asp. awamori* и *Asp. oryzae* и бактерий *Bac. Subtilis* катализирует гидролиз связей, находящихся в главных цепях коллагена и поперечных внутри- и межмолекулярных связей. Нерастворимый коллаген после обработки альфа-амилазой становится растворимым (пептиды со средней молекулярной массой 24 000 - 28 000).

3.2. Изменение кератина и эластина при действии ферментов.

Кератин обладает большой устойчивостью к действию ферментов, что связано с особенностями его химического строения и структуры. Кератин разрушается при поражении его гусеницами моли. Выяснено, что пищеварительные соки, выделяемые этими гусеницами, имеют pH 9,9 и содержат вещество, способное восстанавливать дисульфидные связи; последнее необходимо для действия протеолитических ферментов. Растворение кератина обуславливается не присутствием в составе пищеварительных соков гусениц специальных ферментов, а присущим им восстановительным действием, в результате которого возможно дальнейшее повреждение кератина обычными протеолитическими ферментами. Механическое и химическое воздействие на кератин обуславливает уменьшение его устойчивости к действию трипсина. Однако и после этих воздействий растворяется не более 10% исходного образца. Обработка волокон шерсти тиогликолевой кислотой с последующим воздействием дигалогеналкилом создает устойчивость ее к различным ферментам и сокам гусениц моли. Кератин обладает большой устойчивостью к действию пепсина. Эта устойчивость ослабляется после восстановления дисульфидных связей.

Кератиназа *Streptomyces fradiae* способна гидролизовать нативный кератин в отсутствие каких-либо кофакторов или восстанавливающих веществ.

Кератиназа переводит нативный кератин в растворимое состояние до нативных белков шерсти. Оптимум действия фермента на шерсть наблюдается при pH 9. Основными продуктами ферментативной реакции являются пептиды.

Эластин менее устойчив к действию трипсина, чем коллаген. Пепсин на эластин не действует. Ферментом, специфически действующим на эластин, является эластаза, выделенная из поджелудочной железы. Кроме поджелудочной железы богатым источником эластаз являются микроорганизмы. Так, из культур *Actinomyces rirhosus*, *Actinomyces fradiae*, *Bacillus subtilis*, *Flavobacterium elastolyticum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces griseus*, *Str. eptomyces fradiae* были выделены ферментные препараты, обладающие эластазной активностью. Большинство указанных препаратов имеет наряду с эластазной активностью неспецифическую протеолитическую активность.

Из культуры *Flavobacterium elastolyticum* была выделена эластаза, действующая только на эластин и не обладающая неспецифической протеолитической активностью.

Эластолиз — комплексный процесс, состоящий из адсорбции эластазы на эластине и дальнейшего расщепления последнего. Степень воздействия эластазы на эластиновые волокна в значительной мере зависит от характера их предварительной обработки. Наиболее быстро гидролизуются пептидные связи, образованные аминокруппами неполярных аминокислот таких, как валин, лейцин, серин, аланин и глицин. Такой характер специфичности хорошо объясняет гидролизуемость эластина, так как последний приблизительно на 93 % состоит из этих аминокислот. Например, эластаза *Ps. aeruginosa* катализирует гидролиз связей по аминным группам остатков лейцина, валина, фенилаланина, тирозина и аланина.

Ферментативные процессы могут происходить в кожевенном и меховом сырье при действии ферментов, выделяемых микроорганизмами, которые находятся на шкуре, а также ферментами, находящимися в тканях шкуры и вызывающими процесс автолиза, неблагоприятно влияющий на качество сырья.

Изменения, происходящие в кожевенном и меховом сырье и полуфабрикате при действии ферментов, исследуются разнообразными методами. Определяют изменение химического состава сырья и полуфабриката как в них самих, так и по переходу в обрабатывающие жидкости различных веществ, например белков, продуктов их распада, углеводов, жиров и жироподобных веществ. Исследуют продукты распада и выплавления, определяют прочность связи волоса с дермой, изменение структуры и свойств дермы и волоса с помощью химических, физико-химических, физических и механических методов, например оптической и электронной микроскопии, дифференциально-термического анализа, акустической спектроскопии и др.

3.3. Использование ферментных препаратов в кожевенном и меховом производстве связано с двумя процессами — швицеванием для обезволашивания и шакшеванием для мягчения. В процессе швицевания создаются благоприятные условия (температура, влажность) для жизнедеятельности микроорганизмов шкуры животного. В процессе жизнедеятельности эти микроорганизмы выделяют ферменты, образуются продукты распада белковых веществ — амины, аммиак, органические кислоты и пр. Все эти вещества активно способствуют обезволашиванию. Как правило, для обработки используют кислые протеазы с оптимумом активности при pH 4,5—5. Перед ферментативной обработкой полуфабрикат промывают для удаления несвязанных соединений хрома, которые инактивируют применяемые ферменты. Ферментативную обработку осуществляют при температуре 37-40°C, расходе ферментного препарата 2-4% от массы полуфабриката. Продолжительность процесса от 2 до 24 ч, далее полуфабрикат промывают, додубливают и жируют.

При большем расходе ферментов получают кожи, пригодные для анилиновой отделки. Для обработки кожевенного сырья целесообразно использовать полиферментные препараты, имеющие протеолитическую, липолитическую и гликозидазную активность. Создание оптимальных условий

для ферментативных обработок способствует получению кожи высокого качества, увеличению ее выхода по площади, снижению загрязненности сточных вод, повышению производительности труда.

Ферментативные процессы мехового производства используются для придания кожевой ткани меха мягкости и пластичности без ослабления связи волосяного покрова с дермой. Это достигается путем удаления межволоконного вещества: белков, углеводов и их комплексов, а также более тонкого разделения коллагеновых волокон. Например, отмоку пересушенных пресно-сухих шкурок кролика рекомендуется проводить с применением протеаз, выделенных из грибных культур, с оптимальным действием при рН среды 4,5—5,5, концентрации 2 г/дм³, температуре обрабатывающей жидкости 22 °С, продолжительности обработки 36 ч. Отмоку шкурок сурка рекомендуется проводить с использованием Мальтаваморина П2х (концентрация 2,5 г/дм³) или пектофоептидина П10х (концентрация 0,6 г/дм³) в течение 24 ч, что наряду с сокращением продолжительности обработки способствует более легкому удалению в процессе мездрения подкожно-мускульного слоя.

Ферментативный метод обезжиривания основан на гидролитическом расщеплении жира под действием ферментов липаз. Имеющиеся липолитические ферментные препараты, как правило, содержат наряду с липазами ферменты другой способности, например, протеазу, гликозидазу и др. Липазы применяют при концентрации 1—4 г/дм³, рН 4-7,5, продолжительность обезжиривания 1-4 ч по схеме: отмока, отжим со стороны волосяного покрова, мездрение, ферментативное обезжиривание, промывка, пикелевание-дубление (далее по классической технологии обработки меховых овчин).

Липазин и липаза, выделенные из свиной поджелудочной железы, а также липопроотеидлипаза дают положительный эффект обезжиривания. В случае применения этих ферментных препаратов качественные реакции на за жиренность – отрицательные, содержание жира в волосе ниже, чем предусмотрено ГОСТ 4661-76 с изменениями 1983 г. (не более 2 %), волосяной покров хорошего качества, равномерно окрашен (табл. 15 и 16).

Таблица 15

Характеристика ферментных препаратов

Ферментный препарат	Продуцент	Липазная активность, ед./г
Липазин	Свиная поджелудочная железа	3200
Липаза	- "-	4500
Липаваморин ГЗх	Asp. awamori	440 000
Липаза	Rhiz delemar	2 000 000 .
Липаза	Pseudomonas acruginase ВКМ-В-588	940 000
Липопроотеидлипаза	Rhiz delemar	1200

Таблица 16

Показатели качества ферментативного обезжиривания волосяного покрова меховых овчин

Ферментный препарат	Качественная реакция на за жиренность	Массовая доля веществ, экстрагируемых органическими растворителями, % от массы аб. сух. вещества	Прочность связи волоса с кожной тканью	Качество окрашивания волосяного покрова	Проработанность волосяного покрова, баллы
Липазин	-	1,7	Ослабленная	Равномерное	5
Липаза		1,9	То же	То же	5
Липаваморин ГЗх	+	12,0	Прочная	Неравномерное	2
Липаза		5,0		То же	2
Липаза		6,5			2
Липопроотеид липаза	-	1,2		Равномерное	5

Применение липопроотеидлипазы и липазы (продуцент культуры *Sacharomycopsis lipolytica*, 100000 ед./г, рН 7-8, температура 37-42 °С) позволяет повысить производительность труда, сократить длительность производственного цикла, уменьшить расход воды, пара, снизить загрязненность сточных вод (за счет исключения ПАВ).

Известны способы обезжиривания, предусматривающие применение протеаз в сочетании с ПАВ. Эффект обезжиривания в данном случае обусловлен тем, что протеазы способствуют расщеплению мембран

жировых клеток, в результате чего натуральный жир под действием ПАВ эмульгирует. Кроме того, ферментные препараты способствуют удалению загрязнений белковой и углеводной природы, что объясняется воздействием протеаз на белки и белковую часть гликопротеидов. При этом происходит интенсификация процесса и удается достичь требуемого эффекта мойки и обезжиривания при однократной обработке шкур в моющем растворе без повреждения волосяного покрова. В процессах мойки и обезжиривания овчин используется ферментный препарат протеолитического действия протосубтилин ГЗХс целью воздействия его на белковые составляющие загрязнений, оболочки жировых клеток и межволоконные белки. Протеолитическая активность препарата менее всего снижается в присутствии неионогенных ПАВ и гидрокарбоната (табл. 17). Аналогичные закономерности были обнаружены для нейтральной протеазы ПОХ и щелочных протеаз ПОх и Г20Х при температуре раствора 42 °С.

Таблица 17

Влияние компонентов моющего раствора на активность Протосубтилина ГЗх

Компоненты раствора	Относительная активность протосубтилина ГЗх в растворе, %, при температуре, ° С	
Анионоактивные ПАВ	37 %	42 °С
Паста "Новость"	33,2 %	28,7 °С
"Волгонат"	41,7 %	30,4 °С
Неионогенные ПАВ		
Синтанол ДС-10	91,2 %	96,4 °С
Синтамид-5	87,7 %	88,6 °С
Превоцелл W-OF-100	86,4 %	91,1 °С
Карбонат натрия	76,2 %	75,6 °С
Гидрокарбонат натрия	98,0 %	98,6 °С
Формалин	76,0 %	74,9 °С

Ингибирование активности протеаз в присутствии анионоактивных ПАВ объясняется адсорбцией ПАВ на белковых частицах как фермента, так и субстрата, что препятствует взаимодействию их друг с другом. Обнаружено некоторое ослабление ингибирующего действия анионоактивных ПАВ на

ферментные препараты в присутствии неионогенных ПАВ, что, по-видимому, происходит благодаря снижению адсорбции анионоактивных ПАВ на частицах белка и образованию мицелл ПАВ смешанного состава. Поскольку неионогенные ПАВ не обладают достаточной эмульгирующей способностью, то следует использовать также анионоактивные ПАВ, но добавлять их можно второй стадии обработки. Использование Протосубтилина ГЗХ для мойки и обезжиривания положительно сказывается на свойствах волосяного покрова и кожной ткани меховой овчины (табл .18).

Таблица 18

Свойства кожной ткани меховой овчины

Показатель	Обезжиривание	
	с ферментным препаратом	без ферментного препарата
Температура сваривания, ° С	75	76
Массовая доля веществ, экстрагируемых органическими растворителями, %	15,6	16,3
Нагрузка при разрыве, Н	80,0	77Д
Предел прочности при растяжении, МПа	17,1	16,0
Удлинение при разрыве, %	89,6	86,8
Удлинение при напряжении 4,9 МПа, %		
-полное	52	49
-остаточное	33,6	24,8
-упругое	18,4	24,2
Условная жесткость (на ПЖУ), Н	0,14	0,19
Мягкость, баллы	4,3	4,0
Поверхностная плотность полуфабриката, г/дм ²	10,0	10,9
Средняя площадь одной овчины, дм ²		
-в сырье	91,5	92,5
-полуфабрикате	66,0	65,9
Выход площади полуфабриката, %	72,15	72,2

После отмоки кожную ткань обрабатывают раствором, содержащим ферментный препарат Протосубтилин ГЗХ (концентрация 1 г/дм³), неионогенное ПАВ и щелочной реагент, рН=8,3; через 30 мин от начала обработки добавляют формалин и анионоактивное ПАВ, общая

продолжительность обработки 1 ч, температура 42 °С. Применение Протосубтилина ГЗХ для мойки и обезжиривания овчин позволяет интенсифицировать технологический процесс, снизить расход воды, пара, химических материалов, электроэнергии, улучшить качество полуфабриката и уменьшить объем сточных вод. К недостаткам данной технологии следует отнести присутствие в обрабатываемом растворе формальдегида, который применяется с целью упрочнения связи волоса с кожной тканью, ввиду того, что ферментный препарат Протосубтилин ГЗХ действует в слабощелочной среде и в определенных условиях обладает обезволашивающей способностью.

В случае применения кислых и нейтральных протеаз рекомендуются следующие условия проведения мойки-обезжиривания: температура обрабатываемой жидкости 30—35 °С, концентрация моющего средства 3-5 г/дм³ (в зависимости от содержания натурального жира в шкурках), ферментного препарата 1-3 г/дм³, антисептика—консерванта 0,3-0,5 г/дм³, продолжительность обработки 4—6 ч. Совмещенное проведение процессов отмоки—мойки—обезжиривания способствует интенсификации технологического процесса, улучшению качества полуфабриката.

Ферментативное мягчение шкур позволяет получить более мягкую коженную ткань по сравнению с неферментативными способами обработки — сернокислым и уксуснокислым пикелеванием или солением (обработкой с применением сульфата аммония). Для мягчения меховых шкур наиболее целесообразно использовать гликозидазные и полиазные ферментные препараты, обладающие несколькими активностями: глюкамилазной, амилазной, мальтазной, полигалактуронозной, а также протеиназной кислой и нейтральной. Механизм мягчения меховых шкур гликозидазными ферментными препаратами состоит в гидролизе углеводных компонентов, в частности кислых мукополисахаридов, которые находятся в межволоконном веществе не только между коллагеновыми пучками волокон, но и внутри них, между более тонкими волокнами. Гидролиз углеводных компонентов межволоконного, вещества сопровождается разделением волокнистой

структуры дермы и коллагеновых пучков на более тонкие структурные элементы. Установлено, что для меховых овчин показателем оптимальной эффективности обработки является удаление не менее 60 % углеводов от начального их содержания в кожной ткани. Кроме того, смягчение гликозидазными ферментными препаратами не оказывает заметного воздействия на прочность связи волоса с дермой, что является важным условием при обработке меховых шкур.

Аваморин (П, ПК и ПС) обладает амилазной, мальтазной, декстриназой и частично протеазной активностью. От других ферментных препаратов плесневого происхождения (типа *Aspergillus*) аваморин отличается проявлением протеазной активности только в кислой среде при pH 2-2,5. В аваморине глюкамилазная активность в несколько большей степени, чем другие, отражает специфическое действие ферментов на углеводные компоненты кожной ткани. Для обработки меховых шкур можно использовать аваморин всех видов при следующих примерных соотношениях: 1 г Аваморина ПК : 10 г Аваморина П : 4 см³ Аваморина ПС. Начальная pH раствора 4,5 температура 38 °С, а концентрация в обрабатывающем растворе Аваморина П 10-12 г/дм³. Раствор также содержит гексафторсиликат натрия 1 г/дм³, хлорид натрия 20 г/дм³. Продолжительность обработки 24 ч. Перед смягчением рекомендуется предварительная обработка овчины раствором хлорида аммония или слабым раствором уксусной кислоты (предпикель). После смягчения необходимо провести обработку гидросульфитом натрия или хлоридом аммония, или молочной кислотой.

При использовании ферментативного смягчения Аваморином поверхностная плотность сырья меньше на 13 %, толщина кожной ткани меньше на 13 %, выход площади больше на 2 %, коэффициент пластичности выше на 16 % чем при смягчении химическим способом.

В настоящее время для смягчения овчин используют **Пектофоедин П10Х** (ТУ 59-120—77) — препарат, полученный при осаждении этанолом диффузионной вытяжки гриба *Asp. foetidus*, и **Мальтаваморин ПОХ** (ТУ

59.05.097.64-84), полученный так же, но из гриба *Asp. awamori*. Обработку проводят по следующей схеме: обезжиривание — предпикелевание — мягчение — пикелевание — дубление — жирование. Повышается число овчин с грубой кожаной тканью и исключаются затраты на их переделку. Полная технологическая схема выделки шкурок кролика с ферментативным мягчением и окуночным жированием: отмока, мездрение — предпикелевание — мягчение; пикелевание — дубление — жирование. Мягчительный раствор может быть использован многократно, в результате чего уменьшается расход химических реагентов, ферментов и воды.

Ферментативную обработку дубленого полуфабриката осуществляют преимущественно с применением протеаз, например: Протофоегидин ГПОХ (основная активность — протеолитическая, оптимум действия при pH 2,5-3), аваком ПОХ — Глюкоаваморин ПОХ (основная активность — глюкоамилазная, оптимум действия при pH 4,5-5), амилосубтилин ГЗХ (основная активность — амилолитическая, оптимум действия при pH 6-7), (табл. 19) .

Таблица 19

Результаты действия ферментных препаратов на хромированный дубленый полуфабрикат

Показатель	Протофоегидин П1ОХ	Аваком ПОХ	Амилосубтилин ГЗХ
Концентрация препарата, г/дм ³	0,5	1	0,5
pH раствора начальный	2,15-2,4	5,35-5,45	6,95-7,05
конечный	2,3-2,7	5,5-5,65	6,15-6,2
Снижение температуры сваривания кожаной ткани, °С	1	3	10
Снижение кажущейся плотности, %	18	7	9,5
Снижение жесткости, %	42,3	52,5	48

Примечание : при ж.к.=20, температуре 40 °С, продолжительности 17 ч, концентрации в обрабатывающем растворе хлорида натрия 20 г/дм³, не-ионогенного ПАВ 0,5 г/дм³, ферментного препарата 0,5-1 г/дм³.

В случае обработки Протофоептидином П1ОХ и Авакомом ПОХ это снижение термической устойчивости хромированного полуфабриката минимально и не оказывает влияния на качество готового полуфабриката. Обработка Амилосубтилином ГЗХ значительно снижает термическую устойчивость готового полуфабриката.

Щелочная протеаза В-72 (*Vac. subtilis*) применяется в процессе нейтрализации с целью снижения массы меховых шкурок и увеличения мягкости хромированного мехового полуфабриката. Оптимальную активность протеаза проявляет в интервале температур 50-70 °С, поэтому нейтрализацию проводили при температуре 50—55 °С. Кожевая ткань меховых шкурок после дубления имеет температуру сваривания 90 °С, массовую долю оксида хрома - 2,7 %, плотность- 6,3 г/дм². Нейтрализацию проводят при температуре 55 °С, рН 10, концентрации щелочной протеазы 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 г/дм³.

На практике обработку хромированного полуфабриката ферментными препаратами проводят непосредственно после дубления или как дополнение после процессов крашения, жирования, отбеливания. Возможно совмещение такой обработки с указанными процессами. Более эффективно проведение ферментативной обработки после дубления или в процессе нейтрализации. В зависимости от вида меха продолжительность обработки составляет от 2 до 24 ч, температура раствора от 20 до 60 °С.

Ферментные препараты находят все более широкое применение в производстве меха на самых различных стадиях производства: в отмоке, обезжиривании, мягчении, дубильных процессах. Так, обработка овчин с применением ферментных препаратов (**Мальтаваморина П2Х, П10Х или ПОХ, Делемарина П1ОХ, Ризопина П10Х, Глюкаваморина П1ОХ, Пектофоептидина П10Х, Пектаваморина П10Х**) в процессах отмоки и мягчения получен коэффициент пластичности кожаной ткани, равный 8,3, в то время как в случае обработки, не предусматривающей применение ферментных препаратов, коэффициент пластичности равен 5,9. Масса овчин ферментативной выделки уменьшается примерно на 20 %. Овчины

ферментативной выделки имеют более тонкую и более прочную кожевую ткань. Удлинение при разрыве, а также полное остаточное и упругое удлинение при напряжении 10 МПа практически одинаково. Выход овчин по площади при ферментативной выделке на 4,3 %, а качественные соотношения на 3,1 % выше, чем при обычной выделке.

Ферментативная отмока способствует сокращению длительности производственного цикла (на 6,3 %); снижению трудоемкости процесса вследствие исключения разбивки и отжима между первой и второй отмоками; уменьшению расхода воды, требуемой при отжиме и разбивке; уменьшению расхода заработной платы в связи с исключением указанных операций, расхода на ремонт, содержание оборудования и т.д. При ферментативном мягчении продолжительность производственного цикла увеличивается на 3,8%, однако уменьшается количество овчин с грубой кожевой тканью и исключаются затраты на их переделку.

При использовании ферментативной обработки хромированного мехового полуфабриката возможно увеличение продолжительности производственного цикла, однако эта обработка позволяет достичь дополнительного снижения массы и улучшения потребительских свойств меха. Так, например, при ферментативной обработке шкурок кролика улучшается качество кожевой ткани, примерно на 2 % увеличивается выход шкурок по площади. При этом снижается трудоемкость обработки (на 7,7 %) и продолжительность производственного цикла.

Большой интерес представляет использование ферментных препаратов при обработке шкурок нутрий. Кожевая ткань шкурок нутрий является очень неоднородной и обладает тонким эпидермисом, большую часть которого занимает рыхлый роговой слой, а кожевая ткань нутрий имеет различную толщину по топографическим участкам. Это препятствует получению высококачественного мехового полуфабриката. Снижения массы шкурок, повышения их мягкости и эластичности можно достичь тщательным обезжириванием, удалением неколлагеновых компонентов, уменьшением

толщины кожной ткани в хребтовой части, а также ее разрыхлением. Использование в подготовительных процессах шкур нутрии ферментных препаратов: липазы, нейтральной протеазы Г20Х, позволило существенно повысить эффективность процесса, снизить теклость волосяного покрова. В табл.20 приведены показатели, отражающие влияние расхода ферментных препаратов при обработке на эффект обезжиривания и прочность связи волоса с дермой. **Щелочные протеазы** - активность 50 000 и 100 000 ед./г, определенной по методу ФОЛП, обладают обезволашивающей способностью

Таблица 20

Показатели, характеризующие процесс отмоки обезжиривания шкур
нутрии

Расход препарата, % от массы обрабатываемого сырья	Показатели, характеризующие состояние полуфабриката	
	Содержание жировых веществ, % от массы полуфабриката	Прочность связи волоса с дермой, Н
Липаза	0	14,81
	0,3	12,47
	0,7	11,56
	1,0	11,35
Протеаза	0	14,29
	0,3	14,31
	0,7	13,95
	1,0	14,09
		Полное ослабление
		Сильное ослабление
		Обезволашивание

Применение ферментов возможно также при оксидационном крашении и отбеливании. В обоих случаях в качестве окислителей могут использоваться ферменты **оксидазы**, например *Penicillium Pido* и др, которые не должны оказывать влияния на прочность волоса и кожной ткани шкур. При разработке методики, предусматривающей использование смеси ферментных препаратов, необходимо учитывать возможность взаимной инактивации ферментов. Так, липаза инактивируется при совместном использовании с протеазой. Для достижения максимально возможного эффекта действия ферментных препаратов на компоненты дермы целесообразнее использовать последовательную обработку вначале липазой, а затем протеазой.

Ферментные препараты используют при **переработке недубленых отходов кожевенного и мехового производства**. Недубленые отходы — это краевые участки шкур, образующиеся при контурировании, сырьевая и гольевая мездра, гольевые спилки и обрезь, а также волос. Одним из главных компонентов перечисленных отходов является коллаген. Коллагенсодержащие отходы традиционно используются для производства желатины, клея, гидролизатов белков, аминокислот. Сложность переработки коллагенсодержащих отходов заключается в необходимости принудительного растворения коллагена, являющегося нерастворимым белком. Процесс получения растворимых упрощенных коллагенов складывается из предварительной обработки коллагенсодержащего сырья, направленной на разрушение надмолекулярных структур коллагена, и последующего гидротермического воздействия, приводящего к выплавлению желатины или варке клея.

Целесообразность использования тех или иных ферментных препаратов определяется состоянием структуры дермы и направлением применения получаемых препаратов коллагена. Одним из новых направлений практического использования растворенного коллагена является создание на его основе гигиенических защитных покрытий и оболочек для пищевых продуктов. В настоящее время одним из основных направлений использования коллагенсодержащих отходов является клеежелатиновое производство. Ферментативный метод применим как в случае переработки незоленых, так и золеных (гольевых) коллагенсодержащих отходов, образующихся на кожевенных заводах. Использование сырьевых отходов по общепринятой методике приводит к удлинению производственного цикла и дополнительных производственных площадей. Замена сульфидно-известковой обработки с целью обезволаживания, которая требует специального обесфидно-известковой обработки отходов ферментативной позволила интенсифицировать процесс выплавления при более низкой температуре, а также получать высокосортный клей. Известно использование нейтральных (протосубтилинов) и слабодиссоцирующих (протозимов) протеиназ, а также

пектаваморина, альфа - амилазы, пепсина и аспергилпепсина. Полного растворения коллагена можно добиться при использовании кислых протеиназ, концентрация белка в полученных при этом растворах достигает 2 %, а выход — 98 %.

Для достижения эффекта обезволаживания и необходимого разрыхления структуры дермы можно использовать ферментные препараты Протезим и Протосубтилин ГЗХ-1. Мягкое ферментативное воздействие на сырье способствует получению клея с высокой вязкостью, но для повышения количественного выхода необходим высокотемпературный (90—95 °С) режим выплавления, что приводит к выделению жира из коллагенсодержащих отходов и снижает качество клея. В этом случае ферментативная обработка приводит к разрушению в коллагене не только поперечных связей, но и продольных, и при последующем гидротермическом воздействии в раствор выходят компоненты с меньшей молекулярной массой, образующие растворы с низкой вязкостью. Двустадийный способ ферментативной подготовки коллагенсодержащего сырья к выплавлению клея заключается в том, что остаточная активность ферментов подавляется ингибиторами и повышенной температурой.

Способ ферментативной переработки мездры, с целью извлечения из нее жировых веществ, применяется в ГДР, ПНР. Таким способом получают из незоленой мездры свиных шкур и шкур крупного рогатого скота около 5 тыс. т жира в год, в том числе 2 тыс. т свиного. Применение ферментативных обработок продуктов мездрения позволяет повысить эффективность извлечения жиров по сравнению с традиционными методами до 35 % против 40—60 % и снизить температуру обработки до 55 °С против 100 °С. Повторное использование жидкостной фазы позволяет сократить расход ферментного препарата до 50 г на тонну обрабатываемого сырья. Для получения максимального количества жиров предлагается термическая обработка мездры при мягких режимах в присутствии гидролитических ферментов — протеаз, липаз. Поскольку в ней содержится 5—15 % белка, до 20 % жировых веществ (в мездре свиных шкур жировых веществ до 70 %) такая обработка приводит к образованию моно-, ди-, триглицеридов и свободных жирных кислот.

Введение протеолитических ферментов позволяет выводить белковые вещества; отрицательно влияющие на качество жирующих материалов. С повышением температуры до 45-50 °С выход моно- и диглицеридов несколько увеличивается, а выход свободных жирных кислот уменьшается. Рекомендуется проводить ферментативный гидролиз при температуре не выше 35 °С.

Очень ценным побочным продуктом кожевенного и мехового производства является волосяной покров — волос, шерсть, щетина от 3 до 10 % массы кожевенного и мехового сырья. Ферменты могут гидролизовать пептидные связи в кератине лишь после предварительного восстановления дисульфидных связей, т. е. разрушения поперечных связей между полипептидными цепями, которые обеспечивают устойчивость кератина к различным реагентам. Полимерный фрагмент кератина получают окислительным сульфито-лизом карагановых волокон с последующим ферментативным гидролизом протеиназой или проназой при pH 9 или трипсином при pH 8. Полимер имеет молекулярную массу от 1100 до 7500, содержит остатки S-сульфоцистеина. Кератиновый полимер может быть использован в качестве компонента лечебных препаратов, источника полипептидов, аминокислот.

Список литературы к главе.

1. Моисеева, Л.В., Шестакова, И.С. Изучение изменений основных компонентов шкуры под действием новых ферментных препаратов /Л.В.Моисеева, И.С.Шестакова // Сб. науч. тр. /МТИЛП.— М., 1979.— С. 42-47.
2. Миронова, Т.Ф. Ферментативное удаление щетины свиных шкур/Т.Ф.Миронова // Кожевенно-обувная пром-сть.— 1983.— №6.— С. 37-38.
3. Действие ферментов на дерму свиной шкуры / Т.Ф. Держалкж, И.С. Шестакова, И.Лорант и др. // Кожевенно-обувная пром-сть.— 1983.— №3.— С. 48-50.
4. Пучкова, Н.В. Основные требования к ферментным препаратам для обработки мехового сырья / Н.В.Пучкова, А.М.Ерошевич, Н.Н.Патенко // Кожевенно-обувная пром-сть. 1985.— №5.— С. 50-51.
5. Ерошевич, А.М. Композиция ферментных препаратов для обработки овчинно-шубного сырья /А.М.Ерошевич, Н.В.Пучкова, И.С.Шестакова //

- Кожевенно-обувная пром-сть.— 1983.— № 1.— С. 14-16.
6. Пучкова, Н.В. Исследование ферментных препаратов для отмоки овчинно-шубного сырья / Н.В.Пучкова, Е.С.Лозневая, Г.Н.Мешкова // Сб. науч. тр. / ВНИИМП.— М., 1979.— С. 3-7.
7. Ярецкас, Г.И. Влияние ферментных препаратов на некоторые характеристики кожной ткани шкурок кролика / Г.И.Ярецкас, Н.М.Шибаконская // Биотехнология.— 1985.— №5.— С. 97-100.
8. Петрук, Ю.Б. Оценка методом акустической спектроскопии изменений структуры кожной ткани шубной овчины в процессе выделки / Ю.Б. Петрук, А.М. Ерошевич, И.С. Шестакова и др. // Кожевенно-обувная пром-сть.— 1983.— № 1.— С. 36-38.
9. Комисарова, Л.А. Применение ферментных препаратов и ПАВ для мойки и обезжиривания меховой овчины / Л.А.Комисарова, И.С.Шестакова // Кожевенно-обувная пром-сть.—1984.— №9.— С. 50-52.
10. Миронова, Т.Ф. Использование ферментных препаратов в производстве кожи и меха / Т.Ф.Миронова // Кожевенно-обувная промышленность.— 1989.— № 6.— С. 31-32.
11. Карпухина, Л.И. Переработка отходов кожевенно-обувного производства / Л.И.Карпухина, А.В.Пономарев, Р.И.Чайковский.—Киев. 1983.
12. Линь, В.В. Обработка кожи и меха/ В.В. Линь—М.: Аделант,2000.— 384 с., ISBN 5 93642-002-7
13. Шестакова, И.С. Ферменты в кожевенном и меховом производстве / И.С. Шестакова, Л.В. Моисеева, Т.Ф. Миронова -М.: 1990.—124 с.
14. Мальцева, Е.П. Материаловедение текстильных и кожно-меховых материалов /Е.П. Мальцева.— М.: Легпромбытиздат, 1989.—235 с.

4. Получение ферментных препаратов

Технология микробных ферментных препаратов основывается на выборе продуцентов ферментов, способов их культивирования и получения из культур ферментных препаратов. В качестве продуцентов ферментов используются культуры представителей различных таксономических групп – бактерий, актиномицетов, микроскопических и высших базидиальных грибов. Важнейшим качеством продуцента фермента является его генетическая стабильность, которая выражается в способности сохранять на протяжении многих поколений определённый уровень биосинтеза фермента в соответствующих условиях. Генетическая стабильность присуща природным штаммам микроорганизмов, прошедшим длительный путь естественного отбора. Однако в практике чаще используют штаммы, полученные искусственной селекцией, с применением мутагенов. Такие штаммы обладают высокой изменчивостью, нестабильностью признаков. Необходима постоянная селекционная работа по поддержанию полезных признаков штаммов на определённом уровне. При этом опираются на известную корреляцию внешних, морфологических и физиолого-биохимических признаков микроорганизмов. Контроль за появлением нежелательных форм ведут как путём их визуального обнаружения при рассевах штаммов, так и с помощью серологических методов, выявляя неактивные варианты по их реакции со специфическими сыворотками.

Неустойчивость генетических признаков – причина частой смены продуцентов ферментов в условиях производства. Смена штамма влечёт за собой изменение ферментативного комплекса препаратов, физико-химических и каталитических свойств отдельных компонентов. Это может выражаться в изменении оптимальных условий действия ферментов (рН, температуры), термо- и рН-стабильности, устойчивости к действию ингибиторов и к протеолизу, способности атаковать нативный или модифицированный субстрат, соотношения продуктов реакции, предельной степени превращения субстрата.

Ферментная промышленность выпускает препараты различной степени концентрирования и очистки. Многие виды отечественных ферментных препаратов имеют названия и индексы, несущие информацию о продуценте фермента, основной активности и способе выделения препарата. Название таких препаратов состоит из двух частей: первая соответствует виду основной активности, вторая – видовому названию продуцента. Например, амилосубтилин – препарат α -амилазы из культуры *B. subtilis*, глюкаваморин – препарат глюкоамилазы из *A. awamori*, целловиридин – препарат целлюлазы из *T. viride*.

Препараты, выделенные из глубинной культуры, имеют в индексе букву “Г” (глубинный), из твёрдофазной – “П” (поверхностный). Далее следует цифровой индекс, который характеризует степень концентрирования фермента в препарате по отношению к культуральной жидкости или твёрдофазной культуре. Так, препараты с индексом ГЗХ должны иметь активность в ед./г в 3 раза выше, чем средняя активность культуральной жидкости в ед./мл. Устанавливается стандартная активность препарата, соответствующая этому соотношению. Стандартная активность, как правило, не изменяется в течение многих лет. В то же время активность продуцентов изменяется в процессе селекции, совершенствуется технология культивирования. В результате индекс концентрирования снижается по сравнению с исходным. Часто выпускают несколько сортов препарата с одним индексом и разной активностью. Каждая партия ферментного препарата сопровождается сертификатом, где указана активность. Препараты, содержащие комплекс ферментов, где важно соотношение компонентов комплекса, характеризуются по двум или более видам активности.

Наряду с препаратами, имеющими буквенно-цифровую индексацию, распространены препараты с тривиальными названиями, в которых отражены основной вид активности, величина активности, название фирмы и т.д.

Индексом ГХ обозначается неочищенная культуральная жидкость продуцента фермента. Препараты ГХ используются преимущественно на месте выработки.

Препараты с индексом ГЗХ получают путём распылительной сушки концентрированной культуральной жидкости. Концентрирование проводится методом вакуум-выпаривания при температуре, не вызывающей инактивации ферментов (обычно не выше 30 °С).

Препараты с индексом ГЗХ являются неочищенными. Они имеют высокую степень микробной обсеменённости, порядка 10^{10} спор или клеток в 1 г. Это ограничивает сферу применения.

Индекс Г10Х имеют препараты, которые получают путём распылительной сушки концентрированного фильтрата культуральной жидкости. Перед фильтрацией культуральную жидкость обрабатывают минеральными или органическими коагулянтами, что позволяет в процессе разделения фаз освободить фильтрат от биомассы микроорганизмов, балластных белков, полисахаридов, нуклеиновых соединений.

Препараты Г10Х имеют значительно более высокую чистоту, чем ГХ, ГЗХ и ГЗХ-Ф. Это выражается как в активности ферментов на 1 г препарата, так и в удельной активности на 1 мг белка. Микробная обсеменённость препаратов Г10Х регламентируется на уровне $10^4 - 10^5$ спор/г. Этот показатель зависит в основном от качества фильтрации, выдерживается далеко не всегда.

По составу ферментативного комплекса препараты Г10Х существенно отличаются от культуральной жидкости.

Препараты с индексом Г20Х получают с применением ультрафильтрации — способа концентрирования, основанного на разделении веществ различной молекулярной массы с помощью полупроницаемых мембран с определённым размером пор. Ультрафильтрации подвергают предварительно очищенные ферментные растворы, свободные от клеток микроорганизмов и взвешенных частиц.

Препараты с индексом ПХ представляют собой высушенные культуры грибов-продуцентов ферментов, полученные при твёрдофазном культивировании. Препараты ПХ сохраняют полный ферментативный комплекс продуцентов. Они неочищены и имеют высокую микробную обсеменённость. Применяются аналогично препаратам ГЗХ.

Препараты с индексом П20Х получают по схеме: экстракция ферментов из твёрдофазной культуры, стерилизующая фильтрация экстракта, ультрафильтрация, стандартизация и стабилизация ультраконцентрата, сушка его распылением. Препараты применяют аналогично Г20Х.

Имобилизованные ферменты получают путём связывания с носителями растворимых ферментов или клеток микроорганизмов, обладающих ферментативной активностью.

Имобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ перед растворимыми при проведении процессов промышленного биокатализа. Имобилизованные ферменты можно изъять из реакционной среды, что позволяет контролировать ход ферментативной реакции и многократно использовать ферментные препараты. Каталитический процесс можно проводить непрерывно, пропуская растворы субстратов через реакторы с иммобилизованными ферментами. Продукты реакции не загрязняются примесями ферментных препаратов. Имобилизованные ферменты имеют высокую операционную стабильность, а их каталитические свойства можно модифицировать, изменяя способ связывания и вид носителя.

5. Характеристика коммерческих ферментных препаратов

Целлюлазы

Целловиридин Г20Х (ТУ 9291-008-05800805-93) – комплексный препарат целлюлолитических ферментов и гемицеллюлаз из культуры *T. viride*. В состав комплекса входят: эндо-1,4-β-глюканаза, целлобиогидролаза, целлобиаза, эндо-1,3-1,4-β-глюканаза; 1,3-β-глюканаза, ксиланаза.

Препарат стандартизуется по целлюлазной активности, которая составляет по группам: 1-2000, 2-1500, 3-1000, 4-500 и 5-200 ед./г. За единицу активности целлюлазы принята способность фермента образовывать 1 мг восстанавливающих сахаров (в пересчёте на глюкозу) при действии на целлюлозу 50 мг хроматографической бумаги, при температуре 50 °С, рН 4,7, в течение 1 часа. Данная единица принята для выражения активности целловиридина, целлоконингина, целлолигнорина, целлобранина. Некоторые предприятия пользуются для определения целлюлазной активности целловиридина международным методом. Оптимальные условия действия препарата: рН 4,5—5,5, температура 50 °С. В качестве наполнителей используются поваренная соль, крахмал картофельный или кукурузный, мука кукурузная. Влажность препарата 8—15%. Партии препарата, предназначенные для применения в пивоварении, не должны содержать спор гриба-продуцента, клеток кишечной палочки, сальмонелл, других патогенных форм. Обсеменённость мезофильными аэробными микроорганизмами — не более 10^5 колоний/г.

Целлоконингин П10Х, целлолигнорин П10Х – препараты целлюлазы из культур грибов *T. koningii*, *T. lignorum*. В ферментном комплексе присутствуют эндо- и экзо-1,4-β-глюканазы, целлобиогидролаза, целлобиаза, ксиланаза. Стандартная активность целлюлазы – 50 ед./г. Оптимальные условия действия: рН 4,5—5,5, температура 50—60 °С.

Целлобранин ГЗХ – препарат целлюлазы из культуры *T. longibrachiatum*. В комплекс ферментов входят: эндо-1,4-β-глюканаза, целлобиогидролаза, целлобиаза, ксиланаза. Стандартная активность целлюлазы 50 ед./г.

Целлюлаза – 100 (ТУ_{оп} 64-13-162-90) – комплексный цитолитический ферментный препарат, выделяемый из смешанной культуры грибов *A. foetidus* и *T. viride*. Обладает активностью эндо-1,4-β-глюканазы, целлобиогидролазы, целлобиазы, эндо-1,3-1,4-β-глюканазы, 1,3-β-глюканазы, ксиланазы, полигалактуроназы, пектинэстеразы. Сопутствующие ферменты – хитиназа,

кислая протеаза. Препарат стандартизуется по целлюлазной, целлюлобиазной и пектолитической активности (табл . 21).

Таблица 21

Характеристика препарата целлюлаза – 100

Вид активности	Активность, ед./г, по группам			
	1	2	3	4
Целлюлазная	100	50	20	10
Целлюлобиазная	100	50	10	5
Пектолитическая	100	50	10	5

Примечание: активность целлюлазы и целлюлобиазы выражена в международных единицах.

За единицу целлюлазной активности принято такое количество фермента, которое, действуя на субстрат (хроматографическую бумагу) при температуре 50 °С и рН 4,8 в течение 1 мин, образует 1 микромоль восстанавливающих сахаров в пересчёте на глюкозу. Данная единица активности в 10,8 раза больше единицы, принятой для выражения активности целловиридина.

За единицу целлюлобиазной активности принимают активность такого количества фермента, которое приводит к гидролизу 1 микромоля целлюлобиазы или к образованию 2 микромолей глюкозы за 1 мин, при инкубации с раствором целлюлобиазы концентрации 0,002 М в ацетатном буфере концентрации 0,05 М и рН 4,5, при температуре 40 °С.

Целлюсофт L является продуктом микробиологического синтеза микроорганизма *Bacillus* и имеет стандартную активность 750 ед./г белка (паспорт 1999-08-19 соответствующий Директиве ЕЕС 91/155/ЕЕС с дополнениями и рекомендованный “Ассоциацией производителей ферментационных энзимных продуктов (АМФТР), фирмы Novozymes, Дания). Препарат представляет собой жидкость бурого цвета со слабым запахом брожения, содержащий целлюлазу. Оптимум действия: рН 4,5-5,5, температура 40-55 °С. Код препарата по IUB – 3.2.1.4., код по CAS- 9012-54-8, код EINTCS – 232-734-4. (рис. 34).

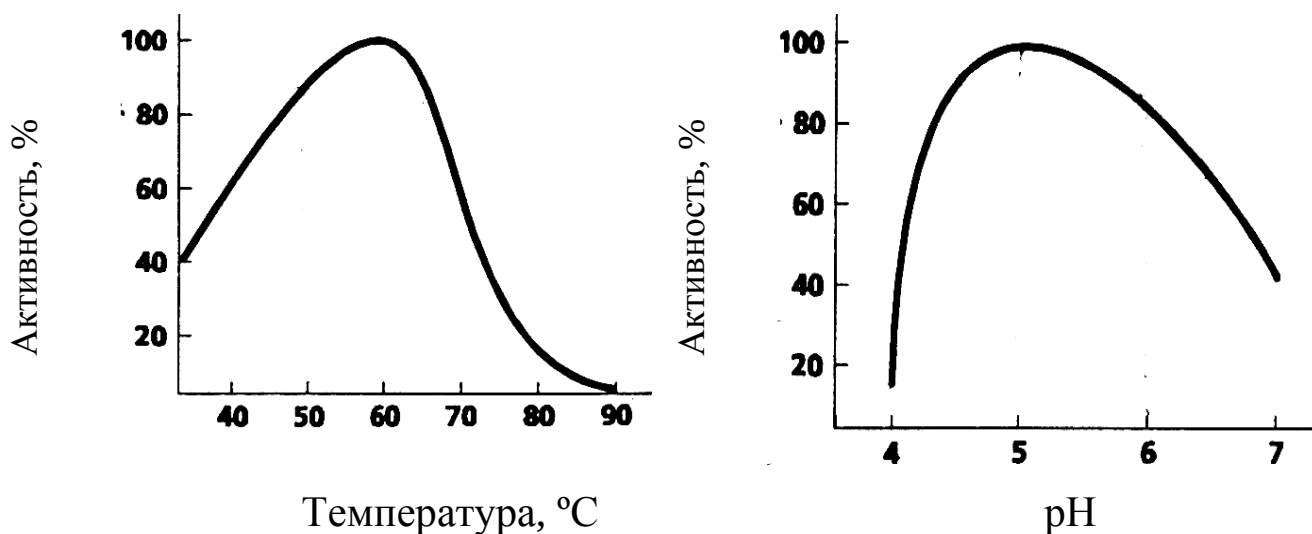


Рис.34. Активность препарата Целлюсофт в зависимости от pH и температуры раствора.

Cellusoft L 150ECU/g является непродуктивным продуктом, предназначенным только для технических применений. Условия применения: модуль 5:1 – 25:1, 1-3 % от массы материала (для хлопка и вискозы), 0,2-0,8 % (для льна), 3-4 % (для lyocell, вискозных штапельных тканей), pH 5,0-6,0, температура 45–60 °C, длительность процесса 47-75 минут.

Керазим – целлюлаза, продукт генетически модифицированного *Aspergillus*, производится в гранулированной и жидкой формах (рис.35).

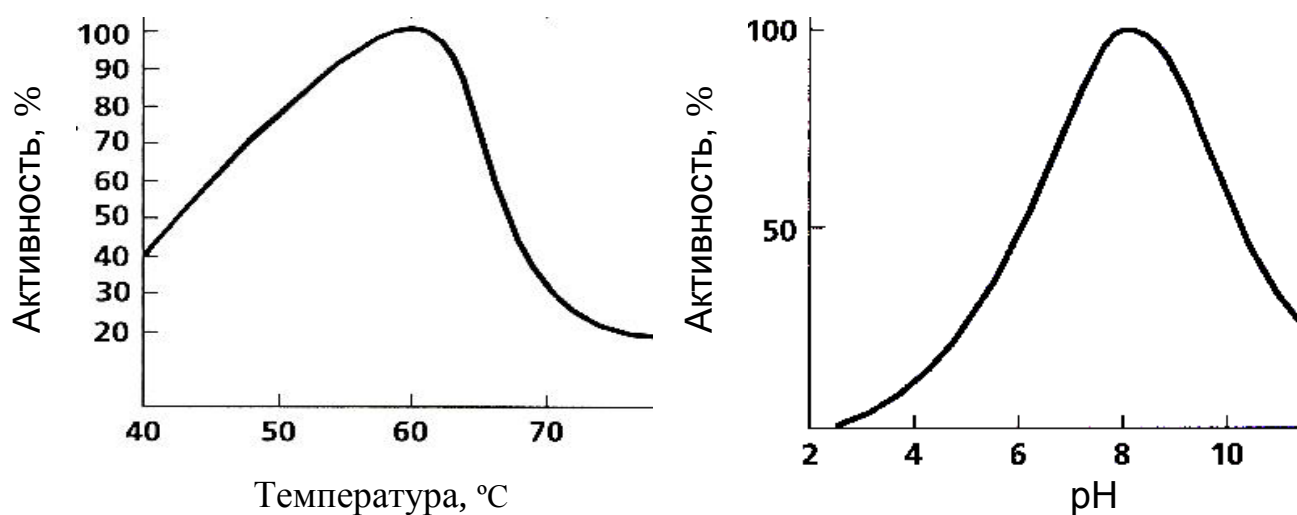


Рис. 35. Активность Керазима при различных температурах и pH среды

Пектиназы

За единицу пектолитической активности принято количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 г пектина до продуктов, не осаждаемых сернокислым цинком при проведении гидролиза в стандартных условиях (температура 30 °С, рН 4, длительность гидролиза 1ч) и степени расщепления субстрата 30 % (ГОСТ 20264.3 – 81). Оптимальные условия действия целлюлазы: рН 4,8, температура 50 °С. Рабочая зона: 3,5-6,5, температура 40-50°С. Препарат стандартизуют поваренной солью, кукурузной мукой. Влажность препарата с солью – не более 8 %, с мукой – не более 15 %.

Ксилаком (ксилоглюконофетидин П10Х; ТУ_{оп} 798-1-92) – препарат цитолитических ферментов из твёрдофазной культуры *A. foetidus*. Препарат обладает активностью ксиланазы, полигалактуроназы, пектинэстеразы, эндо-1,4-β-глюканазы, целлобиазы, кислой протеазы, хитиназы, β-глюкозидазы. Стандартизуется по ксилазной активности, которая составляет по группам: 1-2000, 2-3000, 3-5000 ед/г.

За единицу ксиланазной активности принимается такое количество фермента, при действии которого на субстрат ячменного ксилана за 1ч в условиях опыта образуется 1 мг редуцирующих углеводов в пересчёте на ксилозу.

Оптимальные условия действия ксилакома: рН 4,5-5,0, температура 45-50 °С. Препарат стандартизуют поваренной солью, кукурузной мукой. Влажность препарата 13-15 % . Обсеменённость спорами гриба – не более 10² спор/г, бактериальная обсеменённость – не более 10⁵ колоний/г.

β-Глюканаза Г10Х – препарат 1,3-1,4-β-глюканазы из культуры *B. subtilis* Т – 86. Сопутствующий фермент — α-амилаза. Стандартная активность β-глюканазы 600 ед/г. За единицу β-глюканазной активности принято количество фермента, способное образовать из β-глюкана (лихенина) за 1 мин при 30 °С такое количество олигосахаридов, которое по восстанавливающей способности соответствует 1 микромолю глюкозы. Препарат проявляет максимальную активность при рН 6,5 и температуре 50 °С, стабилен при рН 3,5-8,0.

В - Маннаназ Г10Х – препарат эндо1,4-β -маннаназы из культуры *V. subtilis* G-78. Стандартная активность маннаназы в препарате 300 ед/г. За единицу β - маннаназной активности принято такое количество фермента, которое за 1 мин при 30 °С и рН 5,8, воздействуя на субстрат – окрашенный галактоманнан из семян акации (карабан)— приводит к увеличению оптической при длине волны 490 нм. Препарат проявляет максимальную активность при рН 5,6-6,0 и температуре 50 °С, стабилен при рН 4-8.

Пектаваморин П10Х и Г10Х (ГОСТ 18920 –73) – препараты пекталитических ферментов и кислой протеазы из культуры гриба *A. awamori*. Ферментный комплекс включает: эндо- и экзо-полигалактуроназу, пектинэстеразу, ксиланазу, кислую протеазу, β-глюканазу (табл.22).

Таблица 22

Характеристика препарата пектаваморина П10Х

Вид активности	Активность, ед/г, по группам			
	1	2	3	4
Пектолитическая (ПкС)	36	27	18	9
Пектинэстеразная	70	40	20	8
Полигалактуроназная	450	330	240	120
Протеолитическая при рН 2,5	12	9	6	3

Общая пектолитическая активность (ПкС) выражена в тех же единицах, что и для препарата целлюлазы. За единицу пектинэстеразной активности принято количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 микроэквивалента сложноэфирных связей в молекуле пектина за 1 мин при 30 °С. За единицу полигалактуроназной активности принято количество фермента, которое в условиях определения, при 30 °С, катализирует гидролиз 1 микроэквивалента гликозидных связей в молекуле пектовой кислоты за 1 мин. За единицу протеолитической активности принята способность фермента превращать за 1 мин при температуре 30 °С казеинат натрия в неосаждаемые трихлоруксусной кислотой продукты в количестве, соответствующем 1 микромолю тирозина. В препарате Пектаваморине Г10Х активность пектолитических ферментов по группам соответствует табл. 23. Активность

кислой протеазы не регламентируется. Оптимальные условия действия препаратов: pH 2,5-5,0, температура 45-52 °С. Влажность препаратов не более 13%, конидии грибов не должны присутствовать.

Пектофоедин П10Х (ТУ 64-13-04-87) имеет ферментативный комплекс, сходный с пектавамоорином (табл.23).

Таблица 23

Характеристика препарата пектофоедина П10Х

Вид активности	Активность, ед/г, по группам		
	1	2	3
Пектолитическая (ПкС)	100	36	9
Полигалактуроназная	1500	570	160
Пектинэстеразная	80	60	7
Протеолитическая при pH 2,5	10	3	1

Оптимальные условия действия для пектолитических ферментов: pH 3,5-4,5, температура 35-45 °С, для кислой протеазы pH 2,5-4,0. В качестве наполнителей используются: кизельгур, перлит – в партиях, предназначенных для виноделия и консервной промышленности, поваренная соль, мука кукурузная или иная – в препаратах для животноводства. Влажность препаратов не более 15 %. Бактериальная обсеменённость не более 10⁵ колоний/г, споры гриба - продуцента не должны обнаруживаться.

Пектофоедин Г20Х (ТУ 9291-007-05800805-93) – препарат из глубинной культуры *A. foetidus*. Стандартизуется по общей пектолитической активности (ПкС), которая составляет по группам: 1-200, 2-150, 3-100, 4-18 ед./г. Оптимальные условия действия: pH 3,8-4,0. температура 35-37 °С. Препарат стандартизуют добавлением кизельгура, поваренной соли, кукурузной муки, в зависимости от целевого назначения. Споры продуцента в препарате должны отсутствовать.

Мацеробациллин ГЗХ, мацерин Г10Х (ТУ 59.01.003.84-85) – препараты из культуры *B. circulans*, обладающие активностью пектаттрансэлиминазы (ПТЭ) и экзополигалактуроназы. Стандартная активность ПТЭ составляет 1000 ед./г.

За единицу ПТЭ - активности принято такое количество фермента, которое за 1ч при температуре 40 °С вызывает образование ненасыщенных продуктов расщепления пектина, увеличивающих оптическую плотность реакционной смеси на 0,1 при длине волны 230-235 нм, в стандартных условиях реакции. Оптимальные условия действия препаратов: рН 6,5-7,5, температура 35-40 °С. Препараты стабилизируются поваренной солью.

Эндополигалактуроназа Г10Х – препарат из культуры дрожжей *Zygofabospora marxiana* ВКМ У-848. Стандартная активность – 100000 ед/г. За единицу эндополигалактуроназной активности принято такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1г свежесваренного пектина со снижением вязкости раствора на 30 % за 1 мин при 30 °С. Оптимальные условия действия: рН 5,0-5,2, температура 45-50 °С, зона стабильности рН 3 -6.

Амилазы

Амилосубтилин ГЗХ, Г10Х – препараты α -амилазы из культуры *B. subtilis*. Сопутствующие ферменты – эндо-1,3-1,4- β -глюканаза, нейтральная металлопротеаза.

Таблица 24

Характеристика препарата Амилосубтилина ГЗХ

Показатель	Группы препарата	
	1	2
Амилолитическая активность, ед./г	1000,0	600,0
Протеолитическая активность при рН 7,2, не менее, ед./г	5,0	4,6
Поваренная соль, не более, %	-	50,0

Амилосубтилин ГЗХ (ГОСТ 23635-90) стандартизуется по амилолитической и протеолитической активности (табл.24). Амилосубтилин Г10Х имеет стандартную амилолитическую активность 3000 ед/г. За единицу амилолитической активности принята способность фермента катализировать в стандартных условиях расщепление до декстринов различной молекулярной массы 1г крахмала, что составляет 30 % крахмала, введенного в реакцию. Оптимальные условия действия: рН 5,4-6,2, температура 55-70 °С.

Стабилизаторы – ионы кальция и других щёлочноземельных металлов. Ингибиторы – хелаты, тяжёлые металлы. В качестве наполнителей используют поваренную соль, кукурузную муку, мел. Влажность препарата ГЗХ – не более 8 %, Г10Х – не более 13 %.

Амилосубтилин ГХ (Тр 10-04-03-6-86, Москва 1988). Продуцентом Амилосубтилина ГХ является *Bac.subtilis*-82. Данный штамм получен селекционным путем во ВНИИПрБ и относится к группе *Bac. subtilis-mesentericus* – мелкие подвижные палочки размером 7 мкм, одиночные или соединенные по 2-3 клетки. Бактерии окрашиваются разбавленным раствором метиленовой сини или нейтрального красного. Оптимальная температура роста для биосинтеза α -амилазы 35 °С. Патогенными и токсичными свойствами культура и продукты ее метаболизма не обладают. Продуцируемый фермент содержится в фильтрате культуральной жидкости. Амилолитическая активность - 100 ед/мл (ГОСТ 20264.4-74). Фильтрат культуральной жидкости и ее ультраконденсат обладают резким специфическим запахом, имеют коричневый цвет. Оптимальная температура для действия фермента 65 °С. Амилосубтилин ГХ стабилен при 65 °С в течение 1 часа. Для действия α -амилазы оптимальное значение величины рН субстрата находится в пределах 5,5-6,0. При сохранении ферментных препаратов в стерильных условиях при температуре 12-15 °С не наблюдается снижения активности в течение 5 суток.

Амилоризин П10Х – препарат α -амилазы из культуры *A. oryzae*. Обладает также активностью протеазы, β -глюканазы, ксиланазы. Стандартизуется по трём видам активности. За единицу осахаривающей активности принята способность фермента катализировать за 1 мин при определённых температуре и рН расщепление 1 микромоля глюкозидных связей в растворимом крахмале, с образованием восстанавливающих сахаров. Оптимальные условия действия препарата: рН 4,7, температура 45-55 °С. Стабилизаторы – соли кальция, ингибиторы – хелаты, тяжёлые металлы. Обсеменённость препарата ограничивается величиной 10^5 колоний/г (табл.25).

Характеристика препарата амилозирина П10Х

Вид активности	Активность, ед/г, по группам	
	1	2
Амилолитическая при pH 4,7	2500	2000
Протеолитическая при pH 5,5, не менее	45	30
Осахаривающая, не менее	12500	10000

Глюкоамилаза очищенная, глюкавоморин (ТУ 59.01.003.65-83) – препарат глюкоамилазы из культуры гриба *A. awamori*. Сопутствующие ферменты — β -глюканаза, α -амилаза, протеаза, ксиланаза. За единицу глюкоамилазной активности принята способность фермента катализировать гидролиз растворимого крахмала, высвобождая за 1 мин 1 микромоль глюкозы в стандартных условиях (температура 30 °С, pH среды оптимальный, продолжительность реакции 10 мин) (табл.26).

Таблица 26

Характеристика препарата глюкоамилазы очищенной.

Вид активности	Группы	
	1	2
Глюкоамилазная, ед/г	2000	1000
Амилолитическая при pH 4,7, ед/г	30	15
Протеолитическая при pH 5,5, не более	15	10
Глюкозилтрансферазная, % олигосахаридов, не более	6	6

В препарате ограничивается глюкозилтрансферазная активность: доля побочных продуктов реакции – олигосахаридов – не должна превышать 6 %, что гарантирует превращение крахмала в глюкозу на 94 %. Оптимальные условия действия для фермента глюкоамилазы: pH 4,0, температура 65 °С. Препарат стабилен при pH 3-5, температуре не выше 60 °С. Выпускается также жидкая форма глюкоамилазы с индексом ЖГ20Х, имеющая стандартную активность 1000 ед/г. препарат содержит в качестве стабилизатора бензойную кислоту (0,01 %), что предотвращает развитие инфекции.

Optisuze Ht 260 — термоустойчивая бактериальная альфа - амилаза, активность: 65,000 TTAU/g, коричневая жидкость, , удельный вес 1,1, оптимальный pH 6,0-

8,0. Жесткая вода и поваренная соль увеличивают стабильность этого фермента, можно использовать совместно с неионными поверхностно-активными веществами (рис. 36, 37).

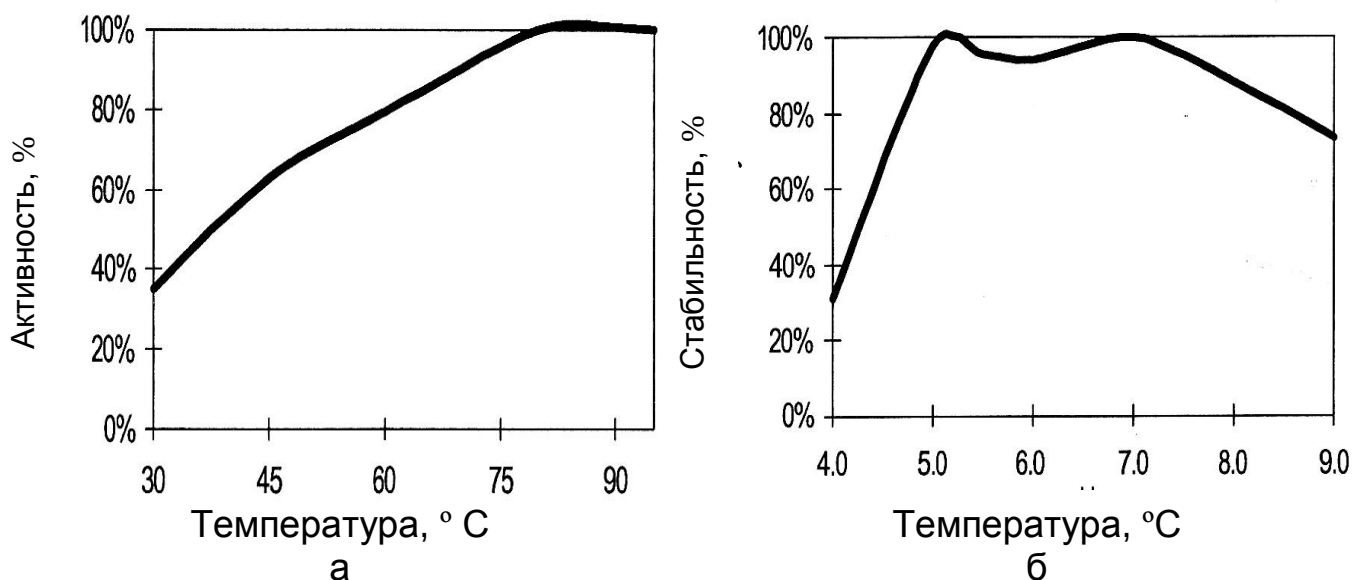


Рис.36. Влияние температуры и (а) и pH (б) на относительную активность Optisize HT 260.

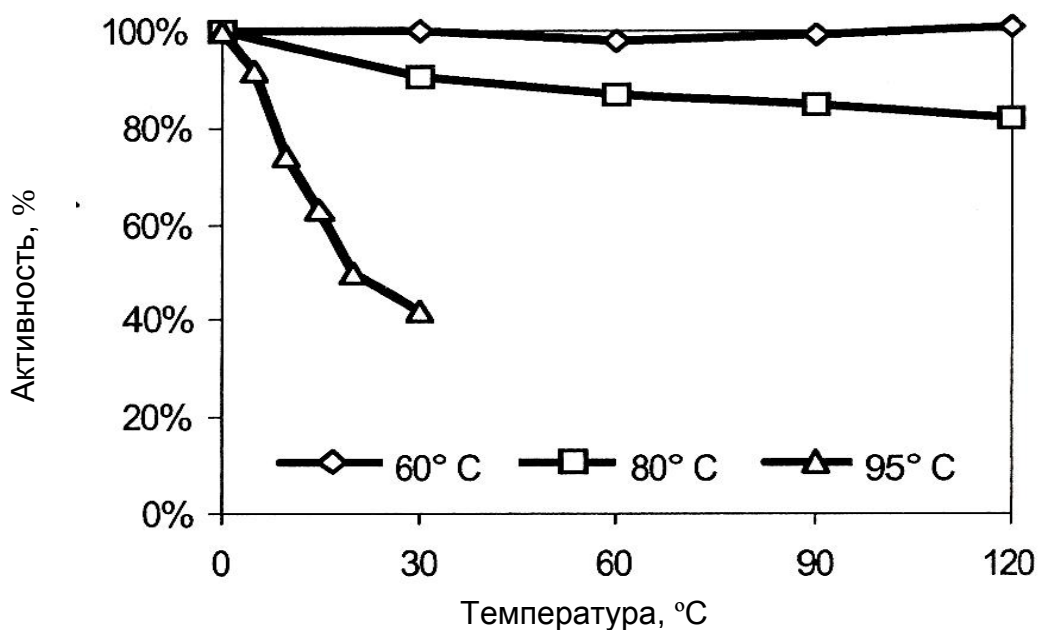


Рис. 37. Термостабильность препарата Optisize HT 260 .

Аквазим 240L, является продуктом микробиологического синтеза микроорганизма *Bacillus* и имеет стандартную активность 240 ед/г белка (паспорт 1999-08-19, соответствующий Директиве ЕЕС 91/155/ЕЕС с дополнениями и рекомендованный “Ассоциацией производителей ферментационных энзимных продуктов (АМФТР) фирмы Novo Nordisk, Дания).

Препарат представляет собой жидкость бурого цвета энзимного протеина, содержащий α -амилазу. Оптимум действия: pH 5,5-7, температура 30-70 °C. Код препарат по IUB – 3.2.1.1., код по CAS- 9000-90-2, код EINTCS – 232-565-6.

Термамил 120L представляет собой прозрачную бурую жидкость со слабым запахом брожения. α -амилаза, продуцент генетически модифицированной культуры *Bacillus*, с стандартной активностью 120 ед/г белка (паспорт 1999-08-19, соответствующий Директиве ЕЕС 91/155/ЕЕС с дополнениями и рекомендованный “Ассоциацией производителей ферментационных энзимных продуктов (AMFTR) фирмы Новозайм, Дания). Оптимум действия: pH 6-7, температура 90 °C (рис.38).

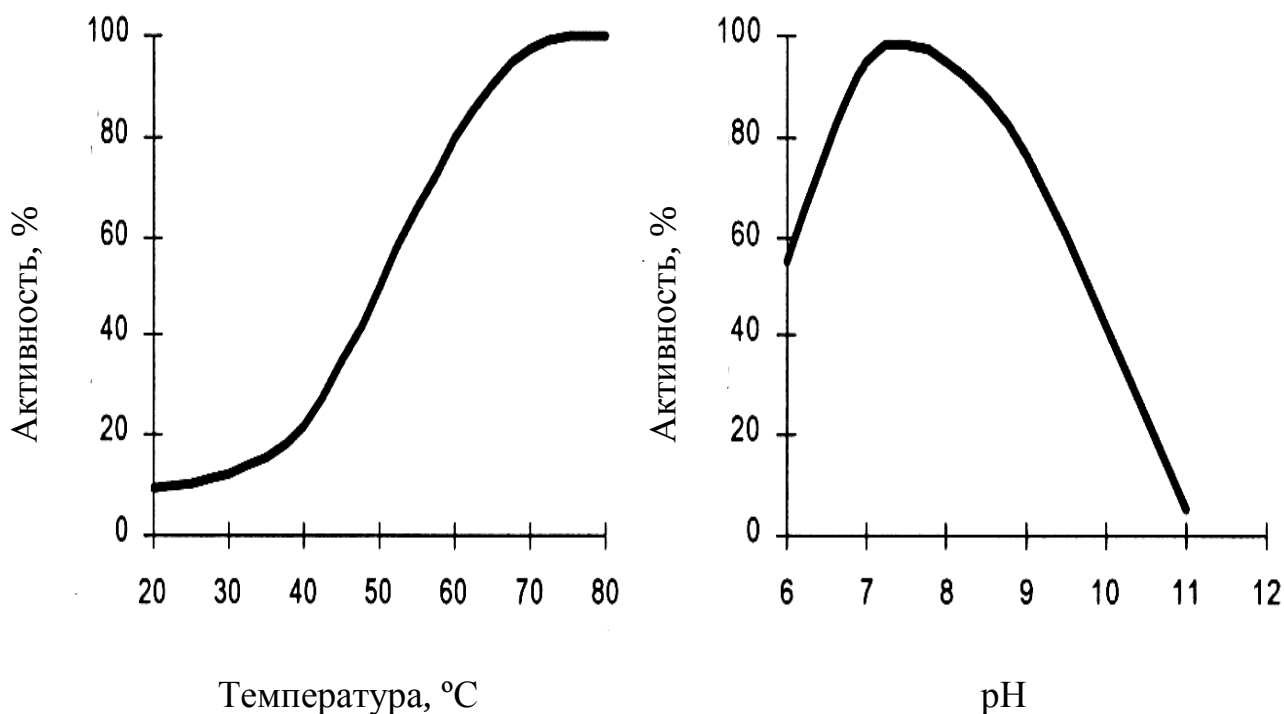


Рис 38. Активность Термамила в зависимости от температуры и pH раствора

Зимаджунт НТ-340С+ (ООО Русфермент) — кислотоустойчивая термостабильная бактериальная альфа-амилаза, полученная путем глубинного культивирования штамма бактерий *Bac.licheniformis*. Фермент гидролизует внутренние 1,4 гликозидные связи крахмала, гликогена. Активность препарата составляет 600 ед АС/см³, а при 87-90 °C - 2630 АС/см³ (ГОСТ 20264.4-89) (рис. 39).

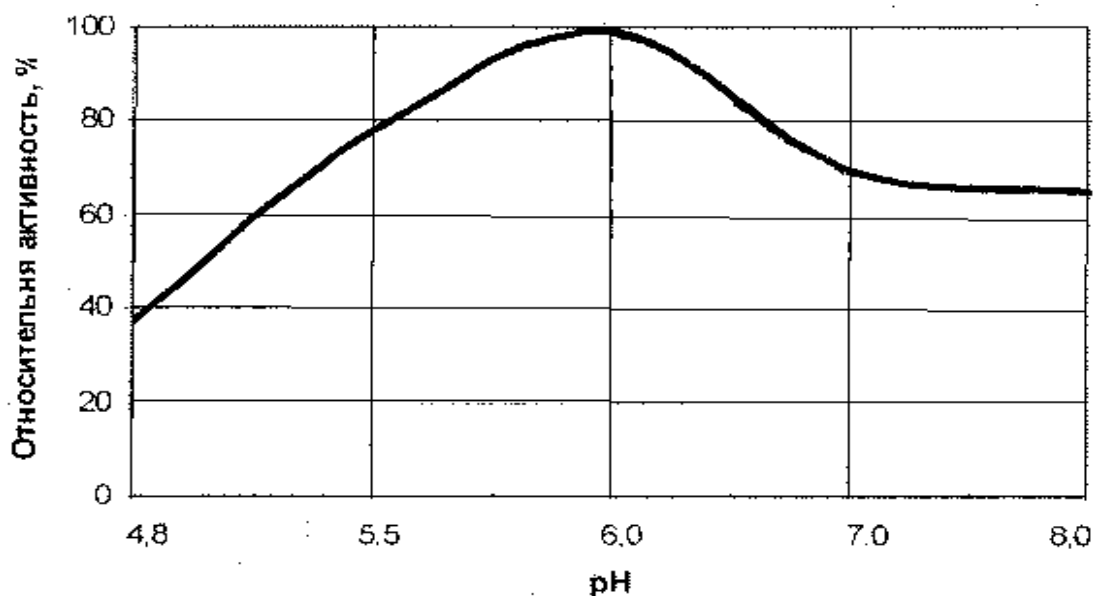


Рис.39. Влияние pH на активность препарата **Зимаджунт НТ-340 С+**

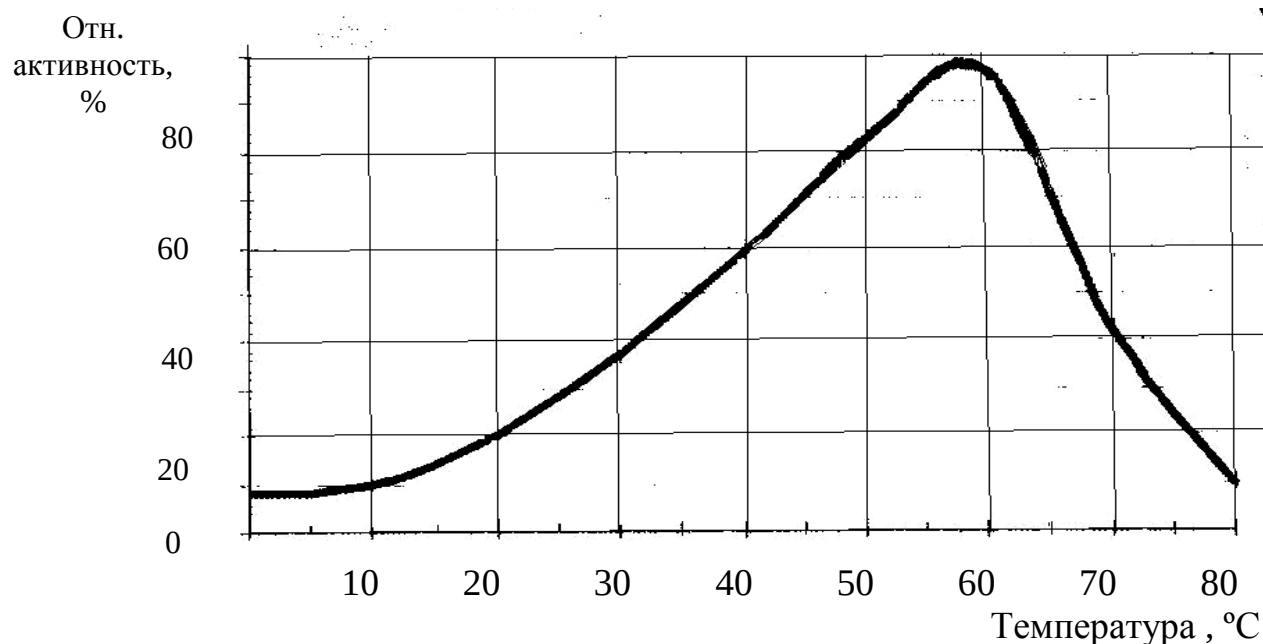


Рис.40. Температурный оптимум относительной активности Амилазы НТ.

Амилаза НТ 4000 – препарат мезофильной бактериальной альфа-амилазы (1-4 α -D-глюкан-глюкогидролаза, классификация — 3.2.1.3), pH оптимум действия 4,5-6,5. Является аналогом препарата Ликвамил 1200 (рис. 40). Физические свойства: удельный вес 1,0-1,2.

Ликвамил 1200 — бактериальная альфа-амилаза, полученная путем глубинного культивирования штамма бактерий *Bac.sub.origin*. Фермент

вызывает гидролиз внутренних 1,4 гликозидных связей крахмала. Основная активность препарата при 30 °С (ГОСТ 202664.4-89) составляет 2500 ед АС/см³, а при 60 °С — 5300 ед АС/см³. Оптимальные условия действия : рН 6,0, температура 60-65 °С, рабочие заны : рН 5,5-8,0, температура 45-65 °С. (рис.41).

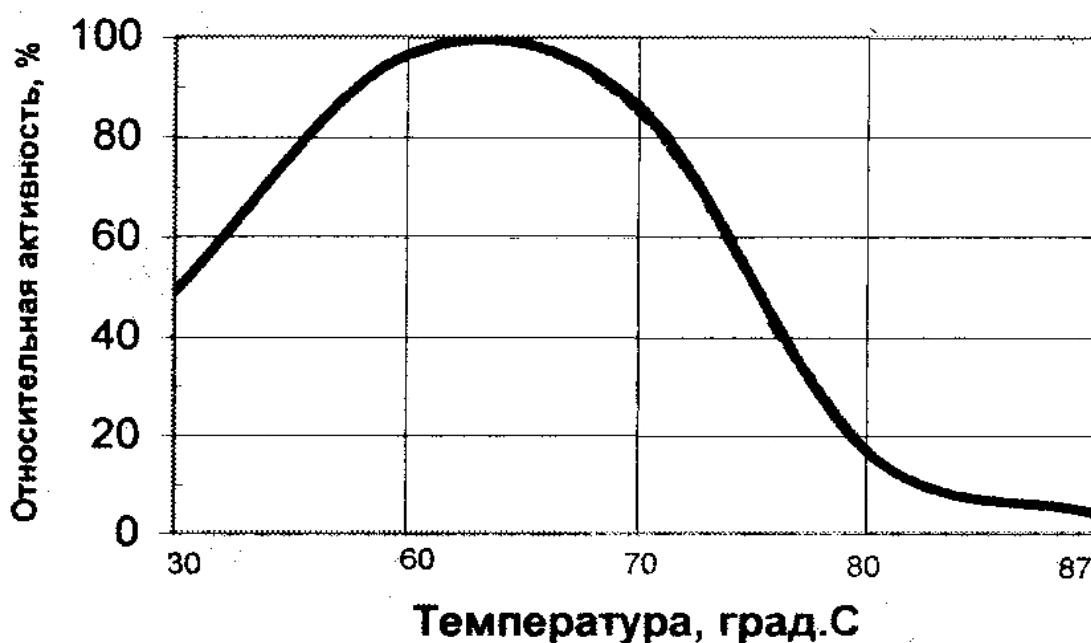


Рис.41 Влияние температуры на активность препарата Ликвамил 1200

Протеазы

Протосубстилин ГЗХ, Г10Х — препараты нейтральной бактериальной металлопротеазы из культуры *B. subtilis*. Сопутствующие ферменты: эндо-1,3-1,4-β-глюканаза, ксиланаза, α-амилаза. Стандартная активность протеазы в препарате Г10Х по группам: 1-230, 2-180, 3-90, 4-70 ед/г. Препарат ГЗХ выпускают с активностью 70 и 100 ед/г. Оптимальные условия действия: рН 7,0-7,5, температура 50 °С. Стабилизаторы — ионы цинка и кальция, ингибиторы — хелаты, тяжёлые металлы.

Кислая протеаза Г10Х — препарат кислой протеазы из культуры гриба *A. foetidus*. Стандартная активность — 30 ед/г. Оптимальные условия действия: рН 2,5-3,0, температура 50 °С. Зона стабильности — рН 2,5-6,0.

Савиназа 16L, тип EX – водный энзимный препарат протеазы является продуцентом микроорганизма *Bacillus subtilis*. Имеет код IUB: 3.4.21.62; код CAS: 9014-01-1; код EINECS; 232-752-2. Стандартная активность липазы 250000 ед/г. Оптимальные условия действия: pH=6-9; температура 30-55 °С (рис. 42.)

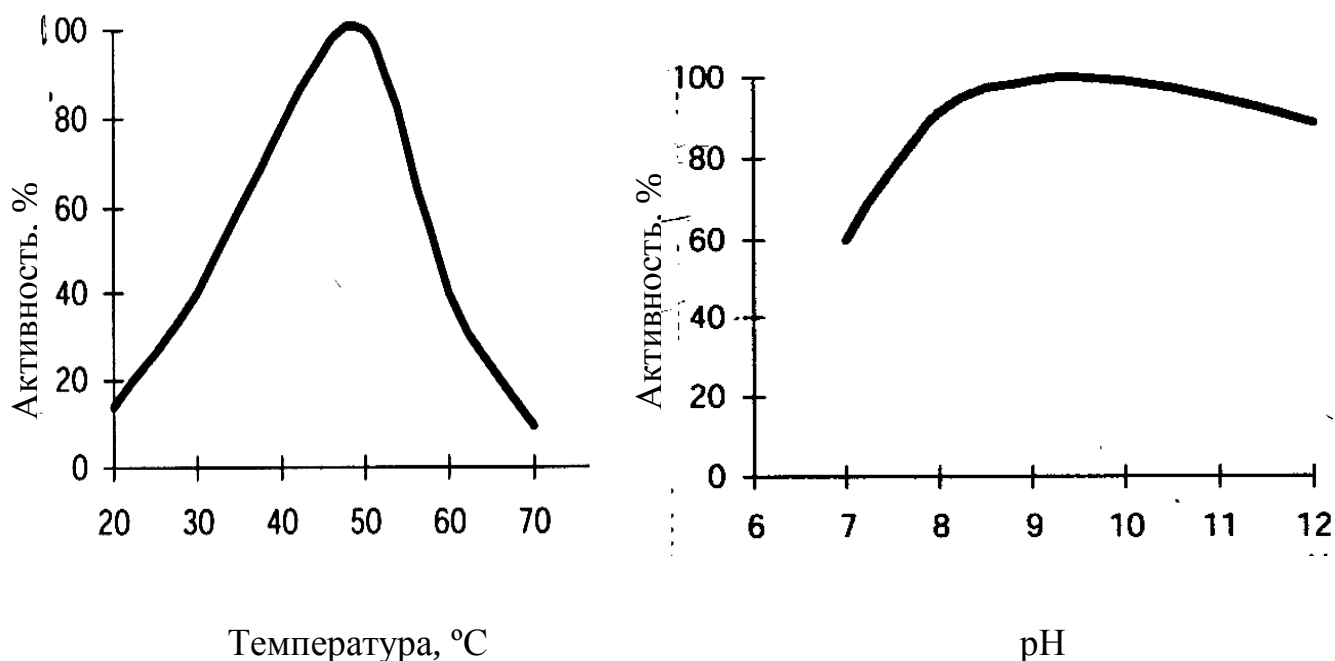


Рис. 42. Температурный и pH профиль активности протеолитического фермента препарата Савиназа (Novozymes)

Щелочная протеаза представляет собой гранулы размером 0,2-1,0 мм светло-серого или светло-бежевого цвета. Протеолитическая активность препарата 50000 и 100000 ед/г. Соответствует ТУ 64-13-19-89. Протосубтилин – порошок светло-бежевого или светло-коричневого цвета. Протеолитическая активность 77,0 ед/г;

Максазим NNP – бактериальная нейтральная протеаза, полученная контролируемой ферментацией классического селекционированного штамма бактерий *Bacillus* sp. Содержит нейтральную и щелочную протеиназы. Протеолитическая активность 6000 ед ПС/см³ (по ГОСТ 20264.2-88). Рабочие зоны: pH 5,5-7,0, температура 40-70 °С. (Рис.43).

а

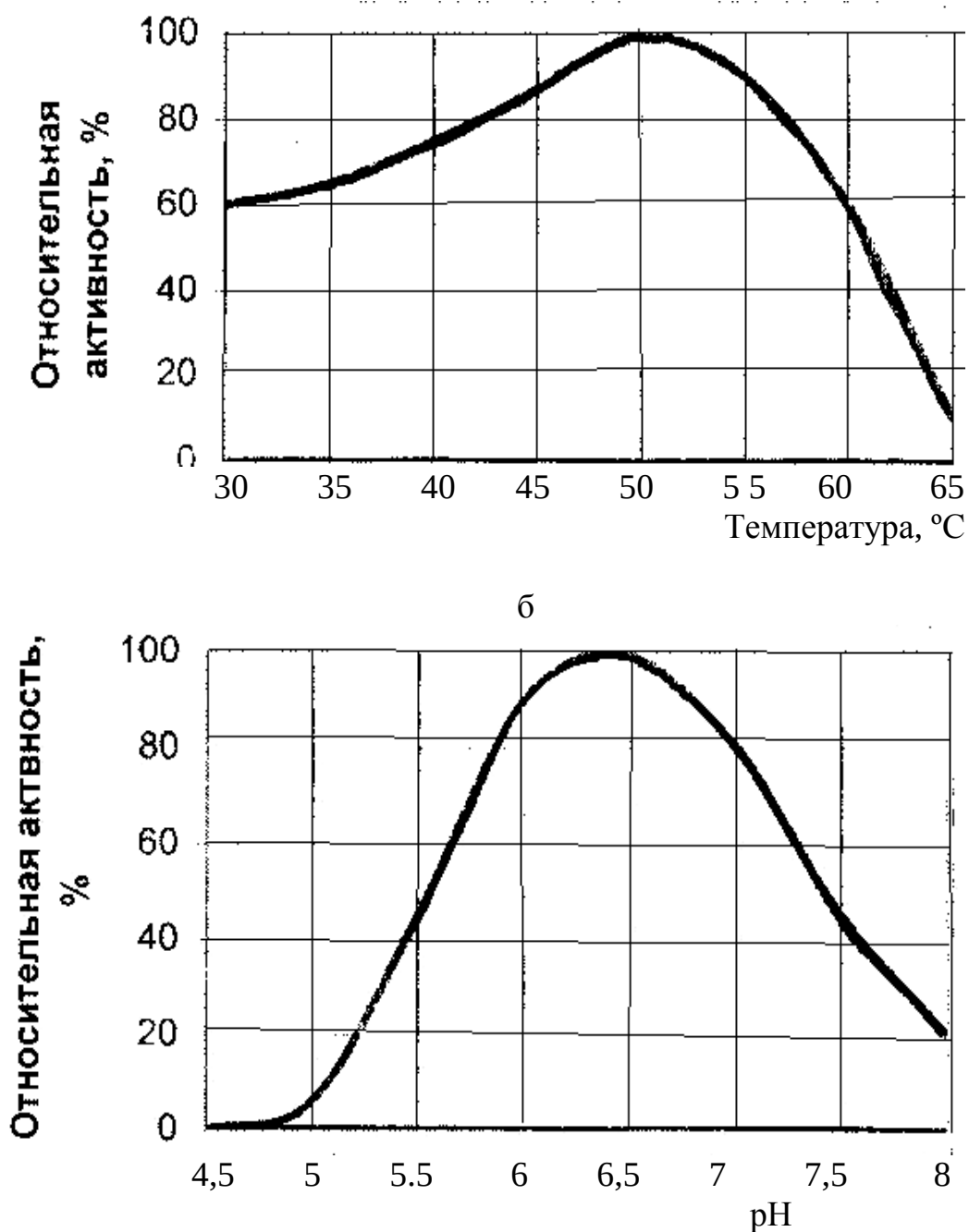


Рис. 43. Влияние температуры (а) и pH раствора (б) на активность препарата **Максазим NNP**

Алкалаза 2,5L, тип DX – водный препарат энзима-протеазы, является продуцентом микроорганизма *Bacillus subtilis*. Имеет код IUB: 3.4.21.62; код CAS: 9014-01-1; код EINECS: 232-752-2. Оптимальные условия действия: pH=7-9, температура 40-60°C. Допустимый предел воздействия 0,00006 мг/м³ (в пересчете на 100 % чистую протеазу).

Эверлаза 16L, тип DX - водный энзимный препарат протеазы является продуцентом микроорганизма *Bacillus subtilis*. Имеет код IUB: 3.4.21.62; код CAS: 9014-01-1; код EINECS; 232-752-2. Стандартная активность липазы 250000 ед/г. Оптимальные условия действия: pH=6-9; температура 30-55⁰С.

Липазы:

Липолаза 100L, тип EX – водный энзимный препарат липазы из глубинной культуры гриба *Aspergillus oryzae*. Имеет код IUB: 3.1.1.3; код CAS: 9001-62-1; код EINECS; 232-619-9. Стандартная активность липазы 250000 ед/г. Оптимальные условия действия: pH=6-9; температура 30-55⁰С. (рис. 44).

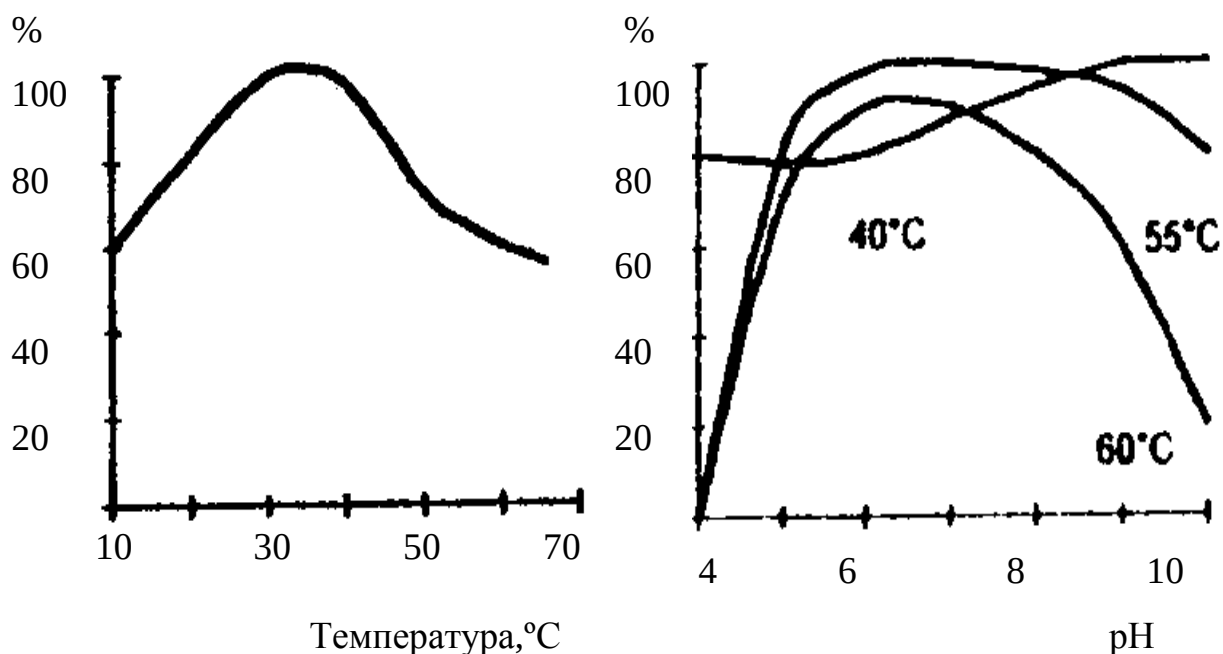


Рис.44. Изменение активности ферментного препарата Липолаза от температуры и pH раствора.

Новозим 735 — водный энзимный препарат липазы из глубинной культуры гриба *Aspergillus oryzae*. Имеет код IUB: 3.1.1.3; код CAS: 9001-62-1; код EINECS; 232-619-9. Стандартная активность липазы 250000 ед/г. Оптимальные условия действия: pH 6-9; температура 30-55⁰С. Препарат классифицирован как “нетоксичный” и “неопасный” для окружающей среды, 100 % биоразложимы.

Липоризин ГЗХ – препарат из глубинной культуры гриба *A. oryzae*. Стандартная активность липазы – 250000 ед/г. За единицу активности липазы принимается такое количество фермента, которое способно высвободить 1 микромоль олеиновой кислоты из 40 % эмульсии оливкового масла при рН 7 и температуре 37 °С в течение 1ч. Оптимальные условия действия препарата: рН 6-7, температура 37 °С.

Липоаэрузин ГЗХ, Г20Х – препараты липазы из культуры бактерии *P. aeruginosa*. Стандартная активность препарата ГЗХ – 75000, Г20Х – 100000 ед/г. Оптимальные условия действия: рН 7,0-9,5, температура 45-50 °С. Зона рН – стабильности: ГЗХ – 6-12; Г20Х – 7-10. Стабилизаторы – соли кальция, ингибиторы – соли цинка и марганца.

Мультиэнзимные композиции

Мультиэнзимная композиция амилопротосубстилин состоит из амилосубстилина ГЗХФ и протосубстилина ГЗХФ. Стандартизуется по трём видам активности. В стандартном препарате активность α -амилазы 600 ед/г, нейтральной протеазы 50 ед/г, β -глюканазы 300-400 ед/г. Оптимальные условия действия: рН 5,5-6,5, температура 50-70 °С.

Пуриветин ("Биосинтез", Литва) представляет собой многокомпонентный ферментный препарат целлюлозолитического действия. В состав препарата входят целлюлаза, глюканаза, гликозидаза, амилаза и другие ферменты, действующие преимущественно на внутренние связи макромолекулы целлюлозы корма. Кроме многокомпонентного целлюлазного комплекса в состав пуриветина входят метаболиты рибоксин и метилурацил. Активным началом рибоксина является инозин, представляющий собой нуклеозид, включающий пуриновое основание гипоксантин, являющийся метаболитом пуринового обмена в организме животных. Метилурацил является производным пуримина, обладает анаболической активностью.

Мультиэнзимная композиция МЭК – 1 (ТУ 56 10.18-08-87).

В состав МЭК – 1 входят ферментные препараты в следующих процентных долях: β -глюканаза Г10Х с активностью 600 ед/г – 50; β -маннаназа

Г10Х с активностью 300 ед/г – 3,4; кислая протеаза Г10Х с активностью 30 ед/г – 3,4; эндополигалактуроназа Г10Х с активностью 100000 ед/г – 0,9. Остальные 43% массы препарата составляет наполнитель – поваренная соль.(табл. 26).

Таблица 26.

Характеристика препарата МЭК – 1.

Фермент	Активность, ед/г МЭК	Оптимум действия		рН – зона стабильно сти
		рН	Температура	
β-глюканаза	300	6,5	50	3,5-8,0
β-маннаназа	10	5,6-6,0	50	4,0-8,0
Кислая протеаза	1	2,5-3,0	50	2,5-6,0
Эндополигалактуроназа.	900	5,0-5,2	45-50	3,0-6,0

Вильзим- ("Биосинтез". Литва) - представляет собой мультиэнзимную композицию, предназначенную для использования в комбикормах и рационах птицы. Препарат получен в процессе глубинного выращивания определенных штаммов бактерий и грибов и содержит бета-глюканазу, целлюлазу, протеазу, амилазу, ксиланазу, фитазу и др. В 1 г порошка светло-коричневого цвета в среднем содержится не менее 100 ед. амилазной активности, 2 ед. протеолитической, 100 ед. бета-глюказной, 10 ед. целлюлазной и не менее 500 ед. фитазной активности. Вильзим производит АО в Литве.

Мультиэнзимная композиция МЭК-СХ-2 представляет собой активную систему гидролитического действия. Ее получают путем смешивания стандартного препарата целловиридина Г20Х и стандартного препарата амилосубтилина ГЗХ в соотношениях, обеспечивающих ксиланазную активность 70 и 35 ед/г, бета-глюканазную -250 и 130 ед/г, целлюлолитическую-200 и 100 ед/г для 1 и 2 групп соответственно. Оба препарата представляют собой однородный мелкий порошок светло-желтого, светло-серого или светло-коричневого цвета (в зависимости от наполнителя), совместимы с ингредиентами, входящими в состав премикса, БВД и комбикормов. Их

промышленное производство организовано на Омутнинском биохимическом заводе (Кировская обл.).

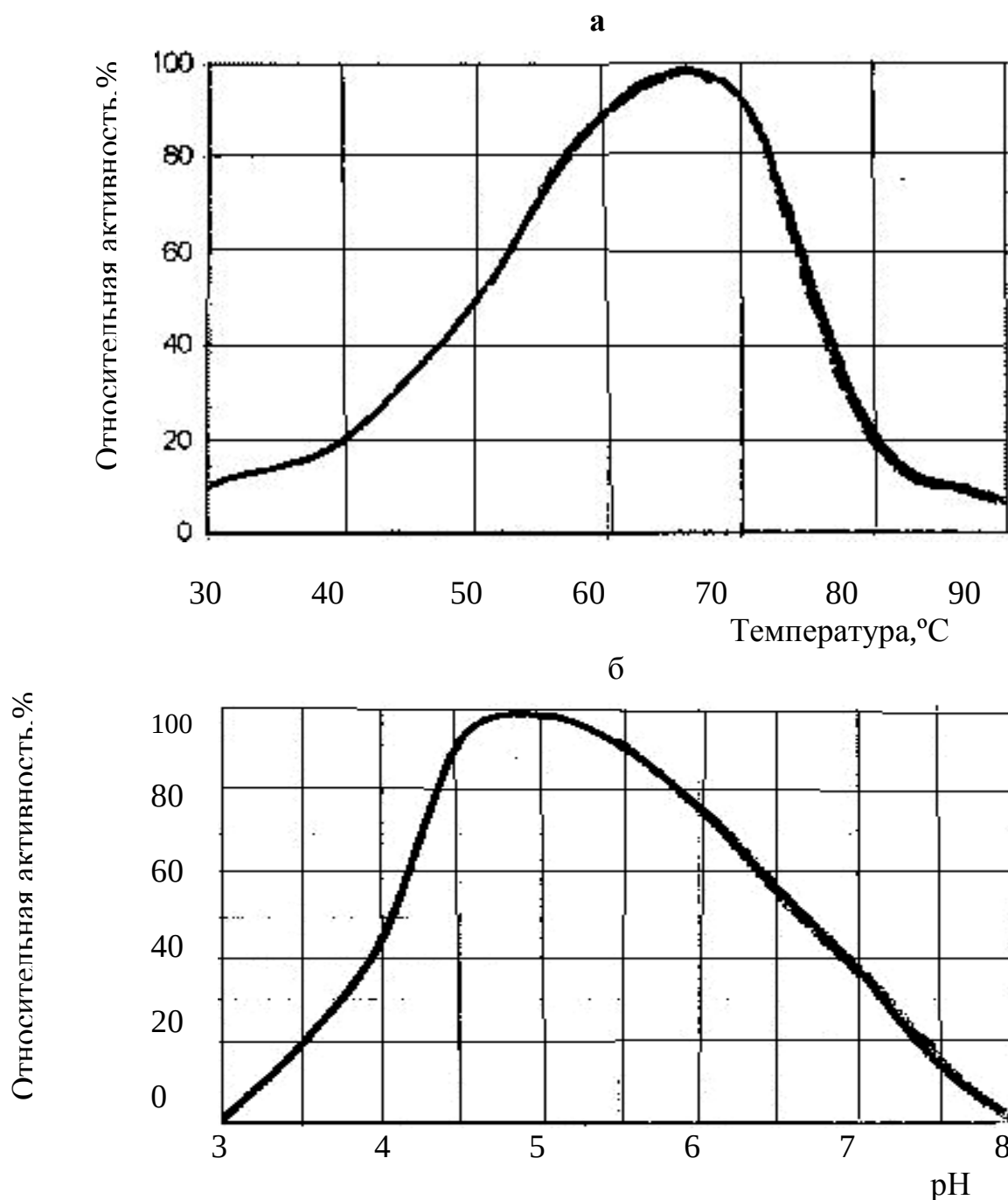


Рис.45. Влияние температуры (а) и рН раствора (б) на относительную активность препарата Брюзайм BGX.

Брюзайм BGX (ООО Русфермент) — грибная гемицеллюлаза, продуцируемая *Trichoderma longibrachiatum*. Фермент катализирует разрушение арабиноксиланов. Активность ферментов в него входящих: ксиланазная 4000 ед КС/ см³, β-глюканазная -1400 едГкС/см³, целлюлазная 1500 едКМЦ/ см³.

Рабочие зоны: рН 3,5-6,0, температура 45-70 °С (рис.45). Физические свойства: плотность 1,15-1,25, полностью растворим в воде, не характеризуется как «опасный», непожароопасный, соответствует СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».

Фибрезайм Л — нейтральная целлюлаза и гемицеллюлаза (карбогидраза). Оптимум действия: рН 5,5-7,3 температура 50-60 °С. Удельный вес 1,2-1,3 г/мл, сохраняет более чем 90 % активности по истечении 4 месяцев при хранении при 25 °С (без попадания прямых солнечных лучей), дезактивируется при замораживании и повышении рН более 11 или температуры более 70 °С и полностью в процессе сушки.

Окислительно-восстановительные ферментные препараты

Пероксидаза — продуцент штамма *Serrena maxima murr*, является ферментом окислительно-восстановительного действия. Представляет собой порошок светло-зеленого цвета, хорошо растворим в воде, нетоксичен. Штамм зарегистрирован в коллекции Ботанического института имени Комарова РАН: “Коллекция высших базидиомицетов-продуцентов биологически активных веществ”.

Полифенолоксидаза — продуцент штамма *Coriolius Hirsutus*, является ферментом окислительно-восстановительного действия. Представляет собой легкие хлопья желтовато-зеленого цвета, растворимые в воде и в буферных растворах в широком интервале рН. Мг = 31800. Максимальная активность в водных растворах 1,8-2,5 отн.ед. при содержании белка 0,17 мг/мл.

Оксиредуктаза — комплексный препарат, продуцент непатогенных грибов рода *Coriolus*, семейства *Polyporaceae*. Биопрепарат содержит ферменты класса базидиомицетов: пероксидазу (активность по бензидину 0,82-3,5 отн. ед.), лакказу (активность по бензидину 0,7-3,8 отн.ед.), полифенолоксидазу. Представляет собой порошок светло-зеленого цвета, хорошо растворим в воде. Синтез штаммов базидиальных грибов осуществлялся поверхностным способом на древесных опилках с использованием питательной среды, содержащей в качестве источника азота — пептон, углерода — глюкозу и

минеральные соли. Выращивание проводили в биологических матрицах при температуре 25-37 °С, рН 5,6. Полученный после выращивания и лиофильной сушки препарат хорошо растворим в воде и содержит белка 2,5-6,0 %.

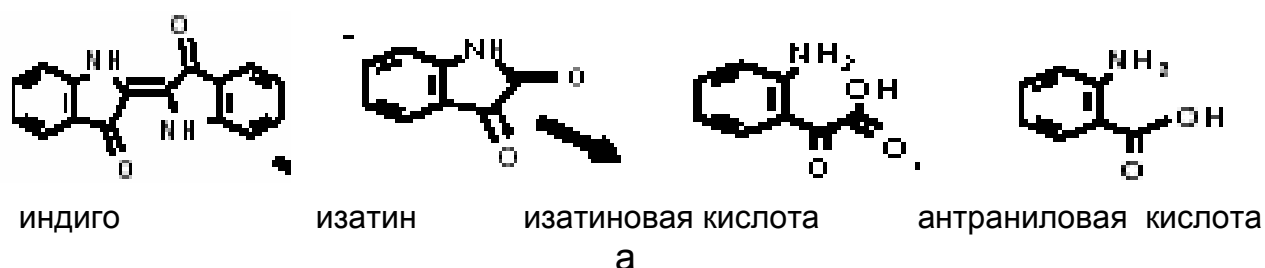
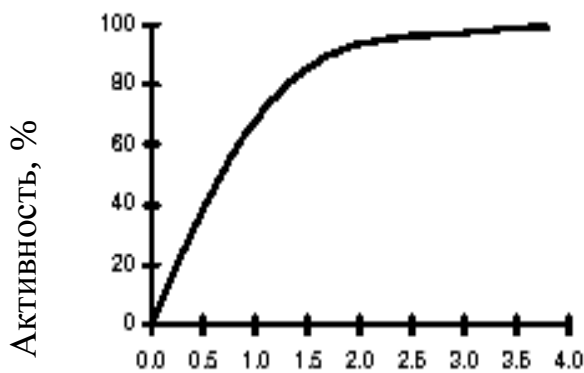
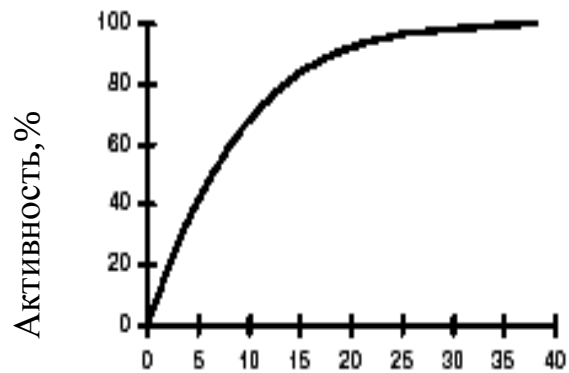


Рис. 46. Схема каталитического окисления индиго(а), схема действия лакказы в процессе деколорирования окрашенной хлопчатобумажной ткани Ъу.

Лакказа (1.10.3.1) — мультимедьоксидазы, катализирует окисление широкого диапазона фенола и других фенолсодержащих соединений. Первая лакказа возникает из лака дерева, но много лакказ обнаруживаются из различных растений и микробных источников. Из-за их способности окислять фенолы, лакказы применяют для удаления лигнина. Реакция окисления, катализируемая этим оксидоредуктазным ферментом, включает в себя перенос электронов от донора к акцепторным основаниям. Эффективное обесцвечивание индиго на окрашенных хлопчатобумажных материалах достигается 1,0 – 2,0 % от массы изделия при небольших модулях. Максимум обесцвечивания происходит в первые 15-20 минут реакции (рис. 46,47).



Концентрация фермента, г/л
Условия: 30мин., Модуль 1:10



Длительность обработки, мин
Условия: 1.5 %, Модуль 1:10

Рис.47. Активность фермента Лакказы в различных условиях деколорирования окрашенных индиго изделий

Catalase T100 (ф. Genencor, США) — промышленная форма жидкой каталазы, полученной на основе самоклонированной генетически измененной *Aspergillus Nigera*. Активность — 840 BU/g, жидкость темно-коричневого цвета, полностью растворяется в воде, оптимальная pH 5,2, удельный вес 1,2.. Фермент эффективно катализирует преобразование остаточного, сорбированного текстильным материалом пероксида водорода в кислород и воду.

Терминокс — промышленная форма жидкой каталазы фирмы Новозайм (Дания), рекомендуется применять перед крашением активными красителями, которые являются чувствительными к окислителям (рис. 48).

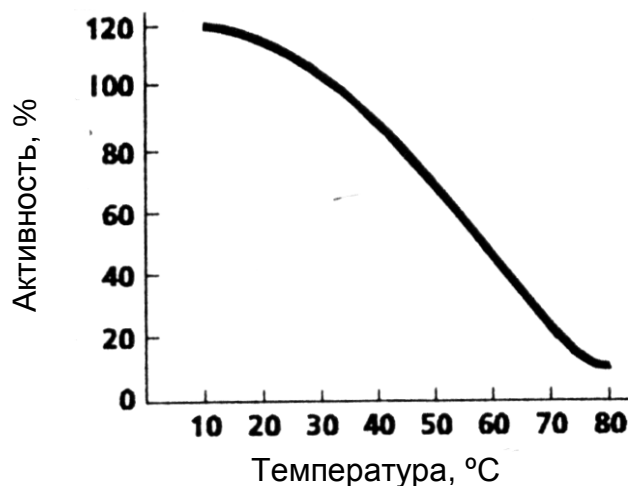
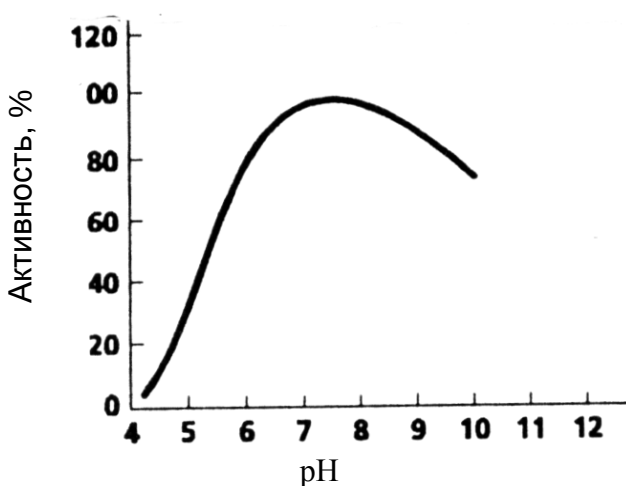


Рис. 48. Изменение активности препарата Терминокс в зависимости от pH и температуры раствора

6. Технологии биохимического синтеза и модификации химических волокон

Технологии на основе использования биологических и ферментативных систем, имеющие своей целью создание принципиально новых биоволокон или изменение свойств текстильных материалов из химических волокон, являются одним из перспективных вариантов решения экологических проблем в соответствующих отраслях промышленности. Они открывают широкие возможности для реализации потребностей рынка в волокнах и тканях нового качества.

На настоящий момент можно выделить три области применения биотехнологии в текстильном производстве:

- микробиологический синтез волокнообразующих биополимеров;
- био- и ферментативная модификация химических волокон с целью улучшения их потребительских свойств;
- модификация тканых текстильных материалов на основе химических и смеси химических и натуральных волокон на стадии беления и заключительной отделки.

Использование микробиологической трансформации или ферментативной модификации исходных субстратов осуществляется либо индивидуально, либо в сочетании с механическими или химическими обработками на различных стадиях формирования волокнистых материалов. Технологические приемы синтеза волокнообразующих полимеров из олигомеров основаны на действии ферментов, продуцируемых микроорганизмами. Исходный субстрат (олигомер) является для микроорганизмов средой поселения и источником питания для синтеза нового вещества полимерной природы. Ученые непрестанно ищут возможности расширить количество полимеров, синтезируемых живой природой. Заметим, что, помимо "экологической чистоты" таких полимеров, они обладают несомненными преимуществами перед синтетическими, поскольку получаются из так называемого "возобновляемого сырья" — растений и живых организмов,

которые непрерывно воспроизводятся, в то время как синтетические полимеры получают из продуктов переработки нефти, а ее запасы на земле ограничены.

К синтетическим полимерам, склонным к биоразложению, относятся сложные полиэфиры. В том случае, если в полимерной цепи нет "слабых связей", способных расщепляться ферментами или подвергаться химическому разрушению в природной среде, дело обстоит гораздо сложнее. Типичный пример такого рода — полиэтилен, цепи которого образованы атомами углерода. Если его степень полимеризации превышает $n = 20 - 30$, то такой полиэтилен не подвергается расщеплению ферментами и не используется в пищу микроорганизмами. В то же время известно, что короткие цепи полиэтилена с $n < 20$ в действительности служат пищей (субстратами) для определенной группы микроорганизмов, насчитывающей более 100 разновидностей. Такой процесс с точки зрения химии представляет собой последовательные химические превращения, катализаторами каждого из которых является определенный фермент. Предполагается, что в результате превращений образуется уксусная кислота, которая и используется микроорганизмами как пища и исходный строительный материал. Ясно, что если осуществить разрушение высокомолекулярного полиэтилена, используемого для получения разнообразных материалов и имеющего степень полимеризации $n > 1000$, на более короткие фрагменты с n менее 20, то дальнейшее расщепление его могут осуществлять микроорганизмы, обитающие в природной среде.

Для того чтобы длинная цепь полиэтилена в природных условиях могла расщепляться на относительно короткие фрагменты, в нее при синтезе полимера вводят "слабые связи", которые под действием солнечного света, его коротковолновой составляющей, называемой ультрафиолетовой, в присутствии кислорода и влаги атмосферы способны разрушаться с заметной скоростью.

Сейчас разработаны и другие приемы, позволяющие получать биоразрушаемые полимерные материалы, не требующие вмешательства в процесс синтеза макромолекул. Другие подходы опираются на получение

смесей из устойчивых полимеров, как, например, полиэтилен, и биоразлагаемых, например, как хорошо известный крахмал. Если ввести в такую смесь на стадии переработки полиэтилена в изделия достаточное количество крахмала, то он будет разлагаться микроорганизмами при попадании материала в почву. При этом в изделии (пленке) будет оставаться полиэтилен, который диспергируется на мелкие частицы и исчезает.

Поиски новых полимерных материалов природного происхождения в последние годы привели к очевидным успехам. Удалось обнаружить бактерии, живущие в почве и способные синтезировать полимеры в качестве внутриклеточного резервного материала. Весьма перспективными среди таких полимеров являются полиэфиры общей формулы:



Свойства этих полиэфиров в зависимости от длины боковой группы -R изменяются от характерных для жестких пластиков при малых x до типичных каучуков при больших x. В этих пределах можно тонко изменять свойства полимеров, смешивая в одной и той же макромолекуле звенья, имеющие различные боковые группы -R. Так, известна технология синтеза биомассы на основе биологически разлагаемого полиэфира (полигидроксibuтират) и формирования полиэфирного волокна. Японской фирмой Kaneva and Shimadzu Corporation создана технология производства биополимера «Lecti», где в качестве питательной среды для микроорганизмов используется кукуруза и молочная кислота. Полученное на его основе волокно по прочности близко к полиамидным волокнам (4-5 г/д текс), имеет точку плавления 185 °С и хорошо окрашивается. Обладая высокими сорбционными свойствами, биоволокно рекомендовано к использованию в быту, технике и медицине. К этой же области исследований относятся работы по созданию волокон на основе биополимера «Hyphas» .

Синтезирован биополибутират, который является 100 % биоразлагаемым веществом. Субстратом для размножения и роста биомассы служит масляная кислота. Одной из возможных областей для применения

биоволокна со свойствами, подобными полипропилену, является производство хирургических ниток.

Развивается новое направление получения бикомпонентных волокон, которые до сих пор получали только традиционным путем смешивания волокнообразующих полимеров на стадии формования. Последние достижения в области трансгенетики хлопка позволили вырастить волокно, содержащее во внутреннем канале до 1% полигидроксibuтирата. Новое волокно по термостойкости превышает показатели для хлопкового волокна.

Разработана технология получения химических волокон из микробных гликанов. Абузидан (α -1,4-1,6- β -1,3-полиглюкопиранозил-D-глюкоза) на основе ферментационной массы *Aureobasidium pullulans* и родэксман на основе *Rhodotorula rubra* (β -1,3- β -1,4-полиманнопиранозил-D-манноза) по морфологической локализации являются внеклеточными полисахаридами. В процессе их биосинтеза имеет место построение самого полимера и образование надмолекулярных структур, формирующих полисахаридную капсулу сетчато-фибриллярной структуры. Полученные волокна из аубазидана и родексмана в зависимости от условий формования волокон имеют линейную плотность 1,2 - 1,8 и 0,25-0,16 текс, удельную разрывную нагрузку 20-106 и 110-180 мН/текс соответственно.

Использование способностей некоторых микроорганизмов и ферментов селективно деструктировать полимер позволяет провести целенаправленную модификацию субстрата. Деструкция полимера может быть осуществлена путем ферментативного гидролиза при участии одного фермента или мультиэнзимного (полиферментного) комплекса. В последнем случае продукт действия одного фермента является субстратом для другого.

Известны научно-исследовательские работы, направленные на использование микроорганизмов и продуцируемых ими ферментов для катализа селективного расщепления связей в различных полимерах. Так, получены штаммы бактерий *Bacillus subtilis* KI, активно деструктирующие поликапроамид. Деструкция макромолекул волокна происходит с

образованием модифицированной аминокaproновой кислоты. Предполагается, что в процессе биовоздействия происходит разрыв амидной связи макромолекул с образованием концевых amino- и карбоксильных групп. Результатом биодеструкции является возрастание средневесового значения диаметра клубков макромолекул полимера, выравнивание частиц по размерам за счет уменьшения концентрации низкомолекулярных фракций и повышения высокомолекулярных. С увеличением длительности биовоздействия на волокно повышается вязкость его растворов, температура кристаллизации, изменяется температура термического разложения.

Выявлены специфичные микроорганизмы *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216, способные гидролизовать нитрильные группы в полиакрилонитриле (ПАН). Доказано, что при участии ферментов «нитриль»-гидролазы и амидазы в присутствии карбоновой кислоты концентрацией 1,0-1,8 % от массы обрабатываемого сырья гидролизуется более 16 % поверхностных нитрильных групп. Результатом ферментативной модификации является существенное повышение гидрофильности и крашиваемости ПАН-волокон.

Процесс гидролитической деструкции полимеров, катализируемый ферментами, в отличие от биологических процессов с участием микроорганизмов является более эффективным и контролируемым. На рынке текстильных вспомогательных веществ и реактивов имеется широкий выбор ферментативных препаратов и их композиций с поверхностно-активными веществами, выпускаемых различными фирмами. Из ферментов, предлагаемых микробиологической промышленностью, известны препараты отечественных заводов (Бердский, Рассказовский, Омутнинский биохимические заводы) и зарубежных фирм, таких как Novozymes (Дания), Genencor (США) и других.

В целях разработки экологически чистых процессов направленного изменения некоторых свойств вискозных волокон рекомендуется проводить биохимическую модификацию с использованием препарата Целловиридин. Снижение массы волокна в процессе обработки ферментом составляет от 0,6 до 10,7 %: при этом уменьшается количество альдегидных групп,

увеличивается равновесное влагосодержание, линейная плотность волокна при незначительном снижении разрывной нагрузки и разрывного удлинения. Вискозно-хлопковая пряжа (50/50) с включением модифицированной вискозы имеет влагопоглощение на 9,4 % , а капиллярность и пористость соответственно на 56,5 и 56 % выше базовых образцов.

Исследование процессов трансформации вискозных волокон при участии ферментативных систем *Trichoderma viride* (Целловиридин), *Trichoderma lignorum* (Целлолигнорин), *Geotrichum candidum* (Целлокандин) выявило изменение морфологии поверхности волокон, увеличение удельной поверхности (по азоту, м²/г) более чем в 2 раза, что способствует повышению сорбционной способности по отношению к водным растворам поверхностно-активных веществ, различных токсичных веществ. Максимально возможная степень гидролиза гидратцеллюлозного волокна достигает 22 %. По отношению к капроамидным волокнам наибольшую активность проявили клетки *Bacillus subtilis* 21/3. Модифицированные гидратцеллюлозные и поликапроамидные волокна рекомендованы для получения сорбционно-активных, ионообменных и гидрофильных материалов, имеющих спрос при изготовлении изделий медицинского назначения.

Выявлены целлюлазы, специфичные по отношению к ацетилцеллюлозе. Следствием гидролиза ацетилцеллюлозы в присутствии биохимического катализатора является увеличение его растворимости в ацетоне. Оптимизированы условия ферментативной модификации полиэтилентерефталата и политриметилентерефталата. Показано, что ферментативный гидролиз полиэстера при участии полиэстеразы при pH реакционной среды 8,6 и температуре 40 °C приводит к изменению физических свойств волокна. Модификация волокон обеспечивает текстильным материалам на их основе новые свойства, такие как снижение пиллингуемости, более высокую белизну и смачиваемость.

На рис. 49,50 представлены фотографии, иллюстрирующие эффект действия полиэстеразы с оптимумом действия при 40 °C и pH 8,6.

Ферментативная модификация волокна позволяет повысить белизну на 4 %, изменить капиллярные свойства материала при незначительном снижении прочностных характеристик. Изменение физических свойств полимера, в частности, снижение температуры плавления на 7 градусов, повлияло на повышение сорбционной восприимчивости материала по отношению к катионным красителям.

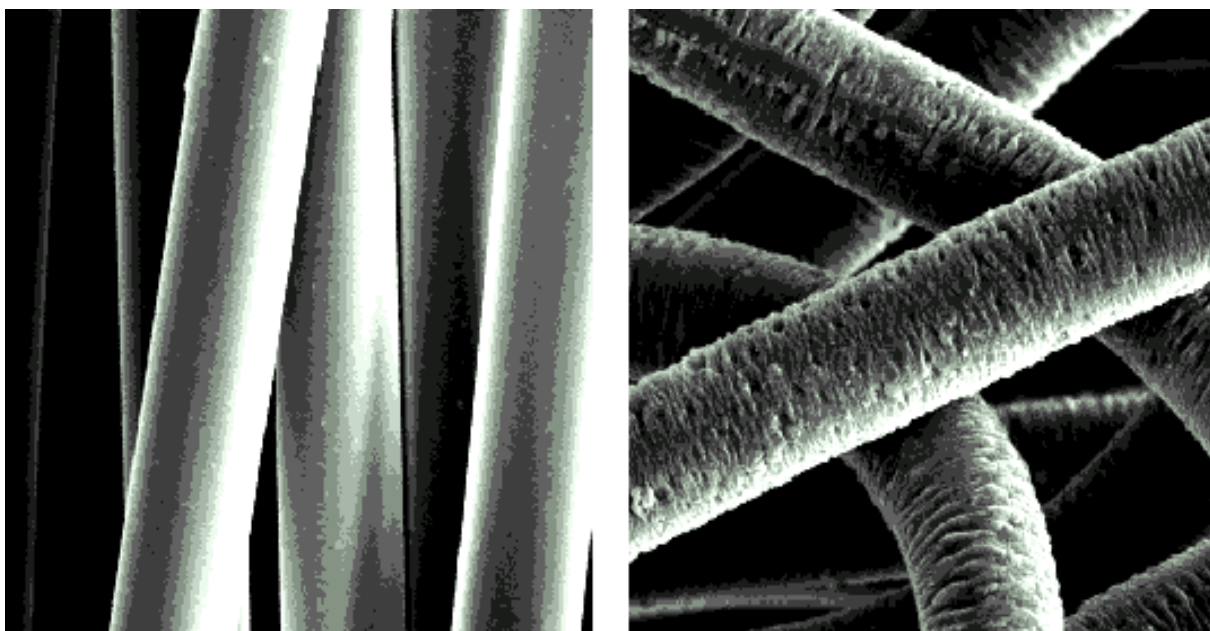
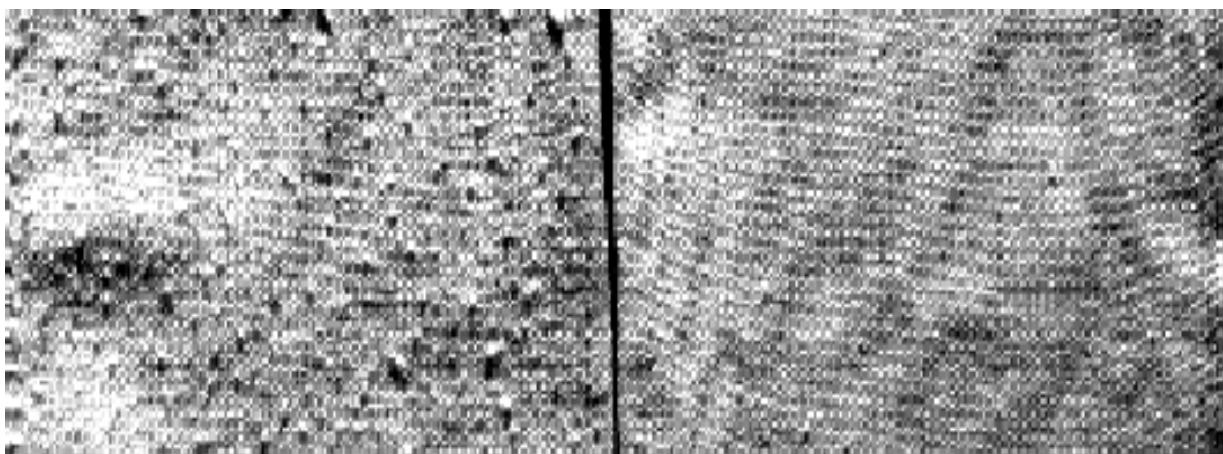


Рис. 49. Микрофотографии волокон XLD 204 (фирмы «Dupont») до и после обработки полиэстеразой



а

б

Рис. 50. Визуальный эффект пилеобразования на тканях из Дакрона 54 без обработки (а) и после обработки полиэстеразой (б)

Технология «теллуровой» обработки, в отличие от биополировки, обеспечивает на волокне формирование микрофибрилл и применима не только к химическим волокнам, но и тканям из смеси целлюлозных и химических волокон. Модификация поверхности волокон осуществляется без их «старения», т.е. снижения прочностных свойств. Технология применима для оборудования с большой турбулентностью, обеспечивающего высокие скорости движения ткани (от 200 до 1000 м /мин), например тумблер AIRO-1000, машина ВК-100. Примером может служить технология обработки с использованием препарата Бактозоль СА (фирма «Clariant», Швеция) или Биофлекс (ООО «Биохим», Россия), предназначенных для многокомпонентных тканей (лен, вискозное штапельное волокно, хлопок). С использованием препаратов серии Бактозоль СА и Бактозоль СЕ за счет микрофибрилляции поверхности можно получить модные эффекты, имитирующие микровельвет или шелк. Так, результатом микрофибрилляции филаментных нитей является падение блеска и ворсистости медноаммиачных волокон, что обеспечивает поверхности тканей шелкообразный вид, эффект «ангельской кожи».

Ферментативные обработки широко используются в процессах подготовки (беления) тканей из смеси хлопковых и химических волокон, вискозных штапельных тканей. Недостатком классических технологий, использующих химические катализаторы, щелочные среды и высокую температуру, является образование устойчивых деформаций ткани в виде «заломов» и «заминов». При последующем крашении или печати в результате деструкции волокон образуются неисправимые браки. Использование ферментативных обработок позволяет осуществлять подготовку тканей данного ассортимента при максимально низкой температуре и щелочности растворов.

Из ферментативных препаратов для целей расшлихтовки и расшлихтовки, совмещенной с «отваркой», используются гидролазы (Амилосубтилин, Амилоризин, Аквазим, Термамил, Скаурзим) и композиционные мультиэнзимные составы, включающие ферменты и ПАВ (например Биотекс, Биософт АО Ивхимпром г.Иваново, Биофлекс, Биомикс

ООО «Би-А-Хим» г.Москва). Эффективная ферментативная расшлихтовка, расщепление технологических загрязнений (замасливателей) и примесей при участии различных гидролаз (пектиназ, гемицеллюлаз и липаз) позволяет сократить длительность последующего пероксидного беления и снизить концентрации bleaching reagents более чем в 2 раза. Для крашения вискозных штапельных тканей в темные цвета и печатания грунтовым рисунком ферментативная обработка является достаточной. При такой обработке обеспечивается получение требуемых колористических и прочностных характеристик окрасок и эффект мягчения.

Оценена возможность совмещения ферментативной расшлихтовки с использованием термо- и щелочеустойчивых амилаз (Термамил и др.) и пероксидного беления. Одностадийные способы беления тканей из смеси волокон расправленным полотном могут быть реализованы на линиях непрерывного действия типа ЛРБ, ЛОБ, а вискозных штапельных тканей — в жидкостных малоемких машинах. В результате «щадящего» биохимического воздействия достигается высокая сохранность волокон различной природы, увеличение разрывной нагрузки тканей как в сухом, так и в мокром состоянии.

Освоено производство деградирующей сложные полиэфиры внеклеточной гидролазы из актиномицета *Thermomonospora fusca*. Экскреции фермента удалось достичь в присутствии неупорядоченного сополимера 1,4-бутандиола, терефталевой кислоты и адипиновой кислоты (при 40-50 мол.% первой из кислот) и при использовании в составе реакционной среды пектина, а также NH_4Cl в качестве источника азота. Процесс включает несколько стадий: индукцию полиэфиром ферментной экскреции, адсорбцию фермента на гидрофобной полиэфирной поверхности, ингибирование и генерирование фермента мономерами, образующимися при гидролизе полиэфира, и денатурацию фермента. Заключительная диафильтрация через целлюлозоацетатные мембраны приводит к продукту высокой чистоты с достаточным выходом (60 % суммарной активности).

Для достижения максимальной эффективности использования ферментов и скорейшего внедрения биотехнологий в производство требуются согласованные усилия как специалистов по производству химических волокон, текстильщиков, так и энзимологов. Поэтому задача приближения биохимических технологий к стадии промышленного внедрения должна решаться не только путем использования известных биопрепаратов с различной субстратной активностью, но и созданием на основе биоинженеринга ферментов, отличных от существующих в природе и с оптимальными для требуемой технологии характеристиками.

Список литературы к главе

1. B. Taylor, "Polyester into the Next Millennium," *Textile Outlook International*, no.82, pp. 129-147, 1999.
2. S.H. Zeronian and M.J. Collins, "Surface Modification of Polyester by Alkaline Treatment," *Textile Progress*, vol. 20, pp. 1-34, 1989.
3. J. Dave, R. Kumar, and H.C. Srivastava, "Studies on Modification of Polyester Fabrics, I: Alkaline Hydrolysis," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 33, pp.455-477, 1987.
4. R.W. Mason, "Decades Later, Polyester Forges New Image," *Textile World*, vol. 149, no. 1, pp. 56-60, 1999.
5. Вайнбург, В.М. Текстильные материалы медицинского назначения/ В.М.Вайнбург, М.П.Васильев, И.И.Шамолина [и др.] — М.: ЦНИИТЭИЛегпром.1991.—С.54.
6. Biotechnologie in textilen prozessen.-Textiltechnik, 1986,Bd 94,N 12, S. 696-697.
7. Пехташева, Е.Л.//Тез.докл.II Международной научно-технической конференции. «Химия-99», Иваново,-1999, С.221-222.
8. .Gubitz G.M.,Cavaco-Paulo A.// Symposium on Biotechnology in Textile Industry, Portugal, 2000.- S.27.
9. Бирина Е.Н., Шамолина И.И., Свердлова Н.И., Синицин А.П. // Тез.докл . II Межд.научно-технич. конф. Химия. Иваново, 1999.-С.231.
10. Ермилова, И.А.Текстильная промышленность/ И.А.Ермилова, Л.Н. Алесеева, И.И.Шамолина //.—1983.—№11.—С.60-63.

11. Teruo Hori, Zheng Song //Symposium on Biotechnology in Textile Industry Portugal. 2000.- S. 43.
12. Mee-Young Yoon, Jim Kellis, Palo Alto// Symposium AATCC IC&E USA ,2000, - S 312-318.
13. Мельников, Б.Н. Вестник СПУТ и Д/ Б.Н.Мельников, А.В. Чешкова и др.// Санкт-Петербург.1997.— №1. —С. 194-204.
14. Самохвалова Е.Н., Бирина Е.Н.//Тез. докл. научно-технич. конф. Дни науки. СПб. 1999.- С. 57.
15. Iorda M I., Popei M//18 IFATCC Congress, Copenhagen, 1999.-S.7-9
16. Valldeperas. J.I. Navarro J.A.// 18 IFTCC Congress, Copenhagen, 1999, sept.-S217.
17. Production of a polyester degrading extracellular hydrolase from Thermomonospora fusca. Gouda Mona K., Kleeberg Ilona, Van den Heuvel Joop, Muller Rolf-Joachim, Deckwer Wolf-Dieter. (University of Alexandria, Alexandria, Egypt) Biotechnol. Progr.. 2002. 18, № 5, с. 927–934. Библ. 28. Англ.
18. Fornelli S.// 17 IFVCC Congress, Vienna,1996.- S. 137-143.
19. Valldeperas J.,Lis M., Carrillo F., Navarro J.A // Сб. докл. Конгресса PCXТК, Иваново.1998.-С. 128
20. Лебедева, В.И. Химические волокна/ В.И.Лебедева, А.В. Чешкова и др.//1996.— №4.— С. 52-55.

7 . Методики определения каталитической и субстратной активности ферментов

За единицу **каталитической активности** фермента принято такое количество фермента, которое катализирует реакцию превращения 1г вещества в строго определенных условиях.

Субстратная активность фермента оценивается по степени конверсии соответствующего нативного субстрата или вещества, экстрагированного из более сложного многокомпонентного субстрата, а также по степени модификации (изучения его физико-химических, химических свойств и

деформационных характеристик) самого многокомпонентного субстрата, содержащего исследуемый компонент.

7.1. Определение амилалитической активности ферментов

Навеску препарата фермента в количестве 1мг/см³ растворяют в дистиллированной воде и разбавляют раствор в 50 раз.

Проведение анализа: Пробирку с 0,5 см³ 1% раствора крахмала помещают в термостат при температуре 37 °С и выдерживают в течение 3-х минут. Затем в пробирку вносят предварительно подготовленный ферментный препарат и засекают время реакции. Параллельно делают контрольную пробу, где вместо фермента добавляют дистиллированную воду. Через три минуты в кюветы прибавляют по 1 см³ раствора динитросалициловой кислоты – для прекращения действия фермента. Ставят пробирки на водяную баню при 100 °С и выдерживают в течение 5 минут. Охлаждают и разбавляют 10 см³ дистиллированной водой. Растворы, где присутствует фермент, имеют окрашивание, в зависимости от активности фермента, от голубого до практически бесцветного, а раствор без фермента – синее. Измеряют оптическую плотность растворов при длине волны 540 нм. За единицу активности принимают такое количество препарата, которое за 1 минуту (при температуре 37 °С и рН 6,5) освобождает 1 микромоль мальтозы:

$$A = \frac{C2a}{3},$$

где 2 – коэффициент разбавления; 3 – время инкубации; а – разбавления в ходе работы; С – количество освобожденной мальтозы в микромолях, определяется по градуировочному графику зависимости оптической плотности (по оси абсцисс) от концентрации мальтозы (по оси ординат).

Определение α-амилазной активности (АС), ГОСТ 20264.4-89

Метод основан на гидролизе крахмала пигментами амилалитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы. Амилалитическая

активность характеризует способность амилолитических ферментов катализировать гидролиз крахмала до декстринов различной молекулярной массы и выражается числом единиц указанных ферментов в 1 г препарата. За единицу активности амилолитических ферментов принято такое количество ферментов, которое в строго определенных условиях – температуры, pH и времени действия, катализирует до декстринов различной молекулярной массы 1 г растворимого крахмала, что составляет 30 % от введенного в реакцию.

Для определения амилолитической активности приготавливают следующие реактивы:

Приготовление 1 % раствора крахмала (субстрата).

1 г крахмала (с учетом влажности) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 25 мл воды и перемешивают. Затем добавляют в колбу еще 25 мл воды, помещают колбу с содержимым в кипящую водяную баню, непрерывно помешивая до полного растворения крахмала. После этого содержимое колбы охлаждают, добавляют 10 мл фосфатного буферного раствора pH = 6,0, объем жидкости доводят до метки дистиллированной водой и содержимое колбы перемешивают. Раствор крахмала готовят в день проведения анализа.

Приготовление фосфатного буферного раствора с pH = 6,0.

Используют двузамещенный фосфорно-кислый натрий (ГОСТ 4172-76) с массовой концентрацией 9,078 г/л. Навески солей растворяют в дистиллированной воде в колбах вместимостью 1 л и объемы доводят до метки. Для получения буферного раствора с pH = 6,0 исходные растворы смешивают в соотношении 1:9 (величины pH проверяют на потенциометре).

Приготовление 0,1 моль/дм³ раствора соляной кислоты.

8,2 мл соляной кислоты наливают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Приготовление основного раствора йода.

0,5 г йода и 5 г йодистого калия растворяют в бюксе с притертой крышкой в малом количестве воды. Содержимое осторожно перемешивают при плотно

закрытой крышке бюкса. Раствор после полного растворения йода переносят в мерную колбу с притертой крышкой вместимостью 200 мл, а объем доводят дистиллированной водой до метки. Основной раствор хранят в темноте и используют в течение 1 месяца.

Приготовление рабочего раствора йода.

2 мл основного раствора йода разводят в 0,1 моль/дм³ (0,1 н. HCl) раствором соляной кислоты в мерной колбе вместимостью 100 мл. Перед употреблением рабочего раствора фотоэлектроколориметром проверяют его оптическую плотность, пользуясь светофильтром с максимумом светопропускания при $\lambda = 453$ нм и кюветами с толщиной поглощающего свет слоя 1 см. Оптическая плотность раствора йода должна быть равна $0,220 \pm 0,01$. В случае отклонения оптической плотности раствора от этой величины ее приводят к необходимой, добавляя несколько капель кислоты или основного раствора йода.

Техника проведения анализа.

Перед анализом следует сделать разведение фильтрата культуральной жидкости дистиллированной водой в зависимости от активности α -амилазы (при активности α -амилазы 20-30 ед/мл разведение – 1/500, при активности α -амилазы 80-100 ед/мл разведение – 1/2000, при активности α -амилазы 130-150 ед/мл разведение – 1/2500).

Для проведения испытания берут 2 пробирки (диаметром 2 см и высотой 18 см), наливают в каждую по 10 мл 1 % раствора крахмала и ставят в ультратермостат или водяную баню с температурой $30 \pm 0,2$ °C. В термостате пробирки термостатируют в течение 5-10 мин. Затем, не вынимая пробирок из термостата, наливают в первую пробирку 5 мл дистиллированной воды (контрольная), во вторую – 5 мл ферментного раствора (опытная). Смесь быстро перемешивают и выдерживают в ультратермостате в течение 10 мин. Через 10 мин из реакционной смеси (контрольного и опытного растворов) отбирают по 0,5 мл раствора и переносят каждый в одну из колб с предварительно налитыми 50 мл раствора йода, содержимое колб перемешивают.

Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный раствор – синий цвет, опытный раствор – фиолетовую окраску различной интенсивности в зависимости от количества непрогидролизованного крахмала. Непосредственно после смешивания растворов фотоэлектроколориметром определяют их оптическую плотность с максимумом светопропускания при $\lambda = 656$ нм, пользуясь кюветами с толщиной поглощающего свет слоя 1 см. Контрольным раствором при колориметрировании исследуемых растворов является дистиллированная вода. Оптическая плотность контрольного раствора (D_1) соответствует количеству исходного крахмала-субстрата. Оптическая плотность опытного раствора (D_2) соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница между показателями оптических плотностей растворов соответствует прогидролизованному количеству крахмала-субстрата, оставшегося после действия фермента. Разница между показателями оптических плотностей растворов соответствует прогидролизованному количеству крахмала-субстрата. Количество прогидролизованного крахмала определяется по формуле:

$$C = ((D_1 - D_2) / D_1) \cdot 0,1,$$

где C – количество прогидролизованного крахмала, г; D_1 – оптическая плотность контрольного раствора; D_2 – оптическая плотность опытного раствора; 0,1 – количество крахмала, взятое для испытания в качестве субстрата, г.

Если количество прогидролизованного крахмала меньше 0,02 г или больше 0,07 г, то испытания повторяют. При приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления. Если в результате ферментативной реакции количество превращенного крахмала находится в указанных пределах, полученные данные используют для расчета амилалитической активности. Амилалитическая активность в ед/мл препаратов бактериального происхождения (АС) определяют по формуле:

$$AC = \frac{5,885C + 0,001671}{n} a,$$

где С – количество прогидролизованного крахмала, г; n – количество фильтрата культуральной жидкости, взятое для испытания, мл; а – разведение фильтрата культуральной жидкости; 5,885 и 0,001671 – коэффициенты расчетного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных в зависимости от количества прогидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для испытания. В коэффициенты введен множитель для препарата на 1 г действия фермента.

Методика определения активности Глюкаваморин ГХ

Приготовление ацетатного буфера с рН = 4,7 для мальтозы (на мальтозном методе). Для приготовления ацетатного буфера используют 1 н. раствор CH_3COOH и 1 н. раствор CH_3COONa . 58 мл ледяной уксусной кислоты наливают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят до метки дистиллированной водой. 82 г безводного или 136,09 г кристаллического уксусного натрия помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят до метки дистиллированной водой. Для получения буферного раствора с рН 4,7 смешивают 1 Н растворы кислоты и соли в соотношении 1:1. Величину рН проверяют на рН-метре.

Для анализа приготовления раствора мальтозы берут в колбу на 0,5 л 10 г мальтозы очищенной, 50 мл буфера и доводят до метки дистиллированной водой. Прежде чем работать, 1 сутки выстоять в холодильнике. Перед началом работы раствор профильтровать через бумажный фильтр.

Разведение глюкаваморина: Берем фильтрат, фильтруем в колбу на 100 мл 5 мл фильтрата и доводим до метки дистиллированной водой. В две большие пробирки, наливаем по 25 мл мальтозы, ставим в водяную баню на 10 мин при 50 °С, через 10 мин в контрольную пробирку заливаем 5 М соляной кислоты (1 мл) 15 мин $T = 50^\circ\text{C}$. Этой же соляной кислотой прекращаем работу

(4мл). Производим соответствующие сравнительные изменения на поляриметре. Расчет активности Глюкаваморина ГХ ведут по табл.28.

Таблица 28

Таблица расчета активности Глюкаваморина ГХ

Разность показан. Сахар (С)	Актив-ность ГЛА	С	Актив-ность ГЛА	С	Актив-ность ГЛА	С	Актив-ность ГЛА
0,20	20	0,80	78	1,40	137	2,00	196
0,25	25	0,85	83	1,45	142	2,05	201
0,30	29	0,90	88	1,50	147	2,10	206
0,35	34	0,95	93	1,55	152	2,15	211
0,40	39	1,00	98	1,60	157	2,20	216
0,45	44	1,05	103	1,65	162	2,25	221
0,50	49	1,10	108	1,70	167	2,30	226
0,55	54	1,15	113	1,75	172	2,35	231
0,60	59	1,20	118	1,80	177	2,40	236
0,65	64	1,25	123	1,85	182		
0,70	69	1,30	128	1,90	186		
0,75	74	1,35	132	1,95	191		

7.2. Методы определения лигнолитической активности

Лигнолитический комплекс содержит несколько различных ферментов, поэтому существует необходимость определения как общей активности комплекса, так и активностей индивидуальных ферментов, входящих в его состав.

Определение общей лигнолитической активности.

В качестве характеристики лигнинразрушающей активности используется способность ферментов обесцвечивать краситель Ремазоль бриллиантовый голубой. Активность определяют по изменению отношения

оптической плотности при 535 и 500 нм за определенный промежуток времени реакции ферментного препарата с красителем.

Модификация этой методики заключается в определении начальной скорости обесцвечивания красителя при 585 нм (максимум поглощения красителя, коэффициент экстинкции (ϵ) красителя $6900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Реакционная смесь содержит: 1 мл раствора красителя ($3,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), 1,45 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера (pH 4,5), 50 мкл ферментного препарата, 40°C . Раствор сравнения содержит те же компоненты, кроме фермента.

Определение лигнин-пероксидазной активности по вератровому спирту

Лигнин-пероксидаза катализирует окисление (в присутствии большого числа модельных ароматических соединений) лигнина. Наиболее распространенной реакцией, которую используют для измерения лигнин-пероксидазной активности, является окисление вератрового спирта до альдегида. Хотя pH оптимум для этой реакции равен 2, ее обычно проводят при pH 2,5-3,5, что связано с низкой стабильностью лигнин-пероксидазы при $\text{pH} < 2,5$.

Реакционная смесь (1 мл) состоит из 0,4 мл вератрового спирта (1 мМ), 0,02 мл H_2O_2 (9 мм), 0,1 мл 0,5 М тертратного буфера (pH 2,9) 0,05 мл ферментного препарата и воды. Активность определяют по начальной скорости накопления вератрового альдегида при 310 нм. Реакцию проводят при комнатной температуре. Единица активности соответствует такому количеству лигниназы, которое приводит к образованию 1 мк моль вератрового альдегида за 1 мин.

Определение лакказной активности

Лакказа имеет широкую субстратную специфичность. Она окисляет о- и п-дифенолы и диаминоароматические соединения. Поэтому лакказную активность можно определять по ряду субстратов.

По пирокатехину (III). В основу метода положена регистрация начальной скорости окисления пирокатехина при 410 нм (ϵ - 740 М⁻¹ см⁻¹).

Реакционная смесь содержит 2 мл 2М раствора субстрата в 0,1 М ацетатном буфере (рН 4,5) и 50 мл фермента. Смесь инкубируют при 30 °С. В кювете сравнения находится раствор субстрата. Пирокатехин предварительно очищают возгонкой.

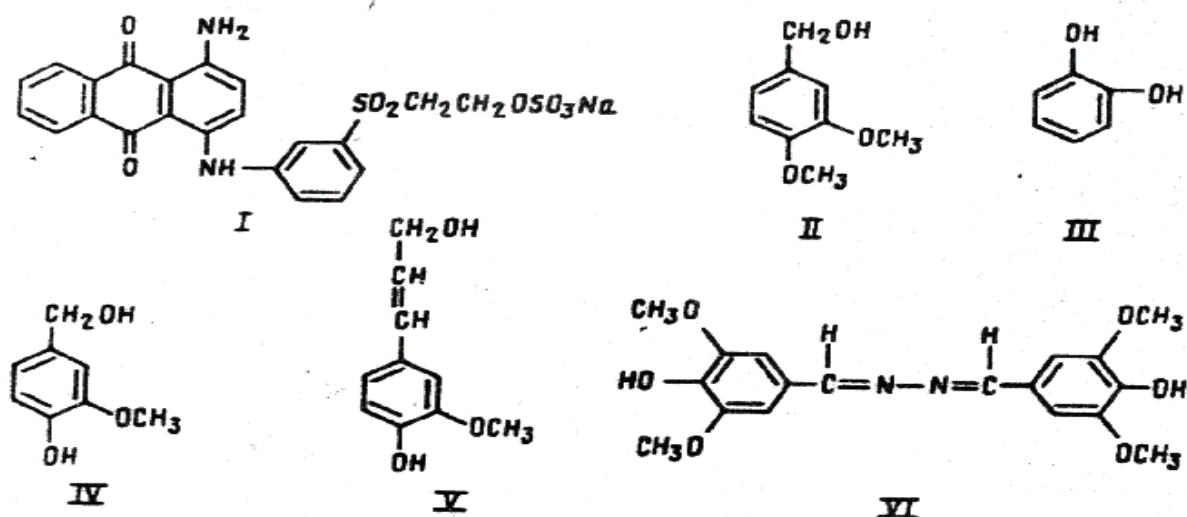
По ванилиновому спирту (IV). Ванилиновый спирт предварительно очищают хроматографией на силикагеле. Методика определения заключается в следующем. В 1 мл спектрофотометрической кювете смешивают 850 мл 0,1 М натрий - ацетатного буфера (рН 4,5), 100 мл ванилинового спирта (70 мМ), растворенного в смеси этиловый спирт: ацетатный буфер - 3:4 и 50 мл раствора фермента. В кювете сравнения вместо фермента находится буфер. Реакцию проводят при 20 °С. Активность определяют по начальному участку кинетических кривых при $\lambda = 300$ нм.

По конифериловому спирту (V). Конифериловый спирт, являющийся мономером лигнина, легко окисляется лакказой с образованием кониферилового альдегида. Лакказную активность по конифериловому спирту определяют спектрофотометрически по начальной скорости окисления при $\lambda = 338$, T = 30 °С. Реакционная смесь объемом 1 мл содержит 900 мл 0,05 М натрий— фосфатного буфера (рН 6,5), 50 мл 8 мМ раствора кониферилового спирта (растворенного в смеси этилового спирта и фосфатного буфера 1:2) и 50 мл раствора фермента. Раствор сравнения содержит вместо фермента буфер.

По сиригальдазину (VI). Спектрофотометрический метод определения лакказной активности удобен тем, что позволяет определять даже незначительную активность фермента из-за высокого коэффициента экстинкции (ϵ 65000 М⁻¹ см⁻¹) продукта реакции. Реакционная смесь состоит из 0,2 мл сиригальдазина (0,2 мМ), 0,5 мл 0,1 натрий - ацетатного буфера (рН 5,5), 0,05 мл раствора лакказы и воды. Продукт реакции —

красного цвета, его поглощение определяют при 525 нм. Реакцию проводят при комнатной температуре.

Субстраты, используемые для определения лигнолитической активности:



Метод определения активности пероксидазы

Метод определения активности пероксидазы основан на определении интенсивности окраски продукта окисления бензидина, образованного при действии пероксидазы.

В кювету на 20 мл приливаем 0,5 мл раствора фермента и 3,5 мл воды, добавляем 2 мл свежеприготовленного 0,05 % раствора бензидина. Затем в одну из кювет добавляем 2 мл 0,1 % перекиси водорода. Выдерживаем растворы в течение 5 минут, и замеряем оптическую плотность раствора на ФЭК-М при красном светофильтре. Контрольный раствор содержит все ингредиенты, кроме перекиси водорода.

Активность определяли по следующей формуле:

$$A = \frac{DV}{0,0128 \cdot 1000 \cdot 0,5t},$$

где D - оптическая плотность; V - объем раствора; 0,0128 - коэффициент молярной экстинкции; 0,5 - объем раствора фермента; t - время инкубации (5 минут).

Методика определения активности полифенолоксидазы отличается от методики определения пероксидазы и лакказы тем, что в качестве субстрата используется пирокатехин. Исследуемый раствор содержит те же ингредиенты, кроме перекиси водорода.

7.3. Методы определения активности липаз

Определение активности липаз осуществляется тремя группами методов, основанных на измерении химических изменений в реакционной системе; количества освободившегося спирта; количества свободных жирных кислот.

1. Группа методов, основанных на измерении химических изменений в реакционной среде. Первый из методов этой группы базируется на осветлении эмульсии оливкового масла, стабилизированного моноолеином или олеатом натрия под влиянием липазы. Степень осветления измеряют фотометрически по снижению оптической плотности. Метод может быть применен лишь в том случае, когда величина рН раствора ниже 8, в противном случае происходит расслаивание эмульсии. Второй метод этой группы основан на изменении поверхностного натяжения реакционной смеси под действием липазы в результате накопления продуктов гидролиза. Такие изменения измеряют при помощи вискозиметра.

2. Группа методов, основанных на измерении количества освободившегося спирта. Субстратом для методов этой группы служит только виниловый эфир. Количество освободившегося спирта определяют при помощи колориметра или флуориметра.

3. Группа методов, основанных на измерении количества освободившихся жирных кислот. Субстратом для этой группы методов служит чаще всего оливковое масло. Количество кислот определяют титрованием реакционной смеси. При титрометрическом методе за единицу липолитической активности принимают такое количество фермента, которое отщепляет 1

мкмоль олеиновой кислоты от 40 % эмульсии оливкового масла в 2% растворе поливинилового спирта за 1 ч при 37 °С и рН 7,0.

Определение активности липазы

В качестве субстрата используют оливковое масло в виде эмульсии и определяют жирные кислоты, высвобожденные под действием липазы, титрованием щелочью. За единицу активности липазы принимают ее количество, способное высвободить в течение 1 ч 1 мкмоль олеиновой кислоты из 40 % эмульсии оливкового масла при рН 7, температуре 37 °С.

Липазную активность (ЛС) рассчитывают по формуле, ед./г:

$$ЛС = \frac{AK50}{B} 100 \cdot 2,$$

где А - разность объемов 0,03 н. раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование опытной и контрольной проб, см³; К — коэффициент (поправка) к титру щелочи, обычно К = 1; В - концентрация фермента, г/см³; цифры - постоянные коэффициенты, связанные с условиями методики.

Порядок выполнения работы

В 6 пробирок наливают по 1 мл 5 % эмульсии технического масла. В первую пробирку добавляют 5 % раствор фермента (разбавленный в 100 раз). Во вторую пробирку добавляют 5 капель воды. В обе пробирки приливают по 1 капле 1 % раствора фенолфталеина и содержимое немедленно титруют 0,05 н. раствором NaOH до бледно-розовой окраски. Другие 5 пробирок помещают в водяную баню или термостат при T=38 °С. Через каждые 10 минут вынимают по 1 пробирке и содержимое титруют 0,05 н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина. Результаты титрования оформляют графически, откладывая на основании абсцисс время взаимодействия фермента и субстрата, на оси ординат — количество щелочи, пошедшее на титрование.

7.4. Методы определения целлюлатической активности

Методы определения общей целлюлазной активности можно условно разделить на две группы. К первой можно отнести тесты с использованием в качестве субстрата чистых форм целлюлозы на наличие целлюлазной активности без уточнения, к каким индивидуальным компонентам они относятся. В эту многочисленную группу методов, широко используемых при культивировании и скрининге микроорганизмов, для стандартизации ферментных препаратов, входят, например, методы определения активности целлюлаз по гидролизу фильтровальной бумаги (FPA), карбоксиметилцеллюлозы (так называемая КМЦ активность), хлопка (так называемая С1-активность), микрокристаллической целлюлозы (авицелазная активность), окрашенной целлюлозы, аморфной (регенерированной из кадоксена или фосфорной кислоты) целлюлозы.

Ко второй категории методов определения общей целлюлазной активности можно отнести определение активности целлюлаз по отношению к тем или иным видам целлюлозосодержащего сырья — целлолигнину, соломе, древесным опилкам, отходам хлопка и т.д. В этом случае существенную роль в активности целлюлазных препаратов могут играть наличие в составе субстрата примесей нецеллюлозного характера, способ предобработки сырья, наличие в составе мультиферментного комплекса других ферментов (лигниназ, гемицеллюлаз, протеиназ, пектиназ и т.д.), которые обычно не выявляются при определении активности ферментных препаратов при использовании стандартных целлюлазных тестов.

Активность выражается в единицах на грамм (миллиграмм) ферментного препарата или миллилитр раствора, и 1 единица активности соответствует 1 микромолю гидролизуемого субстрата или образуемого продукта за 1 мин реакции. Существует два основных способа определения и расчета активности, один из них заключается в том, что при инкубации фермента с субстратом отбирается через определенное время реакции одна

проба, в которой определяется содержание глюкозы, восстанавливающих сахаров или другого продукта (например, хромогенного продукта). В этом случае удельная активность (ед/г, ед/мг или ед/мл) рассчитывается по формуле:

$$A = \Delta[P]/t[E],$$

где t - время реакции (мин); $\Delta [P]$ - количество продукта (мкмоль/л), выделившееся за время t ; $[E]$ - концентрация фермента в реакционной смеси» используемой для определения активности, г/л, мг/л или мл/л.

Поскольку сам по себе раствор ферментного препарата может содержать сахара (фон), величина $\Delta [P]$ обычно находится по разности между содержанием продукта в анализируемой пробе и контрольной (нулевой) пробе.

Другой метод определения и расчета активности заключается в том, что в ходе реакции отбирается несколько проб, в которых анализируется содержание продукта. На основании полученных данных строится график в координатах ($[P]t$; t), из которого определяется начальная скорость образования продукта, как тангенс угла наклона начального участка кинетической кривой: $\operatorname{tg} \alpha = d[P]/d t$). В данном случае также необходимо иметь контрольную (нулевую) пробу, в которой определяется фоновое содержание продукта. Отсекаемый на оси ординат отрезок соответствует концентрации продукта в контрольной (нулевой) пробе — $[P]_0$. Формула для расчета активности имеет следующий вид:

$$A = d[P]/dt[E] = \operatorname{tg} \alpha / [E].$$

Метод определения целлюлатической активности с помощью нерастворимой окрашенной целлюлозы

Метод определения целлюлатической активности с помощью нерастворимой окрашенной целлюлозы основан на определении окрашенных растворимых продуктов реакции, образующихся при действии ферментов целлюлазного комплекса на данный субстрат. За единицу активности

целлюлазы принимается такое количество фермента, которое при действии на окрашенную целлюлозу (50 мг/мл) при $T=50^{\circ}\text{C}$ и pH 4,5 образует 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 минуту.

Используемые реактивы:

0,1 М ацетатный буфер (pH 4,5);

0,3 М раствор соляной кислоты. В мерную колбу емкостью 1 л вносят 25 мл концентрированной (37 %) соляной кислоты и добавляют дистиллированную воду до метки.

Окрашенная целлюлоза “ОЦ-31” производства НПО (“Фермент”) (Вильнюс).

Ход определения активности

Навеску окрашенной целлюлозы “ОЦ-31” массой 200 мг, взвешенную на аналитических весах с точностью до 2 мг, переносят в стеклянную центрифужную пробирку емкостью 10-15 мл и добавляют 2 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 4,5). Смесь инкубируют в течение 5-10 минут в термостатируемом сосуде при $T=50^{\circ}\text{C}$, перемешивании на магнитной мешалке, после чего добавляют 2 мл подогретого до 50°C раствора ферментного препарата и отмечают по секундомеру время начала реакции. Смесь перемешивают при $T=50^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут, после чего пробирку быстро охлаждают в холодной воде (не более 102 мин) и добавляют 1 мл 0,3 М раствора соляной кислоты для остановки реакции. Пробирку переносят в лабораторную центрифугу и центрифугируют при 5000-10000 об/мин в течение 5-10 минут. С помощью пипетки осторожно отбирают супернатант, у которого после на спектрофотометре определяют оптическую плотность при длине волны 490 нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см. При определении оптической плотности на колориметре используют соответствующий светофильтр. Величина оптической плотности должна находиться в рабочем диапазоне 0,2-0,5. Если же при измерении оптической плотности интенсивность окраски пробы находится за этими пределами, опыт необходимо повторить при большем или меньшем содержании фермента.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, допустимое относительное расхождение между которыми не должно превышать 10 %.

Обработка результатов

Целлюлалитическую активность рассчитывают по формуле, ед/г:

$$A = \frac{(A_{490}^{опыт} - A_{490}^{фон})K}{E},$$

где А опыт - оптическая плотность опытной пробы при 490 нм (с ферментом); А фон - оптическая плотность контрольной пробы при 480 нм (фон) (0,08-0,1); Е - концентрация фермента (г/л) в реакционной смеси (при проведении реакции, до добавления соляной кислоты); К - эмпирически определяемый коэффициент, учитывающий степень окраски целлюлозы, взаимосвязь между окраской в растворе и концентрацией восстанавливающих сахаров, а также время реакции.

Методы определения общей целлюлазной активности.

Метод определения активности по хлопковому волокну

За единицу активности принимается скорость гидролиза обезвоженного хлопкового волокна, выраженная в микромоль образующихся ВС в минуту (час, сутки) при рН, оптимальном для исследуемого фермента, и температуре 40 °С. Для характеристики препарата используют удельную активность, т.е. активность, рассчитанную на 1 г (мл) ферментного препарата.

Определение: 2 мг обезвоженного хлопкового волокна помещают в пробирку с пробкой, добавляют 2 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН 4,5-4,8), содержащего 1 мМ азида натрия, и вносят раствор фермента в количестве 0,02-3 мл (в зависимости от активности). Общий объем реакционной смеси должен составлять 6 мл. Поэтому если для определения используют меньше 3 мл раствора фермента, то перед его добавлением вносят соответствующий объем ацетатного буфера, Реакционную смесь инкубируют при 40 °С в течение 7 суток, после чего определяют концентрацию восстанавливающих сахаров по методу Шомоди—Нельсона.

Вискозиметрическое определение активности эндоглюканазы

Для определения вискозиметрической активности используют вискозиметры Оствальда или Убеллоде с внутренним диаметром капилляра 0,6—0,8 мм, объемом верхнего шарика 2-4 мл, временем истечения буфера (τ_0) 20-30с, погруженные в термостатируемый при 40 °С. В качестве субстрата используют растворимую КМ-целлюлозу средней вязкости. Раствор КМ—целлюлозы готовят такой концентрации, чтобы время его истечения составляло 110-130 с. Раствор (3-5 г/л) готовят при перемешивании и нагревании до 40-60 °С, используя 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 4,5. В случае, если КМ-целлюлоза растворима не полностью, раствор дополнительно центрифугируют для отделения гелевых частиц при 10000 об/мин. Раствор хранят в холодильнике и используют в течение 5-7 дней.

Определение: в сухой, тщательно вымытый вискозиметр вносят 5 мл раствора КМ-целлюлозы, термостатируют 5-7 мин и дважды определяют время истечения τ_0 (оно не должно изменяться более чем на 1 с). Затем микропипеткой вносят 0,02-0,1 мл предварительно центрифугированного или профильтрованного раствора фермента, отмечают по первому секундомеру время начала реакции и тщательно перемешивают смесь пропусканием через капилляр воздуха с помощью груши. Далее проводят первое измерение времени истечения реакционной смеси с помощью второго секундомера, регистрируя время I (время, прошедшее от момента внесения фермента до начала измерения времени истечения субстрата) по первому секундомеру. По окончании первого измерения реакционную смесь снова перемешивают и проводят второе измерение. Следует иметь в виду, что изменение времени истечения реакционной смеси не должно превышать 10—12 % от τ_0 , в противном случае ферментный препарат следует разбавить. При изменении времени истечения менее чем на 1-2с следует взять более концентрированный раствор препарата фермента.

Расчет активности осуществляют по формуле:

$$A = \frac{1}{x \cdot M_n \cdot [\eta] \cdot \tau_{0T, 0}^{7/8}} \times \left(\frac{d\eta_{0T}}{dt} \right) \times \frac{1}{[E]}$$

Здесь $[\eta]$ - характеристическая вязкость, определяемая для данной КМ—целлюлозы из зависимости η от концентрации субстрата; X - параметр уравнения Марка Хоувинка, для определения численного значения которого можно воспользоваться литературными данными; $M_{\text{п}}$ - среднечисловая молекулярная масса исходной КМ-целлюлозы, которая может быть определена из зависимости концентрации восстанавливающих сахаров от концентрации субстрата; $[E]$ - концентрация фермента; $\eta_{\text{от},0}$ - исходная относительная вязкость субстрата; $d\eta_{\text{от}}/dt$ - скорость падения относительной вязкости. Две последние величины целесообразно определять графически, поскольку истинное значение $\eta_{\text{от}}$ может значительно отличаться от значения $\eta_{\text{от},0}$ за счет разбавления исходного раствора КМ-целлюлозы при внесении ферментного препарата и изменения ионной силы. Для приближенных расчетов может быть использована более простая формула определения активности (в международных единицах - мкмоль/мин на 1 г ферментного препарата или 1 мл раствора фермента):

$$A_{\text{уд}} = \frac{K \cdot (r_0 - r_t)}{r_0 \cdot \left(\frac{r_0}{r_t}\right)^{7/8} \cdot [E] \cdot \left(t + \frac{r_t}{120}\right)}$$

где r_0 - время истечения ацетатного буфера (остальные обозначения см. выше в тексте). Величины r выражают в секундах, t - в минутах, концентрацию фермента $[E]$ в реакционной смеси — в г/л или мл/л. Коэффициент K лежит для многих видов КМ-целлюлозы в диапазоне 10-15.

Метод определения карбогидразы (эндо— и экзодеполимеразы гликозидазы) (методика определения активности β -глюканазы по окрашенному субстрату)

Субстрат представляет собой окрашенный природный полисахарид лихенин (β —1,3-1,4-глюкан), по внешнему виду это сыпучий порошок оранжевого цвета, растворимый в воде и буферных растворах.

Растворы: 1. Смесь кислот: 0,04 н. H_3PO_4 , 0,04 н. CH_3COOH , 0,04 H_3BO_3 .

2. 0,2 н. раствор NaOH.

3. Органический осадитель: 80 % C_2H_5OH , 5 % CCl_3COOH , 5 мМ $CaCl_2$.

4. Раствор субстрата: навеску субстрата ОЛ-11 (1,2 г) заливают 20 мл 0,2 н. N3014 и перемешивают при нагревании до полного растворения (5-6 мин). В охлажденном до комнатной температуры растворе доводят pH до 6,5 при помощи смеси кислот, после чего доводят объем до 100 мл в мерной колбе.

Определение активности

Раствор субстрата разливают в пробирки по 2 мл и термостатируют 5-6 мин при 30 °C . В раствор субстрата добавляют по 1 мл термостатированного раствора фермента. Время реакции 10 мин. Реакцию останавливают добавлением 3 мл охлажденного раствора органического осадителя и помещением пробирки с реакционной смесью в холодную водяную баню (10 °C). Образовавшийся осадок отфильтровывают через бумажный фильтр (красный фильтр). Оптическую плотность фильтрата измеряют при длине волны 490 нм (контрольный опыт проводят параллельно, добавляя раствор фермента в предварительно осажденный и охлажденный раствор субстрата). При величине $A_{490} > 1$ ферментный раствор следует разбавить и повторно определить активность. Предпочтительное время проведения реакции 10 мин.

При помощи субстрата ОЛ-11 ферментативную активность β -глюканазы определяют в условных единицах, равных скорости возрастания оптической плотности фильтрата реакционной смеси, (усл. ед./г или усл. ед./мл):

$$A = A_{490} / (Et),$$

где A — ферментативная активность, A_{490} - оптическая плотность фильтрата реакционной смеси; t – время, мин; E -концентрация ферментного препарата, г/л или степень разбавления культуральной жидкости.

Методы исследования термостабильности целлюлолитических ферментов

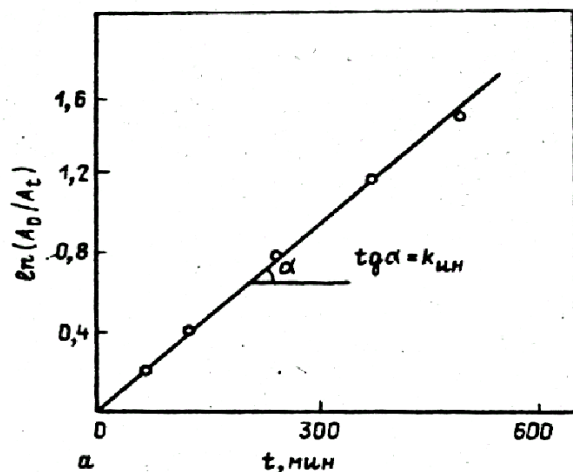
При исследовании термостабильности ферментов необходимо учитывать, что целлюлазный комплекс, гидролизующий целлюлозу, не является одним

индивидуальным ферментом, а представляет смесь ферментов, различающихся как по специфичности, так и по изоферментному составу в пределах одной компонентной группы (например, в состав целлюлазного комплекса могут входить несколько эндоглюканаз). Поэтому, если целлюлолитический фермент предварительно не выделен в индивидуальном (гомогенном) состоянии, при изучении его термостабильности исследователь, как правило, имеет дело с некой валовой активностью, отражающей вклад нескольких ферментов, даже если для оценки активности в процессе термоинактивации используется селективный метод ее определения (например, вискозиметрический метод определения эндоглюканазной активности или оценка β -глюкозидазной активности по целлюбозе).

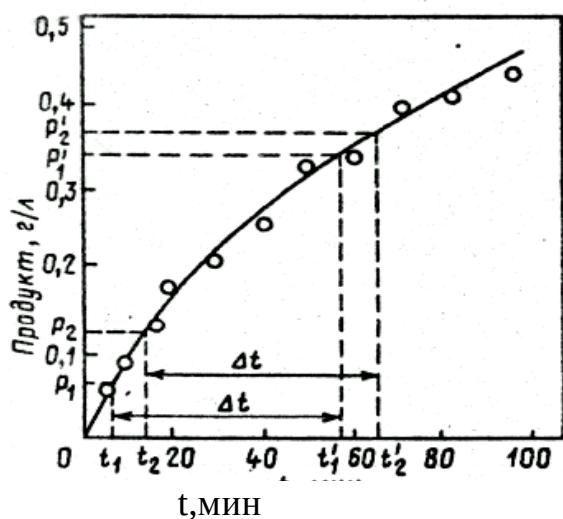
Для корректности эксперимента в предварительных опытах следует найти область линейной зависимости определяемой активности (например, эндоглюканазной, целлюбиазной, по фильтровальной бумаге и т.д.) от концентрации ферментного препарата путем измерения данного типа активности при различных разбавлениях раствора фермента. При исследовании термостабильности раствор ферментного препарата в буфере помещают в термостатируемую при определенной температуре пробирку или ячейку. В начальный момент и далее через определенные промежутки времени отбирают пробы объемом, достаточным для определения активности (обычно 1-2 мл). Пробы быстро охлаждают и определяют в них остаточную активность стандартными методами, при этом используют такое разбавление, чтобы не выходить за пределы линейной зависимости определяемой активности от концентрации фермента. Полученные результаты отражают на графике зависимости активности от времени инкубации при данной температуре. Исходную активность при этом обычно принимают за 100 %. Путем анализа полученных кривых термоинактивации в полулогарифмических координатах согласно известной формуле: $\ln A_0/A = K_{ин}t$,

где A_0 -начальная активности; A – активность в процессе инкубации; $K_{ин}$ - константа инактивации; t -время инкубации.

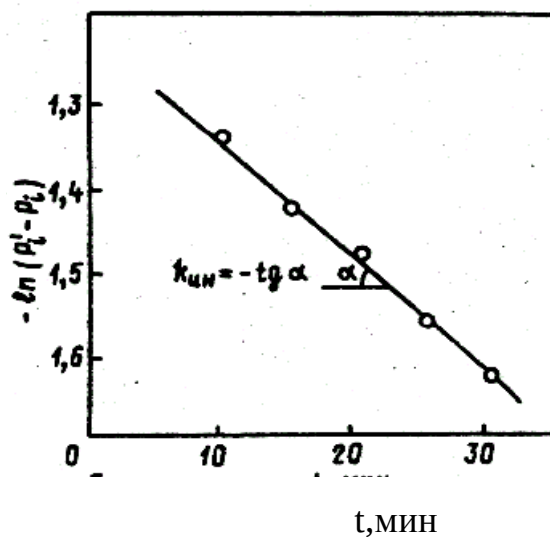
Необходимо сразу отметить, что данный метод имеет ряд ограничений, одно из которых заключается в том, что процесс инактивации фермента должен протекать по первому порядку (т.е. кривая инактивации должна линейризоваться в полулогарифмических координатах).



а



б



в

Рис. 51. Кривые инактивации фермента в полулогарифмических координатах (а) и кинетическая кривая образования глюкозы при гидролизе целлобиозы целлобиазой (б), линейризация ее по методу Гуггенгейма при определении константы скорости инактивации первого порядка (в)

Пример расчета константы инактивации фермента по методу Гуггенгейма приведен на рис.51. На графике зависимости концентрации продукта от времени на оси абсцисс выбирают отрезок Δt и путем изображенной на рис.51 графической

процедуры определяют разности $p_1' - p_1$; $p_2' - p_2$ и т.д. в различные моменты времени. Далее строят график зависимости' логарифма полученных разностей от времени, который должен представлять собой прямую линию с отрицательным наклоном, из тангенса угла наклона которой можно определить константу инактивации фермента (Кин) в присутствии субстрата. Сравнивая полученную константу с константой инактивации фермента в отсутствие субстрата, можно оценить эффект стабилизации фермента субстратом.

7.5. Методы определения пектолитической активности

Ферментативная активность пектинразлагающих анаэробных бактерий и ферментов пектолитической активности может быть оценена путем определения суммарной мацерирующей активности, выраженной в скорости обрыва пектинсодержащего субстрата (например, льняной ровницы или короткого льняного волокна). Чем меньше разрывная нагрузка образца, тем выше активность фермента. Относительные величины характеризуют активность ферментов и разрушающее действие их на пектиновые вещества межклетников. Данные методы являются хорошим способом определения мацерирующей активности культур и ферментов.

Существуют методы определения активности ферментов, основанные на оценке их специфической способности действовать на определенный субстрат, например пектина, или учитывают накапливающиеся продукты распада данного субстрата.

Простым методом определения активности синтезируемых бактериями пектолитических ферментов пектин-эстеразы и полигалактуроназы является чашечный Дингла. Его можно рекомендовать для проведения массовых анализов.

Метод Дингла основан на том, что учитывается величина зон, появляющихся в результате действия фермента на субстрат. Эти зоны

образуются вокруг заполненных испытуемой жидкостью лунок, сделанных в агаровой пластинке. Пектолитические ферменты диффундируют в толщу агара и гидролизуют пектин, содержащийся в агаре. Продукты гидролиза реагируют с соответствующими реактивами и таким образом проявляются (рис.52).

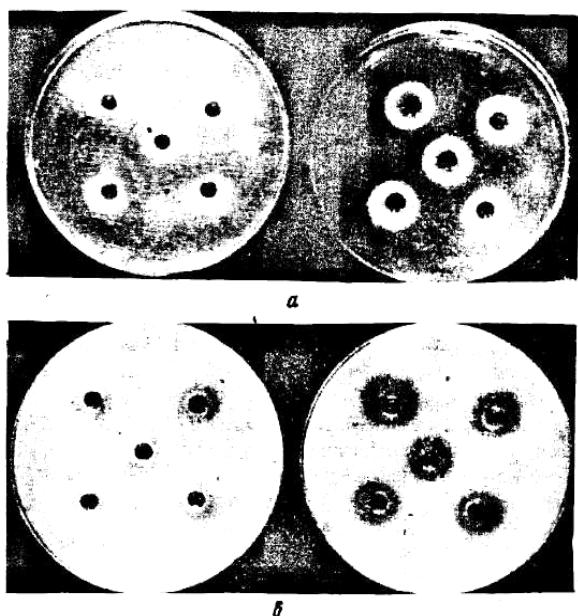


Рис .52. Чашечный метод Дингла и др. определения активности ферментов полигалактуроназы (а), пектин-эстеразы (б)

Активность пектин-эстеразы

определяют, используя субстрат, состоящий из 1 % раствора яблочного пектина, приготовленного на ацетатном буфере (рН 5,6), к которому добавляют 0,5 % раствор ацетата кальция и 2 % агара. Эту расплавленную среду

разливают в чашки Петри по 20 мл в каждую с тем, чтобы толщина агарового слоя составила 5 мм. Чашки слегка подсушивают. Затем пробочным сверлом вырезают в агаре лунки диаметром 5-8 мм. В лунки закапывают точно по 0,1 мл испытуемой жидкости. Пластинки оставляют на 1,5-2 суток при комнатной температуре для диффузии испытуемой жидкости в агар. По истечении указанного времени зоны проявляют 10 % раствором ацетата меди. Продукты гидролиза пектина дают с ацетатом меди темноокрашенные комплексные соединения, образуя кольца вокруг лунки. Об активности фермента судят по диаметру кольца.

Ход анализа следующий. Приготавливают 0,2 М раствор ацетатного буфера с рН 5,6. Для этого 54,4 г уксуснокислого натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят раствор до 2 л (раствор I), 5,7 г уксусной кислоты доводят в мерной колбе до 0,5 л дистиллированной водой (раствор II). Смешивают 1365 мл I раствора и 135 мл II раствора, получая 1500 мл буферной смеси. К 1500 мл полученной буферной смеси добавляют 7,5 г уксуснокислого

кальция, получают тройную смесь. Растирают в ступке 15 г яблочного пектина, постепенно добавляя тройную смесь и сливая в другую колбу. В колбу с пектином и буфером добавляют 30 г агара и оставляют его для набухания. Затем расплавляют и разливают в чашки Петри по 20 мл.

Активность полигалактуроназы определяют, используя субстрат, состоящий из 1 % раствора натриевой соли яблочного пектина (пектата натрия), приготовленного на цитратно-фосфатном буфере (рН 4,6), с добавлением 0,5 % раствора оксалата аммония и 2 % агара. Методика дальнейшей работы аналогична описанной выше для пектин-метилэстеразы, но проявление осуществляют 5 н. соляной кислотой. Продукты гидролиза пектата натрия окрашиваются в молочно-белый цвет, образуя кольца, по величине диаметра которых судят об активности фермента.

Ход анализа следующий. Приготавливают цитратно-фосфатный буфер с рН 4,6. Для этого растворяют 35,6 г двухосновного фосфорнокислого натрия (NaHPO_4) в дистиллированной воде, доводят раствор в мерной колбе до 1 л (раствор I).

Растворяют 19,2 г лимонной кислоты и доводят раствор дистиллированной водой в мерной колбе до 1 л (раствор II). Смешивают 892 мл I раствора и 708 мл II раствора, получая 1600 мл. Отливают 100 мл раствора. К 1500 мл полученной буферной смеси добавляют 7,5 г щавелевокислого аммония, получают тройную смесь. Растирают в ступке, постепенно добавляя в тройную смесь 15,0 г пектата натрия. К полученному раствору добавляют 2 % (30 г) агара, оставляют набухать, расплавляют и разливают по 20 мл в чашки Петри.

Приготовление пектата натрия: 100 г яблочного пектина встряхивают дважды по 20 мин со смесью 375 мл этилового спирта (95 %) + 125 мл 1н. NaOH. После этого пектат промывают смесью 200 мл этилового спирта (95 %) + 20 мл воды + 10 мл 1н. соляной кислоты; раствор отсасывают на воронке Бюхнера, а пектат сушат при температуре 37 °С.

Относительные показатели активности ферментов вычисляют по формуле:

$$A = \frac{2,5Vp}{2g}(D + d)(D - d),$$

где V – коэффициент объема жидкости, налитой в лунки, на 1 мл (если налито 0,1мл, то V = 10); g – количество бактериальных клеток, млн/мл: если пересчет не делают, то g не принимают во внимание; D – диаметр реакционного кольца (средний из 3–5 повторностей); d – диаметр лунки, сделанной в агаре.

Другие методы определения пектолитических ферментов описаны в ГОСТ 20264.3-74 «Препараты ферментные».

Активность пектат-транс-элиминазы (ПКТЭ) определяют по количеству окрашенных веществ, образующихся при реакции продуктов расщепления пектовой кислоты (полигалактуронидов) с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Количество этих веществ измеряют на спектрофотометре СФ-4 по поглощению ими света при длине волн 450 и 465 нм.

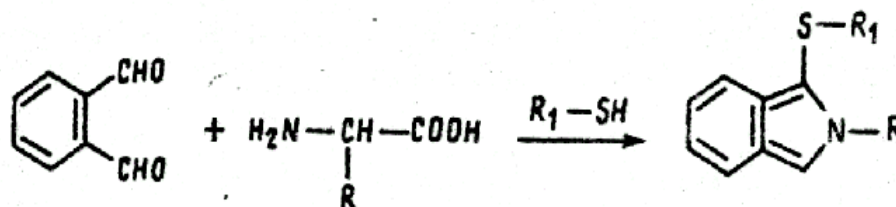
Ход определения активности ПКТЭ следующий. Смесь из одного объема ферментного препарата (изучаемой культуральной жидкости) с двумя объемами 0,75 % раствора пектина в 0,2 М натриево-ацетатном буфере с pH 5,2 и добавлением толуола инкубируют при температуре 37 °С в течение 6, 12 и 24 ч. После этого в пробирки добавляют по 10 мл ТБК, приготовленной следующим образом: 10 мл 0,01М раствор ТБК + 25 мл 1н. HCl + 0,5 мл воды. Пробирки держат на кипящей водяной бане 30 мин для проявления окраски. После охлаждения проб до комнатной температуры интенсивность их окраски сравнивают с контролем при длине волны между 450-465 нм. Контролем служит такая же смесь, но источник фермента инактивирован кипячением.

За единицу активности принимают такое количество фермента, в присутствии которого оптическая плотность повышается на 0,1 за 30 мин при стандартных условиях.

7.6. Методы определения активности протеаз

Определение протеолитической активности на основе офталиевого альдегида (ОФА)

ОФА — один из наиболее широко применяемых реагентов для количественного определения аминокрупп. Реакцию ОФА и β -меркаптоэтактола используют для флуориметрического определения аминов, аминокислот (за исключением пролина и цистеина), пептидов и белков концентрацией до 10^{-9} М. В результате реакции образуется 1-алкиларилтио-2-алкилизониндол с возбуждением при 340 нм и флуоресценцией при 455 нм (здесь R- остаток аминокислоты, пептида или белка, R₁ —алкил или арил):



При взаимодействии аминокислот с ОФА в присутствии меркаптоэтанол образующийся продукт реактива обладает ярко выраженным максимумом в УФ- спектре при 340 нм, что дает возможность спектрофотометрического определения аминокислот с использованием этого реагента. Методика дает возможность определять аминокислоты (за исключением пролина и оксипролина) в растворах с концентрацией выше $2 \cdot 10^{-5}$ М.

ОФА применяют для определения протеолитической активности (ПА) ферментных препаратов: это позволяет определять число разорванных пептидных связей при гидролизе белкового субстрата, что дает возможность выразить ПА в международных единицах.

Приготовление о-фталеевого реактива (для определения аминокрупп). К 30 мл 0,1М боратного буфера (рН 9,7) добавляют 0,5 мл этанольного раствора ОФА (концентрация 10 мг/мл) и 0,5 мл этанольного раствора меркаптоэтанол (5 мл меркаптоэтанол и 1 мл этанола).

Методика определения аминокрупп

Смешивают равные объемы исследуемого раствора концентрацией 0,02-0,3 мМ, стандартного раствора о-фталевого реагента и определяют значение оптической плотности реакционной смеси при 340 нм через 5-10 мин, но не позднее чем через 20 минут после смешивания (при 25 °С).

Приготовление о-фталевого реактива (для определения протеолитической активности)

К 2 мл этанольного раствора ОФА концентрацией 10 мг/мл добавляют 1 мл этанольного раствора меркаптоэтанола (концентрация 5 мл/100 мл этанола) и разбавляют до 200 мл 0,1 М боратым буфером (рН 9,3). Реагент стабилен в течение дня. А этанольный раствор ОФА – около месяца.

Методика определения протеолитической активности. 1 мл 0,75 % раствора субстрата модифицированного казеина (МКА-1) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2) термостатируют при T=30 °С в течение 5 мин, прибавляют 1 мл ферментного раствора (в контрольную пробу добавляют 1 мл и активированный кипячением в течение 2 мин ферментный раствор) и инкубируют 10 мин при T=30 °С, после чего выдерживают в кипящей водяной бане в течение 2 мин. В пробирки добавляют по 10 мл о-фталевого реагента перемешивают и выдерживают при T=30 °С в течение 15 мин. Определяют оптическую плотность на спектрофотометре при 340 нм против контрольной пробы.

ПА вычисляют по формуле, ед/г или ед/мл : _ ..

$$ПА = A_{340} / (ГЦtE),$$

где A₃₄₀- оптическая плотность раствора, ГЦ-глициновый эквивалент, определяемый по калибровочному графику (оптическая плотность, соответствующая 1 мМ глицина); t — время гидролиза субстрата в мин; E — концентрация ферментного препарата, г/л или степень разбавления культуральной жидкости.

За единицу активности принимают такое количество фермента, которое за 1 мин при 30 °С образует 1 мкмоль свободных аминокрупп.

Построение калибровочного графика

К 2 мл раствора глицина добавляют 10 мл о-фгалевого реагента, перемешивают и выдерживают при $T=30^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. Оптическую плотность определяют на спектрофотометре при 340 нм против контрольной пробы (вместо раствора глицина используют 2 мл дистиллированной воды). По полученным данным строят калибровочный график.

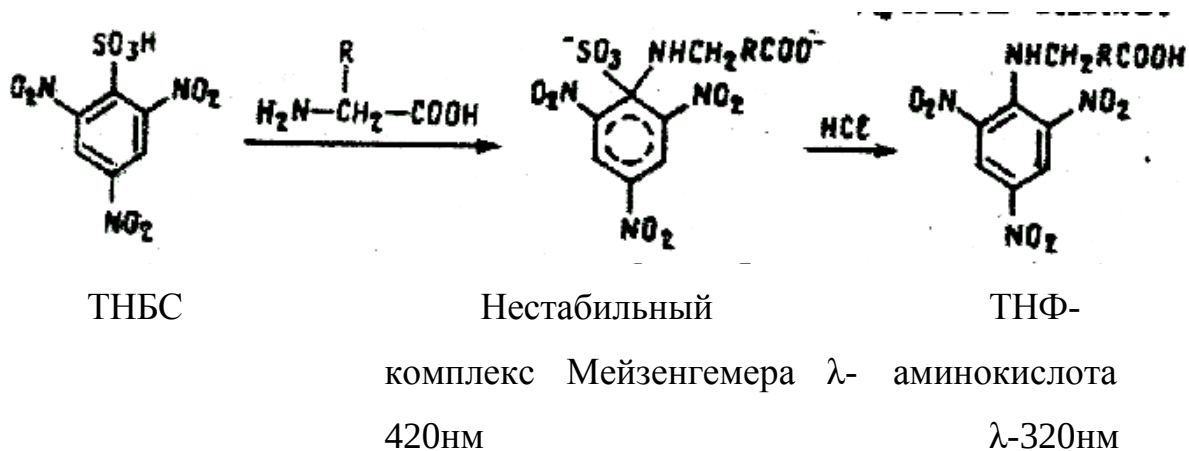
Субстрат МКА-модифицированный казеин

Субстрат представляет собой казеин с блокированными акриламидом аминокруппами. По внешнему виду - это блестящие пластинки белого цвета, хорошо растворимые в водных растворах при $\text{pH} > 5$. Массовая доля влаги 7 %, степень блокирования аминокрупп 92-98 %. Препарат стабилен при температуре не выше $+4^{\circ}\text{C}$ один год.

Определение протеолитической активности на основе 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты (ТНБС)

ТНБС широко применяют для количественного определения аминокрупп в аминокислотах, пептидах и белках (до 10^{-5} М). ТНБС в водной среде, при комнатной температуре количественно реагирует с первичными аминокруппами, образуя окрашенные производные, обладающие высоким молярным коэффициентом экстинкции при 340 нм (при подкислении реакционной смеси) и при 420 нм (когда поглощают комплексные соединения). На этой основе разработан спектрофотометрический метод количественного определения первичных аминов, аминокислот и пептидов концентрацией $0,1 \cdot 10^{-4}$ М.

Реакция происходит согласно схеме:



ТНБС является селективным реагентом для определения первичных аминогрупп, так как не реагирует с аминогруппами гистидина и пролина, с гидроксильными группами тирозина, серина, треонина, а также с водой и спиртами. Однако ТНБС реагирует с SH -группами, с ионами аммония, а также с карбонильными соединениями. Это мешает количественному определению аминогрупп, так как продукт реакции ТНБС с этими соединениями и с аминогруппами обладает близким абсорбционным максимумом в спектре. Поэтому в реакционную смесь добавляют сульфит натрия и измеряют поглощение сульфитных комплексов ТНФ-производных при 420 нм. Чувствительность метода составляет от $5 \cdot 10^{-6}$ М.

Метод ТНБС уступает по чувствительности методам, основанным на применении нингидрина, ОФА, но он не требует специальной аппаратуры и особо чистых реагентов. С помощью этого метода можно определять аминогруппы в широком интервале значений pH, где колориметрические методы не подходят.

Одна из областей применения метода ТНБС — определение ПА ферментных препаратов. Метод ТНБС позволяет определить число разорванных пептидных связей и выразить ПА в международных единицах. При помощи ТНБС с добавлением сульфита можно определять активности разных протеаз, независимо от субстрата и pH реакционной смеси, так как реакция ТНБС с аминогруппами и пептидами не зависит от условий проведения ферментативной реакции.

Определение аминокрупп с добавлением сульфита

К 2 мл раствора, содержащего $0,02 \cdot 10^{-2}$ до $0,8 \cdot 10^{-2}$ мкмоль аминокрупп, добавляют 10 мл 0,1 М боратного буфера (рН 9,3) и 1 мл 0,7 % раствора ТНБС в дистиллированной воде, перемешивают и термостатируют при 30 °С в течение 30 минут. После этого добавляют 1 мл 0,5 М раствора сульфита натрия, внося перемешивают и определяют оптическую плотность при 420 нм против контрольной пробы (ее готовят так же, только вместо раствора, содержащего аминокруппы, берут 2 мл дистиллированной воды).

Определение протеолитической активности с помощью ОКА-АС

Метод основан на гидролизе субстрата протеолитическими ферментами, прекращении реакции путем добавления трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и колориметрическом определении неосажденных окрашенных тирозин-гистипинсодержащих пептидов. Активность определяют следующим образом.

В пробирки наливают по 2 мл 1 % раствора субстрата ОКА—АС в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,2 и термостатируют при 30 °С . Через 5 мин в каждую пробирку добавляют по 0,5 мл раствора ферментного препарата и выдерживают при температуре 30 °С . Через 10 мин в каждую пробирку добавляют по 5 мл 0,5 М водного раствора ТХУ, чтобы остановить реакцию и осадить непрогидролизированный субстрат, и выдерживают 10 мин при 30 °С для обеспечения полного осаждения. Затем фильтруют через плотный бумажный фильтр (синяя лента) или центрифугируют и определяют интенсивность окраски раствора на спектрофотометре при 400 нм против контрольной пробы.

Контрольную пробу готовят аналогично опытному гидролизату, добавляя 1 мл инаktivированного кипячением в водяной бане (3 мин) ферментного раствора. Активность определяют по формуле, усл. ед./г или усл. ед./мл: $ПА = A_{400} / (E \cdot t)$, где А — оптическая плотность фильтрата

реакционной смеси; t - время реакции, мин; E - концентрация ферментного препарата, г/л или степень разбавления культуральной жидкости.

Список рекомендуемой литературы к главе

1. Еремина, К.И. Текстильные волокна, их получение и свойства / К.И. Еремина, Б.В. Борухсон. – М.: Легкая индустрия, 1966. – 308 с.
2. Номенклатура ферментов: рекомендации Международного биохимического союза. – М.: Изд-во ВИНТИ, 1979. – 321 с.
3. Рубан, Е.Л. Микробные липиды и липазы / Е.Л. Рубан. – М., 1977.
4. Степаненко, Б.Н. Химия и биохимия углеводов (полисахаридов). – М., 1978.
5. Клёсов, А. А. Ферментативный гидролиз целлюлозы: Ч. II. Свойства компонентов целлюлазных комплексов из различных источников / А.А. Клесов, М.Л. Рабинович, И.В. Чурилова // Биоорган. химия. – 1980. - Т. 6. - №9. - С. 1377-1395.
6. Румянцева, Г.Н. Очистка и характеристика двух типов р-глюкозидаз: целлобиазы и арил-глюкозидазы / Г.Н. Румянцева, Н.А. Родионова, Л.И. Мартинович // Сб. «Целлюлазы микроорганизмов». – М.: Наука, 1981. – С. 83–93.
7. Клёсов, А. А. Ферментативный гидролиз целлюлозы: Ч. IV. Влияние физико-химических и структурных факторов субстрата на эффективность ферментативного гидролиза / А.А. Клесов, А.П. Сеницын // Биоорган. химия. – 1981. – Т.7. – № 12. – С. 1801–1812.
8. Сеницын, А.П. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов / А.П. Сеницын, В.М. Черноглазов, А.В. Гусаков // Итоги науки и техники АН СССР. "Биотехнология". – М., 1990. – Т.25. – С.152.
9. Бендер, М. Биоорганическая химия ферментативного катализа / М. Бендер, Р. Бергерон, М. Комияма – М.: Мир, 1987. – 186 с.
10. Березин, И.В. Исследования в области ферментативного катализа / И.В. Березин. – М.: Наука, 1991. – 387 с.
11. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А. Овчинников. – М.: Просвещение, 1987. – 815 с.

12. Коэн, Ф.Ф. Регуляция ферментативной активности / Ф.Ф. Коэн. – М.: Мир, 1986 – 136 с.
13. Анисимов, А.А. Основы биохимии: учеб. для вузов / А.А. Анисимов, А.Н. Леонтьева, И.Ф. Александрова. – М.: Высш. шк., 1986. – 551 с.
14. Николаев, А.Н. Ферменты / А.Н. Николаев. – М.: Наука, 1981. – 365 с.
15. Номенклатура ферментов: рекомендации Международного биохимического союза. – М., 1966. – 434 с.
16. Галич, И.П. Амилазы микроорганизмов / И.П. Галич. – Киев: Наукова думка, 1987. – С. 64.
17. Кислухина, О. Биотехнологические основы переработки растительного сырья / О. Кислухина, Кундюлас И. – Каунас.: Технология, 1997. – 183 с.
18. Капитонова, Л.С. Пектинолитические ферменты *Clostridium felsineum*, мацерирующие стебли льна: автореф. дис. Капитонова Л.С. канд. биол. наук /– М., 1973. – С.18.
19. Попова, Ж.П. Пектинолитические ферменты некоторых пектинразлагающих клостридов / Ж.П. Попова // Бюллетень ВНИИ сельск. хоз. микробиологии. – 1979. – С. 18–21.
20. Баразненко В.А. Выделение и свойства эндоглюканаз и ксиланаз *Chaetomium cellulolyticum*: автореф. дис. Баразненко В.А. канд. хим. наук / В.А. Баразненко – М., 1999. – с.
21. Гребешова, Р.Н. Использование микробных ферментных препаратов в СССР / Р.Н. Гребешова. – М.: ОНТИТЭИ микробиопром, 1982. – 44 с.
22. Паспорт безопасности энзимного препарата: ГОСТ 20264.4-74. – Тр 10-04-03-6-86. – М.: Отдел пищевой промышленности, подотдел спиртовой, дрожжевой и ликероводочной промышленности. Всесоюзный научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии, 1988.
23. Каталог культур Всесоюзной коллекции непатогенных микроорганизмов. – М.: Наука, 1976. – 110 с.
24. Бояркин, А.Я. Быстрый метод определения активности пероксидазы / А.Я. Бояркин // Биохимия. – 1951. – Т.16. – №4. – 352 с.
25. Рухлядева, А.П. Метод определения активности гидролитических ферментов / А.П. Рухлядева, Г.В. Помиалина. – М.: Легк. и пищ. пром-сти, 1981. – 288 с.

8. Методы оценки глубины и степени модификации субстратов растительного и животного происхождения

8.1. Методы определения сахаров

Определение степени конверсии и расщепления крахмала

Навеску гидрогеля 5-6 г, переносят в колбу на 500 мл и разбавляют горячей дистиллированной водой. Встряхивая колбу смесь перемешивают, охлаждают и доводят объем водой до 500 мл. Через 24 часа на глубине 1/3 цилиндра пипеткой отбирают 100 мл отстоя и переносят в взвешенную чашку. Раствор упаривают на водяной бане и сушат при 100-105 °С до постоянного веса. Содержание расщепленного крахмала рассчитывали по формуле: $X = (A \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100) / HC$, где X – процент расщепленного крахмала, %; A – сухой остаток отобранной пробы отстоя в 100 мл, г; 5– переводной коэффициент; H– навеска гидрогеля, взятая для анализа, г; C – сухой остаток гидрогеля, %.

Методы определения восстанавливающих сахаров

В результате ферментативного гидролиза целлюлозы образуются сахара, содержащие концевые восстанавливающие группы. Поэтому анализ, выделяющихся в ходе ферментативной реакции восстанавливающих (редуцирующих) сахаров, является важным методом оценки степени модификации целлюлозы.

Наибольшее распространение получили такие методы, как Шомоди-Нельсона, динитросалициловый, феррицианидный. Следует, однако, учитывать, что поскольку в результате ферментативного гидролиза целлюлозы помимо глюкозы могут образовываться целлобиоза и другие олигосахариды, содержащие на одну молекулу вне зависимости от ее длины одну восстанавливающую группу, перечисленные методы не позволяют найти истинную концентрацию сахаров, а позволяют только оценить содержание концевых восстанавливающих групп сахаров в

растворе. Концентрация сахаров при этом, как правило, выражается в глюкозных эквивалентах.

Метод Шомоди-Нельсона

В данном методе анализа используются два реактива.

Реактив Шомоди: раствор А:

24 г безводного Na_2SO_4 и 12 г виннокислого калия-натрия растворяют в 250 мл дистиллированной воды. К полученному раствору добавляют при перемешивании раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 г в 40 мл воды) и далее – 19 г NaHCO_3 .

Раствор Б: 180 г Na_2SO_4 растворяют в 500 мл горячей (80°C) воды и кипятят в течение 5 минут. Раствор А смешивают с раствором Б и доводят до 1000 мл. Полученный раствор голубоватого цвета представляет собой реактив Шомоди со сроком хранения в темной посуде 2 месяца. Реактив Нельсона: 25 г молибдата аммония растворяют в 450 мл горячей (60°C) дистиллированной воды. Раствор охлаждают до $5-10^\circ\text{C}$ и добавляют 21 мл концентрированной серной кислоты, содержащей 3 г арсената натрия. Объем раствора доводят до 500 мл. Смесь инкубируют при 40°C в течение 24-48 часов и затем фильтруют. Срок хранения реактива 2 месяца.

Принцип метода основан на первоначальном окислении восстанавливающих сахаров, образовавшихся при ферментативном гидролизе целлюлозы, реактивом Шомоди в щелочной среде (pH 9) с образованием закиси меди и последующим окислением арсено-молибдатным реактивом Нельсона в кислой среде (pH 1,7-2,0) с образованием молибденовой сини, окраска которой устойчива в течение 24-36 ч.

Эксперимент по определению восстанавливающих сахаров выглядит следующим образом. В градуированную пробирку объемом 15-20 мл вносят 1 мл реактива Шомоди и 1 мл исследуемого раствора. Пробирку помещают на 40 мин в кипящую водяную баню, затем охлаждают и добавляют 1 мл

реактива Нельсона. Пробирку встряхивают и доводят объем жидкости водой до 10 мл. Определяют оптическую плотность полученного раствора в 1 см – кювете при длине волны 610 нм, используя в качестве сравнения раствор, приготовленный таким же путем, но с дистиллированной водой вместо пробы. Концентрацию восстанавливающих сахаров определяют с помощью калибровочного графика по глюкозе в качестве стандарта. Калибровочный график имеет линейный вид в диапазоне концентраций глюкозы $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ М (20-180 мкг/мл) (рис.53).

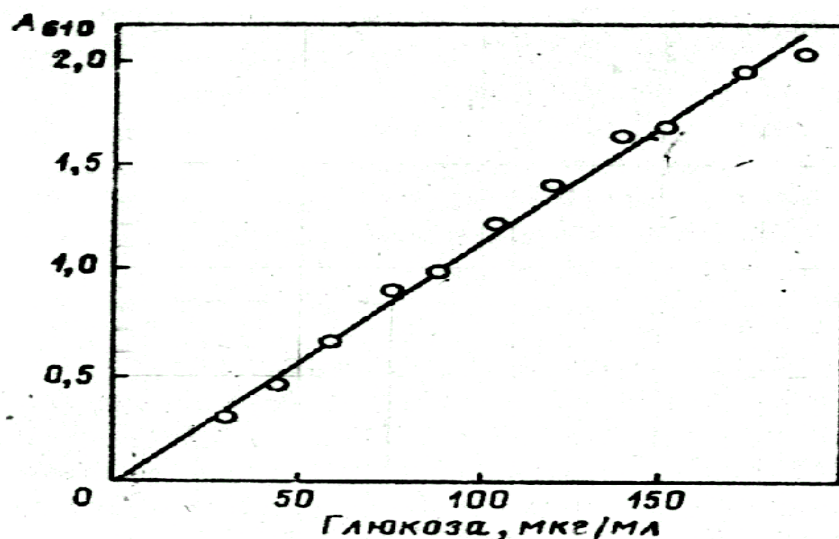


Рис.53. Калибровочный график для определения восстанавливающих сахаров по методу Шомоди-Нельсона

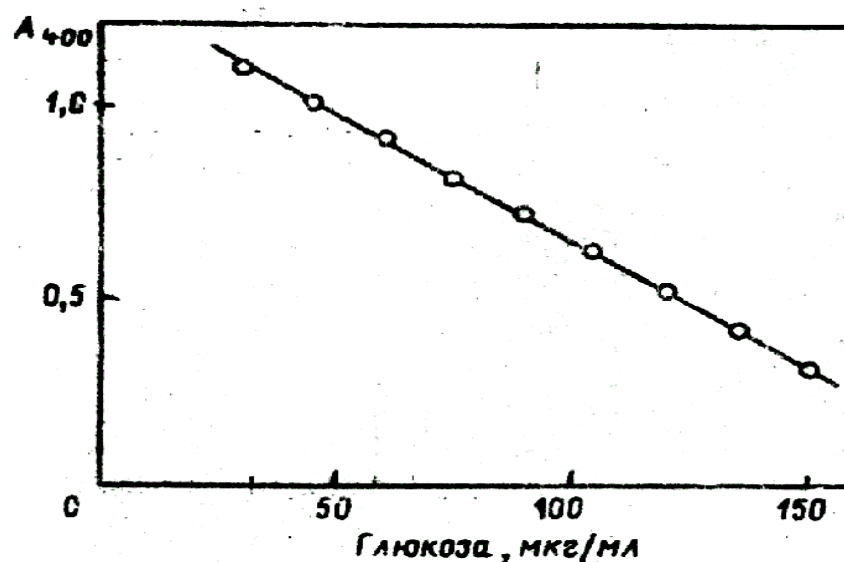


Рис.54. Калибровочный график для определения восстанавливающих сахаров феррицианидным методом

Возможно определение редуцирующих (восстанавливающих) сахаров путем измерения оптической плотности окрашенных продуктов в результате ферментативного гидролиза крахмального полисахарида.

Феррицианидный метод: для определения восстанавливающих сахаров в пробирку вносили 1 мл анализируемого раствора и 3 мл феррицианидного реактива. Смесь кипятили на водяной бане в течение 10 мин, охлаждали и измеряли интенсивность окраски на длине волны 400 нм относительно дистиллированной воды. Концентрацию восстанавливающих сахаров определяли по калибровочному графику, используя в качестве стандарта глюкозу (рис.54).

Фенолсерноокислый метод: в пробирку вносили 1 мл исследуемого раствора, 1 мл 5 % фенола и 5 мл концентрированной (95-96 %) серной кислоты. Смесь тщательно перемешивали и охлаждали при комнатной температуре в течение 20-30 мин. Измеряли оптическую плотность полученного раствора на длине волны 490 нм относительно дистиллированной воды. Количество восстанавливающих сахаров определяли с помощью калибровочного графика, используя в качестве стандарта глюкозу. Желто-оранжевая окраска раствора стабильна в течение нескольких часов.

8.2. Методы определения степени повреждения целлюлозы

Окрашивание метиленовым голубым. Образец льняного волокна массой 1 г помещали на 20 мин без нагревания в раствор метиленового голубого концентрации 1 г/л, отжимали и прополаскивали в кипящей воде до тех пор, пока краситель не перестанет переходить с волокна в воду. Химически поврежденная целлюлоза закрашивается метиленовым голубым очень интенсивно, а неповрежденная целлюлоза весьма незначительно. Поврежденное шерстяное волокно (ортокортеса) также хорошо окрашивается растворами основных красителей.

Определение степени повреждения целлюлозы по окрашиванию смесью уксуснокислого свинца и хромовокислого калия. Образец льняного волокна массой 0,5 г обрабатывают 1 % раствором уксусно-кислого свинца в течение 5 мин, тщательно промывают и после этого обрабатывают 1 % раствором хромовокислого калия. В местах образования оксигеллюлозы появляется желтая окраска хромовокислого свинца $PbCrO_4$.

Определение степени повреждения целлюлозы по окрашиванию прямым чисто-голубым. Краситель прямой чисто-голубой закрашивает химически повреждённую целлюлозу менее интенсивно, чем неповреждённую. Окрашивание прямым чисто-голубым проводят в растворе красителя концентрацией 1 г/л, при модуле ванны 50, раствор нагревают до кипения и продолжают крашение в остывающей ванне в течение 20 мин, затем образец промывают в холодной воде до чистой воды.

Определение содержания альдегидных групп. В колбу помещали 10 мл 0,05 н. раствора буры ($pH = 9,2$) и 20 мл 0,03 н. раствора йода при температуре $25^{\circ}C$. Перемешав, быстро вносили 0,1 г исследуемой целлюлозы. После 6 часов реакции при температуре $25^{\circ}C$ в колбу добавляли 15 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты и избыток йода оттитровывали в присутствии крахмала (2 – 3 мл 0,5 % раствора крахмала) 0,015 н. раствором сернисто-кислого натрия. Содержание альдегидных групп рассчитывали по формуле, %:

$$E_{-CHO} 0,015(V - V_1)100/1000q$$

где $E_{-CHO} = 14,51$; V и V_1 - количество сернисто-кислого калия, пошедшего на титрование в контрольном и основном опыте, мл; q – навеска волокна, г.

Определение содержания карбоксильных групп. В колбу вносили 0,5 г обеззоленной целлюлозы 50 мл воды и 30 мл свежеприготовленного 0,5 н. раствора уксуснокислого кальция. После двух часов реакции целлюлозу отфильтровывают и 70 мл фильтрата титруют 0,01 н. раствором едкого натра в присутствии индикатора, в качестве которого применяли смесь 1:20 0,02 % растворов крезолового красного и тимолового синего. 1 мл 0,01 н. раствора

едкого натра, пошедшего на титрование выделившейся уксусной кислоты, соответствует 0,00045 г групп COOH.

Вискозиметрический метод определения степени повреждения целлюлозы. Степень повреждения целлюлозы льняного волокна определяли по величине удельной вязкости 0,1 % растворов целлюлозы в медноаммиачном реактиве согласно ГОСТ 8837-83. Материалы текстильные. Методы определения вязкости растворов целлюлозы.

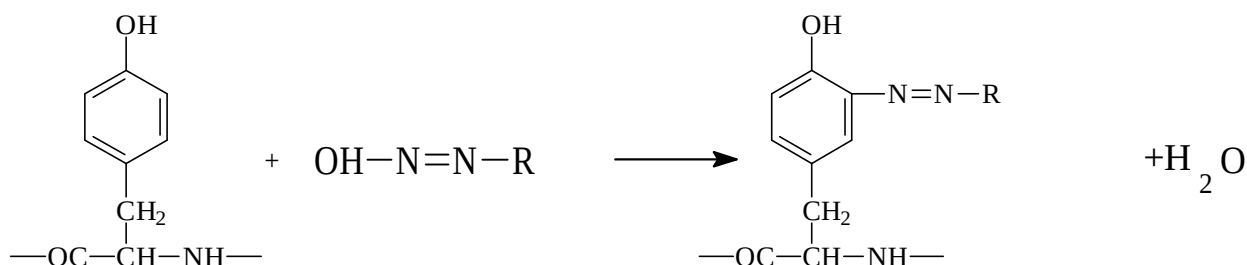
8.3. Методы определения повреждения кератина шерсти и ланолина.

Определение содержания серы в шерстяном волокне

Метод основан на окислении серы до сульфата при одновременном разрушении органического вещества с последующим осаждением сульфата хлористым барием. Предварительно обезжиренный и промытый образец волокнистого материала весом 0,3 г помещали в колбу Кьельдаля и обрабатывали 10 мл смеси кислот-окислителей, приготовленной из равных объемов 72 % хлорной и азотной кислот плотности 1,53. После охлаждения реакционную смесь переносили в стаканчик и осаждали серу хлористым барием в виде BaSO₄. Через 3 ч осадок фильтровали и взвешивали на аналитических весах. Содержание серы рассчитывали в процентах к весу абсолютно сухой навески. Для неповрежденной шерсти содержание серы составляет 3,5-4 %.

Определение степени повреждения поверхности шерстяного волокна при помощи диазореакции Паули

Метод основан на образовании азокрасителя при взаимодействии тирозина коркового слоя с диазосоединением по схеме:



1 г волокнистого материала обрабатывали при температуре 20 °С в течение 2 мин в растворе, содержащем: 0,1 г диазоля алого К, растворенного в 25 мл дистиллированной воды, 5 мл 1 % раствора кальцинированной соды. Интенсивность окраски увеличивается пропорционально степени повреждения волокна. Одновременно с испытуемым образцом обрабатывали волокнистый материал, не подвергавшийся повреждению. Сравнивая интенсивность окраски по величине K/S у обоих образцов, судили о степени повреждения.

Определение содержания карбоксильных групп в шерсти

Метод основан на образовании свободной уксусной кислоты при взаимодействии карбоксильных групп шерстяного волокна с ацетатом кальция. Навеску шерстяного волокна массой $0,5 \pm 0,0001$ г, заливают 50 мл дистиллированной воды, не содержащей CO₂, и 30 мл свежеприготовленного 0,5 н. раствора уксуснокислого кальция. После 6-8 часов реакции при комнатной температуре шерсть отфильтровывают на стеклянной воронке. 70 мл фильтрата титруют 0,01 н. раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина и смешанного индикатора (смесь 1:2 0,02 % растворов крезолового красного и тимолового синего) от зеленого до серого цвета с розовым отливом. Количество образовавшихся карбоксильных групп (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{0,00045 \cdot 100 V_{NaOH} 0,01}{m_H},$$

где V_{NaOH} – объем 0,01 н. едкого натра, пошедшего на титрование, мл; m_H – масса навески, г; 0,00045 – соответствует 1 мл 0,01 н. раствора едкого натра, пошедшего на титрование выделившийся уксусной кислоты.

Определение степени растворимости шерстяного волокна в растворе гидроксида натрия.

Метод основан на установлении потери веса испытуемым образцом за счет растворения образовавшихся при повреждении шерсти продуктов

гидролиза кератина. Навеску волокна массой 1г, взвешенную на аналитических весах с точностью до четвертого знака, обрабатывали 0,1 н. раствором гидроксида натрия при модуле 50, выдерживали в термостате в течение 1 часа при температуре 65 °С, отфильтровывали на стеклянной воронке и тщательно промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывной жидкости. Навеску переносили в бюкс и высушивали до постоянного веса при температуре 105 °С. Параллельно с испытуемым образцом анализировали образец неповрежденной шерсти. Разность в весе образца до и после технологической обработки, выраженная в процентах к весу абсолютно сухого образца неповрежденной шерсти, является мерой повреждения шерсти при технологической обработке.

Определение растворимости шерсти в растворе мочевино-гидросульфитного реагента (МГР)

Метод определения растворимости шерсти в мочевино-гидросульфитном растворе тот же, что и при определении растворимости шерсти в щелочах, только в данном случае обработку неповрежденной шерсти проводили в мочевино-гидросульфитном растворе, содержащем 50 % мочевины, 3 % гидросульфита натрия. Количество растворенной шерсти (X, %) определяли по формуле:

$$X = \frac{a_1(100 - W) - a_2}{a_1(100 - W)} 100 ,$$

где a_1 - исходная навеска шерсти, г; a_2 - остаток, высушенный до постоянной массы, г; W - влажность исходного волокна, %.

Чем больше нарушены поперечные связи, и чем короче цепи главных валентностей, то есть чем меньше молекулярный вес протеина, тем в большей мере при обработке в растворителях образец потеряет в весе.

Определение степени набухания шерстяного волокна

Степень набухания определяли по водопоглощению путем погружения шерсти на 1 час при 20 °С в раствор первичной и вторичной кислой натриевой

соли ортофосфорной кислоты (рН=5,95) с последующим центрифугированием жидкости. Затем шерсть взвешивали в мокром состоянии, тщательно просушивали и снова взвешивали. В качестве характеристики набухания рассматривали отношение веса адсорбированного раствора к весу сухого волокна.

Метод определения кислотного числа основан на титровании свободных жирных кислот в эфирно-спиртовой смеси жира водным раствором щелочи. Навеску жира 3 г, взвешенную на аналитических весах с точностью до 0,0002 г, полностью растворяли в 50 см³ смеси диэтилового эфира и этилового спирта (2:1) и титровали 0,1 н. спиртовым раствором КОН в присутствии 2-3 капель 1 % раствора фенолфталеина до появления слабо-розовой окраски, устойчивой в течение 30 с. Кислотное число (*КЧ*, мг КОН на 1г жира) вычисляли по формуле:

$$КЧ = \frac{5,611VK}{m},$$

где 5,611 – титр 0,1 н. раствора едкого кали, мг/см³; *V* - объем 0,1 н. раствора едкого кали, затраченного на титрование, см³; *K* - поправка к титру; *m* - масса исследуемого жира, г.

Метод определения числа омыления основан на омылении глицеридов (связанных жирных кислот) и нейтрализации свободных жирных кислот раствором едкого кали. К навеске жира 1 г, взвешенной на аналитических весах с точностью до 0,0002 г, приливали 25 см³ 0,5 н. спиртового раствора едкого кали. Омыление проводили с воздушным холодильником на водяной бане в течение 1 ч, не допуская улетучивания спирта. Полученный прозрачный еще неостывший мыльный раствор титровали 0,5 н. раствором соляной кислоты в присутствии 2-3 капель 1 % раствора фенолфталеина до исчезновения розовой окраски. Параллельно в тех же условиях проводили контрольный опыт: кипятили 0,5 н. спиртовой раствор едкого кали в количестве, равном взятому на омыление жира. Число омыления (*ЧО*, мг КОН на 1г жира) рассчитывали по формуле:

$$ЧО = \frac{(V_1 - V_2)28,05K}{m},$$

где V_1 - количество 0,5 н. раствора соляной кислоты, израсходованной на титрование щелочи в контрольном опыте, см^3 ; V_2 - количество 0,5 н. соляной кислоты, израсходованной на титрование свободной щелочи, оставшейся после омыления в опыте с пробой, см^3 ; m - масса исследуемого жира, г; 28,05 - титр 0,5 н. раствора соляной кислоты по едкому кали, мг/см^3 ; K - поправка к титру 0,5 н. раствора соляной кислоты.

Эфирное число определяли по разности между числом омыления и кислотным числом

$$ЭЧ = ЧО - КЧ.$$

Метод определения йодного числа основан на свойствах ненасыщенных жирных кислот присоединять галогены по месту двойных связей. Навеску жира 0,2 г, взвешенную на аналитических весах с точностью до 0,0002 г, растворяли в 10 см^3 хлороформа, осторожно взбалтывая содержимое. Затем прибавляли 25 см^3 раствора Кауфмана, перемешивали и оставляли в темном месте в конической колбе с притертой пробкой на 1 ч. Параллельно в аналогичных условиях ставили контрольный опыт без навески жира. По истечении времени в колбы приливали по 20 см^3 10 % раствора йодистого калия и 50 см^3 дистиллированной воды, взбалтывали и выделившийся йод титровали 0,1 н. раствором тиосульфата натрия до получения светло-желтой окраски. После добавления 5-6 капель 1 % раствора крахмала титрование продолжали до полного исчезновения синего окрашивания.

Приготовление раствора Кауфмана. В 1 дм^3 метилового спирта растворяли 140 г бромистого натрия. Раствор тщательно перемешивали и оставляли на 24 ч. По истечении указанного срока прибавляли 5,1 см^3 брома.

Йодное число ($ЙО$, $\text{мг I}_2/100$ г) рассчитывали по формуле:

$$ЙЧ = \frac{(V_0 - V)K0,01269 \cdot 100}{m},$$

где V_0 - количество 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованное в контрольном опыте, см^3 ; V - количество 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованное в рабочем опыте, см^3 ; 0,01269 - титр 0,1 н. раствора тиосульфата натрия по йоду, г/см^3 ; K - поправка к титру 0,1 н. раствора тиосульфата натрия; m - масса исследуемого жира, г.

Метод определения температуры плавления ланолина основан на определении температуры, при которой жир, перейдя из твердого состояния в жидкое, становится прозрачным. В капиллярную трубку диаметром 1,5 мм и длиной 50 мм засасывали расплавленный и профильтрованный жир высотой столбика около 10 мм и оставляли в покое в течение 2 ч на льду. Затем капилляр прикрепляли к термометру тонким резиновым кольцом так, чтобы столбик жира был на одном уровне с ртутным шариком термометра. Термометр с капилляром закрепляли на штативе и погружали в стакан с мешалкой и прокипяченной дистиллированной водой. Верхний конец столбика жира был на 2 см ниже уровня воды. Воду в стакане медленно нагревали в начале испытания со скоростью не более 2°C в минуту, а в конце определения — не более 1°C в минуту (перед переходом в жидкое состояние). Температурой плавления считали ту температуру, при которой жир становился полностью прозрачным и при расплавлении под напором горячей воды вытеснялся и поднимался в капилляре. Расхождение между результатами параллельных определений не превышало $0,5^\circ\text{C}$.

8.4. Методы определения химического состава целлюлозных волокон.

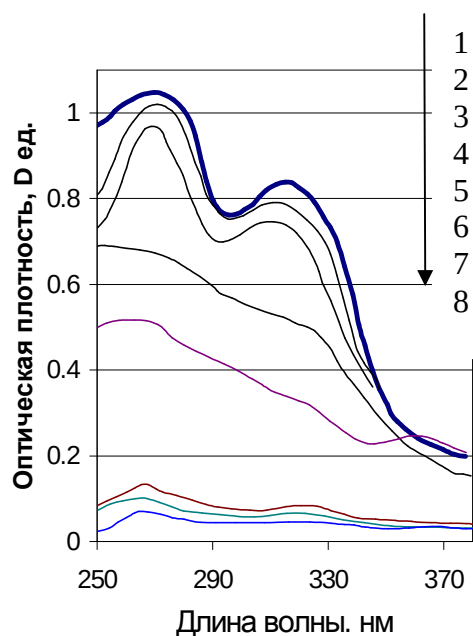
Методы определения лигнина

Гидролитический весовой метод основан на обработке волокнистого материала концентрированной серной кислотой. При этом все углеводы, азотистые вещества гидролизуются и переходят в раствор, а лигнин остается нерастворимым. Мелко нарезанную навеску волокнистого материала в количестве ~ 1 г (с точностью до 0,0002 г) экстрагировали бензолом в аппарате

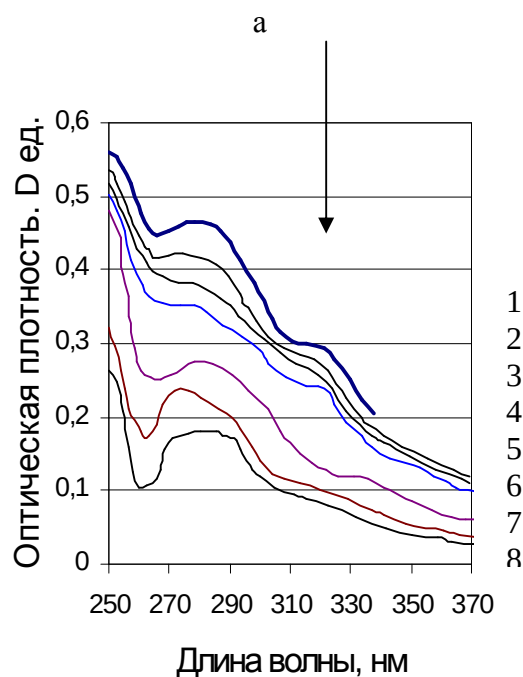
Сокслета метиловым эфиром в течение 8 ч. Затем высушенный волокнистый материал обрабатывали 72 % серной кислотой. По окончании гидролиза лигнин в виде темно-коричневых хлопьев отфильтровывали, промывали горячей водой до отрицательной реакции промывных вод на ионы серной кислоты. Количество лигнина X определяли по формуле, %:

$$X = \frac{A \cdot 100}{B}, \text{ где } A - \text{масса абсолютно сухого лигнина, г; } B - \text{масса}$$

абсолютно сухого волокнистого материала, взятого для анализа, г.



- 1-нативный лен (длинноволокнистый);
- 2-эндополигалактуроназа;
- 3-Вискозим;
- 4-Пектофетидин П10 Х, Целлюлаза 100;
- 5-щелочная отварка (концентрация гидроксида натрия 50 г/л);
- 6-щелочно-пероксидное беление;
- 7-ферментативно-пероксидное беление (ферментативная обработка композицией 4);
- 8-гипохлоритно-пероксидное беление.



- 1-нативная хлопковая шелуха;
- 2-Вискозим;
- 3-Пектофетидин, Целлюлаза 100;
- 4-Вискозим, Целлюзим;
- 5-Вискозим, пероксидное беление;
- 6-Пектофетидин, Целлюлаза-100-пероксидное беление;
- 7-Вискозим, Целлюзим-пероксидное беление;
- 8-щелочно-пероксидное беление.

Рис. 55. УФ спектры диоксановых экстрактов лигнина длиноволокнистого льна № 6 (а) и хлопковой шелухи (б)

В основу **спектрофотометрического метода определения содержания лигнина в льняном волокне** положено свойство раствора лигнина давать в ультрафиолетовой области отчетливый максимум поглощения при длине волны 280 нм (рис. 55).

Размельченное волокно (до пуха) в количестве 10 мг помещали в пробирку, смачивали 0,2 мл 1 н. HCl и заливали 5 мл диоксана. Измерения выполняли на спектрофотометре СФ-26 при длинах волн от 260 до 380 нм. Кювету для сравнения заполняли диоксаном. Степень удаления лигнина рассчитывали по формуле:

$$L = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \cdot 100\%$$

где D_1 , D_2 - оптические плотности сурового и обработанного волокна соответственно .

Суммарное содержание примесей в целлюлозных волокнистых материалах. Степень очистки ткани от сопутствующих веществ устанавливали по мутности сернокислотных растворов целлюлозы. Метод основан на том, что целлюлоза, свободная от примесей, легко растворяется в серной кислоте с образованием глюкозы, растворы которой являются абсолютно прозрачными. Наличие в волокне примесей ведет к тому, что растворы получаются более или менее мутными, и чем больше на ткани примесей, тем выше мутность растворов. Для определения мутности навеску измельченной ткани, массой 0,1 г, предварительно выдержанную в эксикаторе в течение суток при относительной влажности 65 %, взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,0001 г, затем растворяли ее в 5 мл серной кислоты (93 %) на холоду в течение 3-х часов. Полученный раствор переносили в мерную колбу на 50 мл, добавляли 1 мл раствора неионогенного смачивателя типа ОП-10 концентрацией 1 г/л и разбавляли до метки дистиллированной водой. На фотоэлектрическом колориметре ФЭК-56 определяли оптическую плотность сернокислых растворов целлюлозы. Измерения проводили с синим светофильтром при длине

волны 450 ± 10 нм. Кювету сравнения заполняли 10 % раствором серной кислоты. Степень удаления примесей (В) рассчитывали по формуле, %:

$$B = \frac{D_c - D_o}{D_c} 100,$$

где D_c , D_o – соответственно оптические плотности растворов после растворения исходной суровой и обработанной ткани.

Объемный метод определения пентозанов основан на том, что фурфурол определяется объемным путем при действии на него смеси бромида и бромата в кислой среде. На одну молекулу фурфурола расходуется 4 атома брома по реакции: $C_5H_4O_2 + 2Br_2 = C_5H_4O_2Br_4$.

Для определения пентозанов берут такую навеску волокнистого материала, в которой пентозанов содержится в пределах 0,03 – 0,26 г. Этому условию соответствует навеска хлопка или льна величиной 3–5 г. Измельченную навеску, взвешенную с точностью до 0,001 г, помещают в круглодонную колбу емкостью 400 мл. Колбу плотно закрывают пробкой с двумя отверстиями, в одно из которых вставляется воронка с краном, а в другое – изогнутая стеклянная трубка, соединенная с холодильником. Под свободный конец холодильника подставляется градуированный цилиндр (приемник). Через воронку в колбу вводится 100 мл 12 % соляной кислоты, после чего колбу начинают нагревать на масляной или песчаной бане, следя при этом за смачиванием волокнистого материала. Температуру бани повышают до 145 – 150 °С и при этой температуре ведут отгонку. Необходимо всегда соблюдать одинаковые условия при повышении температуры, так как в противном случае наблюдается плохая сходимость результатов. Отгоняемую жидкость собирают в градуированный цилиндр (приемник). При переходе в приемник каждые 30 мл дистиллята в колбу из воронки добавляют свежую порцию кислоты в количестве 30 мл. Кислоту добавляют постепенно, так чтобы не прекращалось кипение жидкости; 30 мл дистиллята должны быть отогнаны в течение 10 мин. Эту операцию продолжают до тех пор, пока реакция на фурфурол не станет

отрицательной, т. е. когда бумажка, смоченная уксуснокислым анилином, перестанет давать малиново-красную окраску с каплей перегнанной жидкости.

Дистиллят фурфурола разбавляют в мерной колбе 12 % соляной кислотой до объема 500 мл. В две конические колбы с притертыми пробками наливают пипеткой по 25 мл 0,1 н. раствора бромидов и броматов натрия (калия). В одну коническую колбу добавляют 200 мл дистиллята фурфурола, в другую – 200 мл 12 % соляной кислоты (контрольный опыт). Колбы закрывают и оставляют в темноте на один час. Затем в каждую колбу добавляют по 10 мл 10 % раствора йодистого калия. Выделившийся свободный йод оттитровывают 0,1 н. раствором тиосульфата натрия. Количество брома, пошедшего на реакцию с фурфуролом, определяют по разности тиосульфата, израсходованного на контрольный и основной опыты. Количество фурфурола определяют согласно реакции, по которой на одну молекулу фурфурола расходуется четыре атома брома. Эквивалент фурфурола равен 24. Для пересчета фурфурола на пентозаны пользуются эмпирическим коэффициентом 1,88.

Определение трудногидролизуемых полисахаридов

Остаток на фильтре после удаления легкогидролизуемых полисахаридов переносят количественно в стакан на 100 мл и подсушивают при 50-60 °С до воздушно-сухого состояния, а затем обрабатывают 15 мл 80 % раствора серной кислоты при комнатной температуре в течение 2 ч при периодическом перемешивании стеклянной палочкой.

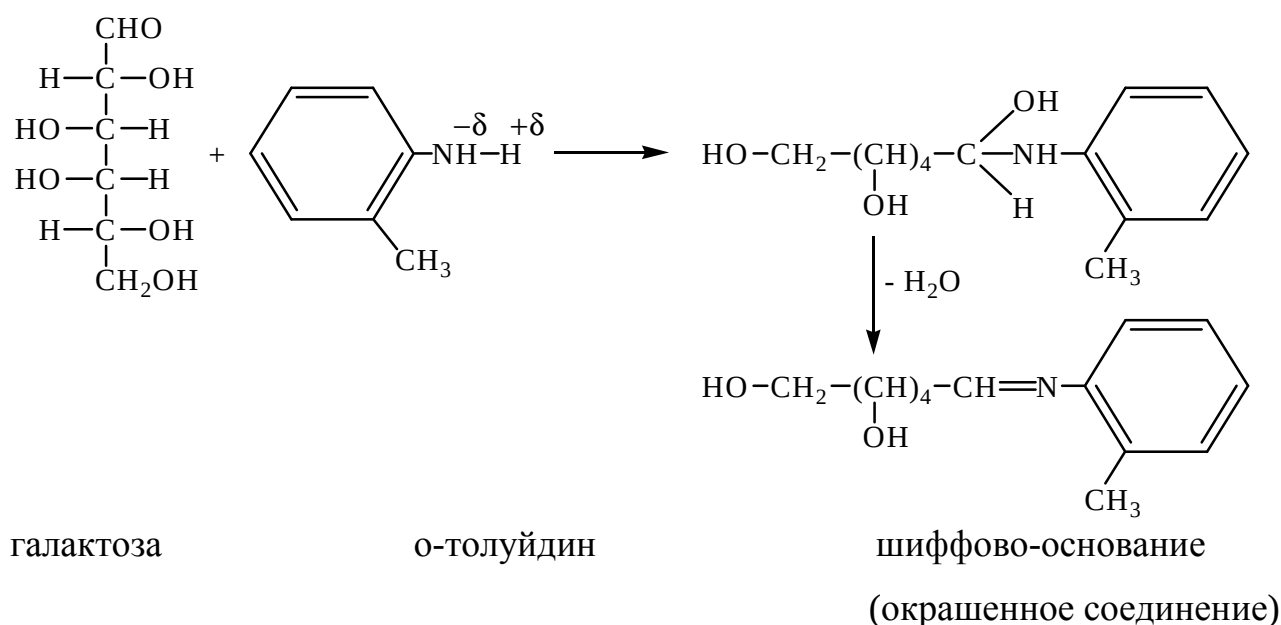
Смесь из стакана количественно переносят в колбу на 500 мл, смывая ее 200 мл воды. Затем колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на плитке (при слабом кипении) в течение 3 ч. Раствор после нагревания фильтруют при отсасывании через бумажный фильтр на воронке с сетчатым дном и остаток на фильтре промывают горячей водой до отрицательной реакции на серную кислоту (индикатор — метилоранж).

Фильтрат и промывные воды соединяют вместе и доливают раствор водой в мерной колбе до 500 мл (кислый гидролизат); 25 мл этого раствора нейтрализуют 2 н. раствором щелочи (индикатор — метилоранж) и доводят

объем водой до 100 мл. Далее определяют содержание ВС и рассчитывают количество трудногидролизуемых полисахаридов. Определение углеводного состава гидролизатов производится при помощи хроматографии (ВЭЖХ или ГЖХ).

Общее содержание гексозанов в растительной ткани можно вычислить по содержанию гексоз, определенных хроматографически в гидролизатах легко и трудногидролизуемых полисахаридов. Для этого суммируют количество глюкозы, галактозы и маннозы, обнаруженных в гидролизатах легко- и трудногидролизуемых полисахаридов, вычисленное в процентах к навеске исходной растительной ткани. Полученную сумму умножают на коэффициент 0,9. Содержание целлюлозы вычисляется на основании хроматографического анализа смеси сахаров в гидролизате трудногидролизуемых полисахаридов. Для этого количество глюкозы, вычисленное в процентах и отнесенное к исходной растительной ткани, умножают на коэффициент 0,9. Приблизительно можно считать, что содержание целлюлозы равно содержанию трудногидролизуемых полисахаридов. Определение целлюлозы по содержанию глюкозы в гидролизатах трудногидролизуемых полисахаридов дает наиболее приближающиеся данные к истинному содержанию ее в растительных тканях.

Спектрофотометрический метод определения содержания пектиновых веществ основан на цветной реакции полисахаридов различной природы с о-толуидиновым реагентом, протекающей по схеме:



Ход эксперимента: навеску льна, около 1 г, предварительно измельчённую, помещали в колбу, заливали 100 мл (1 % раствор) лимоннокислого аммония (трёхзамещённого) и кипятили с обратным холодильником в течение 1 часа. Полученный экстракт отфильтровывали в колбу на 250 мл, остаток снова заливали 100 мл раствора лимоннокислого аммония и экстракцию повторяли. Экстракт отфильтровывали в ту же колбу, остаток на фильтре промывали горячей водой. Экстракт и промывные воды охлаждали и доводили до метки дистиллированной водой.

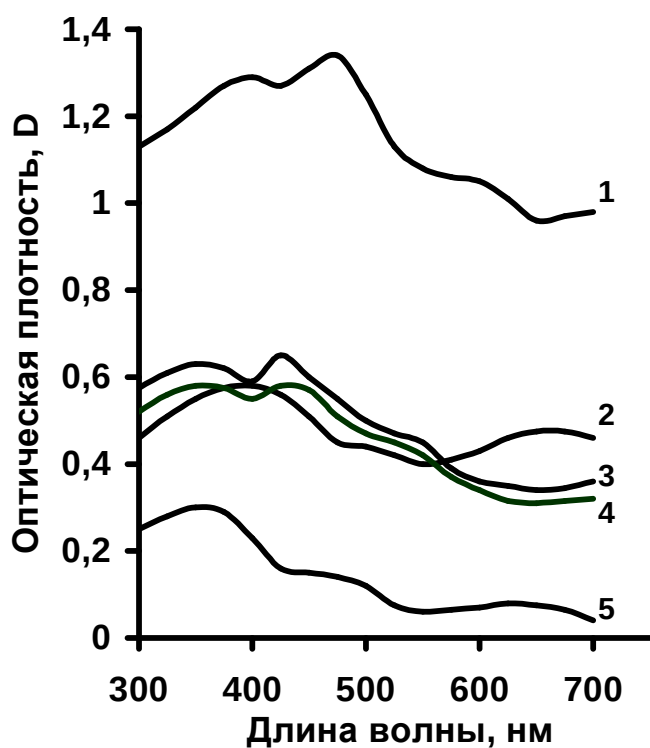
Экстракт пектиновых веществ из мерной колбы смешивали с 4 н. раствором H_2SO_4 в объёмном соотношении 50:50 и кипятили с обратным холодильником в течение 3 часов. Гидролизат охлаждали и нейтрализовали равным объёмом 2 н. раствора соды. В пробирку вносили 0,5 мл нейтрализованного гидролизата, добавляли 4 мл о-толуидинового реагента и смесь нагревали 30 минут на кипящей водяной бане. После нагревания смесь охлаждали и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 590 нм, в качестве контрольного служил раствор, состоящий из 0,5 мл воды и 4 мл о-толуидинового реагента. Затем измеряли оптическую плотность нейтрального раствора гидролизата (холостой раствор), разбавленного в 9 раз, по отношению к дистиллированной воде.

Методика приготовления о-толуидина: 150 мл ледяной уксусной кислоты, 60 мл свежеприготовленного над цинковой пылью о-толуидина, 50 г лимонной кислоты, 0,75 г тиомочевины и 5 г борной кислоты смешивали, доводили водой до 500 мл и хранили при 0 °С в тёмной склянке .

Степень удаления пектиновых веществ рассчитывали по формуле, %:

$$\Pi = \frac{D_c - D_1}{D_c} 100$$

где D_c и D_1 – оптические плотности растворов сурового и обработанного волокна (рис.56).



1-необработанное волокно;

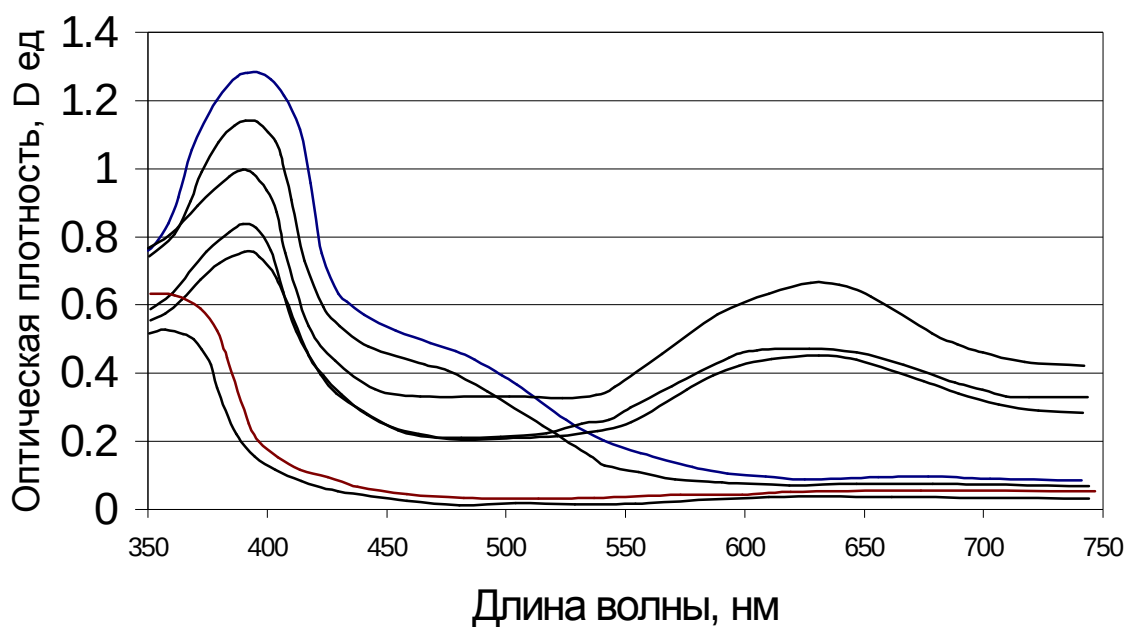
2-щелочная отварка;

3-ферментативная модификация композицией пектиназ (полигалактуроназная активность 36 ед/г белка);

4-ферментативная модификация композицией пектиназ (полигалактуроназная активность 100 ед/г белка);

5- ферментативная модификация композицией пектиназ и гемицеллюлаз (препарат МЭК-1.)

а



б

1-ксилоза, 2-арабиноза, 3-галактоза, 4-глюкоза, 5-манноза, 6-галактуроновая кислота, 7-глюкуроновая кислота

Рис.56. Спектры поглощения экстрагированных полисахаридов длиноволокнистого льна (стланцевая ровница) (а) и нативных веществ (б) с о-толуидиновым реагентом

Определение пектиновых веществ кальций-пектатным методом

Навеску льна, около 1 г, предварительно измельчённую, помещали в колбу, заливали 100 мл (1 % раствор) лимоннокислого аммония (трёхзамещённого) и кипятили с обратным холодильником в течение 1 часа. Полученный экстракт отфильтровывали в колбу на 250 мл, остаток снова заливали 100 мл раствора лимоннокислого аммония и экстракцию повторяли. Экстракт отфильтровывали в ту же колбу, остаток на фильтре промывали горячей водой. Экстракт и промывные воды охлаждали и доводили до метки дистиллированной водой.

Из мерной колбы отбирали 100 мл экстракта пектиновых веществ, переносили в стакан на 300 мл и прибавляли 10 мл 1 н. NaOH для омыления эфиров. Раствор оставляли на ночь в тёмном месте, после чего к нему добавляли последовательно при перемешивании по 50 мл 1 н. CH_3COOH и CaCl_2 (11,1 г/л) и опять оставляли на ночь. Затем нагревали до кипения и горячий раствор фильтровали через стеклянный фильтр №2. Осадок промывали сначала холодной водой для удаления лимоннокислого кальция (проба на кальций щавелевой кислотой), затем горячей водой до отрицательной пробы на ионы хлора (проба с нитратом серебра).

Осадок на фильтре высушивали до постоянной массы при 105 °С. Содержание пектиновых веществ вычисляли по формуле, %:

$$\text{ПВ} = (2,5a0,9235 K_3100)/C,$$
 где a – масса кальций-пектата, г; C – навеска абсолютно сухого волокнистого материала, г; 0,9235 – коэффициент пересчёта концентрации кальций-пектата на концентрацию пектиновой кислоты; K_3 – коэффициент экстракции.

Метод определения содержания в растительных волокнах воскообразных веществ

Навеску льна 1 г, предварительно измельченную, помещают в гильзу из фильтровальной бумаги и вставляют в экстракционный аппарат Сокслета.

наливают растворитель (изопропиловый спирт). Аппарат устанавливают на песчаной бане или электрической плитке и нагревают при работающем водяном холодильнике 4 часа. Концентрированный раствор переливают в бюкс известной массы (с точностью 0,001). Колбу ополаскивают 2-3 раза 5 мл растворителя, собирают в бюкс, который высушивают в сушильном шкафу до постоянного веса при $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ и взвешивают. Содержание экстрагируемых веществ вычисляют по отношению к абсолютно сухому волокну.

Методы растровой электронной микроскопии

Поверхностные свойства волокон (например льна) изучают методом электронной растровой микроскопии со сканирующим устройством марки TESLA BS 300. Подготовку образцов проводят вакуумным напылением платины по стандартной методике. Фотографическую запись изображения осуществляют с кинескопа размером 100x75 (Разрешающая способность 10 Нм (100 А), ускоряющее напряжение составляет 1 – 49 Вт, изменяемое скачками 1 кВт).

Методика получения микросрезов пряжи для световой микроскопии. Для получения микросрезов пряжи приготавливаются твердые блоки на основе метилметакрилата с зафиксированными внутри них отрезками пряжи. На одном из концов блока под микроскопом нарезается усеченная пирамидка (основание 1 мм, высота 2 мм). Из готовых блоков на ультрамикротоме УМТП-2 с помощью стеклянных ножей нарезаются поперечные срезы, толщина которых подбирается экспериментально, чтобы обеспечить четкие контуры наблюдаемых объектов. Для выявления характера распределения шлихты срезы подкрашиваются 0,1 % водным раствором J_2 в КJ и просматриваются в световом потоке микроскопа МБИ-3. Для микрофотографирования используют специальную микронасадку и красный фильтр, обеспечивающий необходимый контраст. Приведенная методика позволяет наблюдать неискаженную картину распределения шлихты в поперечном сечении пряжи, поскольку полимер на основе метилметакрилата характеризуется низким коэффициентом усадки, т.е. не сжимает заливаемый объект.

ИК-спектроскопическое исследование. Метод основан на определении зависимости интенсивности поглощения электромагнитных колебаний ИК-диапазона от их частоты. Измерение проводили на приборе Avatar E.S.P. Для характеристики колебаний использовали волновое число, показывающее, сколько раз данная волна уместится на отрезке длиной 1 см. Метод ИК-спектроскопии шерстяного волокна. Для спектрофотометрических измерений образцы готовили путем тщательного измельчения шерстяного волокна и прессования с измельченным KBr под давлением 100 МПа. Навеска KBr 0,3 г, навеска волокна 1% от навески KBr. Регистрацию данных измерений проводили самописцем на спектрофотометре с призмами NaCl и LiCl в области частот $400\text{--}4000\text{см}^{-1}$. Метод ИК-спектроскопии ланолина шерсти: анализируемый образец ланолина наносили в виде пленки на прозрачную в ИК-области пластину из KRS $\varnothing 50 \times 2,7\text{мм}$. Регистрацию спектров проводили на бумажном бланке, калиброванном по волновым числам в обратных сантиметрах от 400 до 4000см^{-1} .

8.5. Методы оценки эффективности обработки материалов

Методика определения степени расшлихтовки на ткани

Образец суровой и расшлихтованной ткани размером 5x5 см пропитывают эквимолярным раствором бикарбоната натрия (NaHCO_3) и карбонатом натрия (Na_2CO_3) (т.е. 2,3 грамма каждого реактива на 1000 мл дистиллированной воды), отжимают на лабораторной плюсовке и сразу пропитывают 0,03 н. раствором йода. Далее отжатые образцы сушат в открытом сушильном шкафу при температуре $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение часа и определяют коэффициент отражения при длине волны 540 нм на приборе Special-11. Балльная система представлена следующим рядом:



Расчет степени удаления крахмальной шлихты с ткани осуществляют по формуле: $I = (1 - R) / R$, где R – коэффициент отражения, а степени расшлихтовки: $C = ((I_{иск} - I_{обр}) / I_{обр}) 100 \%$, где $I_{иск}$ - интенсивность отражения окраски сурового образца ткани, $I_{обр}$ - интенсивность отражения окраски после расшлихтовки.

Определение мягкости и драпируемости

Образец ткани 6х4 см закрепляют узкой стороной на приборе со встроенным транспортиром мягкости. Мягкость рассчитывают по углу провисания по формуле: $\frac{Y_{обр} - Y_{сур}}{Y_{сур}} 100\%$, где $Y_{обр}$ – угол отклонения

обработанного образца; $Y_{сур}$ – угол отклонения сурового образца.

Драпируемость ткани определяли по методу иглы. Образец ткани 20х40 см размечали по схеме: 2,5 см от краев — две точки и 6,5 см к центру образца — две точки. Образец накалывали по точкам на иглу и закрепляли в штативе. По прошествии 30 минут, не снимая образца с иглы, измеряли его ширину (A). Драпируемость (D) рассчитывали по формуле: $D = 100 - 0,5A$.

Определение усадки и плотности ткани

Усадку тканей определяли в соответствии с ГОСТ 5012-82. Метод основан на определении изменения расстояний между метками, нанесенными на элементарную пробу тканей, после мокрой обработки. Изменение линейных размеров испытуемого материала после мокрой обработки ($l, \%$) вычисляли по формуле:

$$l = \frac{L_1 - L_0}{L_0} 100,$$

где L_1 - расстояние между метками после обработки; L_0 - расстояние между метками до обработки.

Поверхностную плотность тканей определяли в соответствии с ГОСТ 3811-72 . Метод определения основан на взвешивании анализируемого образца ткани площадью 1м^2 на весах предписанной точности.

Определение сминаемости ткани

Метод определения сминаемости ткани основан на образовании складки ткани и ее измерении. Полоску ткани размером 15x130мм вырезали по основе и утку, укладывали на прибор СТ-I, перегибали по пластинкам (75x20x05 мм), которые вынимали после установки груза. Полоску ткани выдерживали под нагрузкой в течение 5 мин. Удельное давление на ткань составляло $0,5\text{ Ккг/см}^2$. По истечении времени смятую полоску при помощи пинцета брали за верхний конец и осторожно опускали на стеклянную пластинку. После 3 мин «отдыха» ткани, стеклянную пластинку с лежащей на ней складкой ткани переносили на предметный столик микроскопа. Для измерения высоты складки к левой рукоятке кремальеры прикреплена круглая шкала, а к основанию микроскопа круглая стрелка. Вращением рукоятки кремальеры наводили резкость сначала на основание, а затем вершину складки. Высоту складки определяли по формуле:

$$h = (A_1 - A_2)m,$$

где m - цена деления (0,1); A_1 - показание круглой шкалы при наблюдении основания складки; A_2 - показания круглой шкалы при наблюдении вершины складки.

Определение стойкости ткани к пилингообразованию и истиранию

Стойкость ткани к пилингообразованию определяли в соответствии с ГОСТ 9913-90 (СТ СЭВ 5784-86) . Испытания проводили до образования максимального количества пиль на площади 9 см^2 с помощью шаблона-кольца.

Максимальное количество пиль на 1 см^2 испытуемого материала вычисляли по формуле:

$$K = \frac{K_1}{S},$$

где K_1 - среднее значение максимального количества пиль на пробе; S - площадь, на которой подсчитывают количество пиль, см^2 .

Стойкость ткани к истиранию до разрушения (образования дыр) определяли в соответствии с ГОСТ 9913-90 (СТ СЭВ 5784-86)]. Число циклов истирания фиксировали счетчиком.

8.6. Методы определения физических и физико-механических свойств волокон.

Для **определения прочности волокна** образец волокна помещают между зажимами ($L=17 \text{ мм}$) и подвергают деформированию со скоростью 15 мм/мин . Показания регистрируются автоматически на приборе КСП-4. Разрывное или предельно-возможное удлинение рассчитывается по формуле, %:

$$e = \frac{l_{\text{дл}} V_{\text{л}}}{l_{\text{обр}} V_{\text{дл}}} 100,$$

где $l_{\text{дл}}$ - величина деформации образца, измеряемая по диаграммной ленте, мм; $V_{\text{дл}}$ - скорость движения диаграммной ленты, мм/мин; $l_{\text{обр}}$ - зажимная длина образца. $l_{\text{обр}} = 17 \text{ мм}$; $V_{\text{л}}$ - скорость движения нижнего зажима, $V_{\text{л}} = 15 \text{ мм/мин}$.

Разрушающее или предельно-возможное напряжение, кгс/мм² :

$$s = \frac{p + 0,0477}{S},$$

где P - величина разрывной нагрузки, определяемая по диаграммной ленте, кгс; S - площадь поперечного сечения образца, мм²; $0,0477$ - масса нижнего зажима, кг.

Также для определения прочности волокна использовали разрывную машину РМ. Принцип действия машины РМ сходен с принципом действия

прибора КСП-4. Отличительной особенностью является иная скорость деформации, $V_d = 60$ мм/мин и зажимная длина, $l_{обр.} = 52$ мм.

Расчетные формулы следующие:

$$e = \frac{l_o}{l_{обр}} 100 \%, \quad \text{где } l_{обр} = 52 \text{ мм};$$

l_o - длина деформации до разрыва, фиксируется на машине, мм.

$$\sigma = \frac{P}{S} \text{ кг/мм}^2,$$

где P - величина разрывной нагрузки, фиксируется на машине, кгс; S - площадь поперечного сечения, мм².

Методика определения расщепленности, тонины и линейной плотности волокна

Метод применяется для лубяных волокон и характеризует не только толщину волокон, но и способность их к дальнейшему расщеплению. Для этого заготавливают пряжи волокон определенной длины и делают из них вырезки длиной L_s - 10 мм, массой M_s , мг. Затем подсчитывают общее число вырезанных волокон n_o следующим образом: целое волокно и расщепленное менее чем на половину своей длины считают за одно волокно каждое, расщепленное более чем на половину своей длины волокно — за столько волокон на сколько концов оно расщеплено.

Линейная плотность расщепленных волокон рассчитывается, текс:

$$T_p = \frac{1000M}{L_s n_o}, \quad \text{где } n_o - \text{условное число волокон с учетом концов,}$$

расщепленных более чем на 0,5 (обычно $0,5L_s = 5$ мм).

Метрический номер волокна определяют по формуле:

$$N = \frac{10 \text{ н}}{g},$$

где l_0 - длина волокна, мм; n - число волокон в пучке с учетом расщепленности; g - вес пучка, мг (0,2 мг).

Для **определения тонины натуральных волокон** готовят препарат исследуемого волокна, представляющий собой коротко нарезанные одиночные волокна, которые помещают на стеклянную подложку, заливают глицерином и накрывают стеклышком так, чтобы не оказалось пузырьков воздуха. Изображение исследуемого волокна проецируется на экран микроскопа LANATESTER (увеличение $\times 50$) и затем с помощью системы шаблонов производится подбор известного диаметра. Делают не менее 50-ти измерений в соответствии с ГОСТ 17514-93. Результаты измерений обрабатывали с применением стандартного приложения программы MS Excel «Описательная статистика».

Жесткость волокна измеряют на приборе конструкции ИВНИТИ КМ-20-М. Рассчитывали по формуле (для прибора конструкции Н.С.Павлова, при диаметре крутильного диска 6,3 см, весе - 24,3 г, длине волокна - 15 см) с периодом колебаний 100 секунд.

$C = 10000/t^2$, где t - период раскручивания, замеренный по секундомеру.

Для **определения длины волокна** приготовленный с ровным концом штапель посредством прибора рассортировывают по длине с определенным интервалом, равным 1-2 мм. Волокна каждой длины взвешивают на торсионных весах и находят их процентное содержание к весу всего образца. Строят диаграмму распределения волокон по длине. Среднюю длину волокна определяют в соответствии с ГОСТ 21244-75. В пробе, состоящей из 1000 волокон, измеряют последовательно каждое волокно, относя его к определенному классу длины. Обработку цифрового материала проводят по формуле:

$$L_{cp} = \frac{\sum p_i l_i}{\sum p_i},$$

где L_{cp} - средняя длина волокна, мм; p_i - содержание волокон каждого класса, %; l_i - средняя длина волокон данного класса, мм.

Равномерность волокна по длине характеризуется базой, т.е. процентным содержанием волокон пяти наиболее часто встречающихся в образце длин, взятых с интервалом 1 мм. базой S . Для сравнения равномерности волокна различных длин существует показатель равномерности волокна R , равный произведению базы на модальную длину.

Методика определения гигроскопичности и поглотительной способности

Навеску волокна помещают в взвешенные бюксы с открытыми крышками. Выдерживают в сушильном шкафу при 105 °С в течение 4 часов, охлаждают, взвешивают в эксикаторе. После определения веса вносят в эксикатор с водным раствором H_2SO_4 на двое суток. Затем взвешивают и рассчитывают содержание поглощенной влаги в процентах к сухой навеске.

Метод определения поглотительной способности

Основан на измерении количества воды, которое способна поглотить абсолютно сухая навеска волокна, согласно ГОСТ 5556-81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия. Поглотительную способность определяют по формуле:

$K = n \cdot 100 / m(100 - W_{\phi})$, где n^* – количество воды, поглощённое воздушно-сухой навеской волокна, г; m – масса воздушно-сухой навески волокна, г; W_{ϕ} – фактическая влажность волокна, %.

Метод определения содержания коротких волокон (менее 5 мм) (ГОСТ 5556-81)

Основан на расчёте процентного содержания коротких волокон и пыли от общего объёма навески волокна, выделенных при растаскивании на отдельные слои навески волокна.

Метод определения **засорённости волокна** (ГОСТ 5556-81 Вата медицинская гигроскопическая) основан на расчёте процентного содержания сора, кожицы с волокном, частичек коробочек, листка, стебелька, костры от общего объёма навески волокна, оторванных при помощи пинцета .

Степень извитости определяют в соответствии с ГОСТ 13411-77 . Метод основан на определении количества извитков, приходящихся на 1 см длины волокна. Степень извитости выражают в процентах:

$$И = \frac{L - L_0}{L} 100 ,$$

где $И$ - степень извитости, %; L - длина полностью распрямленных, но нерастянутых волокон, мм; L_0 - длина распрямленных волокон с сохранением извитков, мм.

Определение свойлачиваемости шерстяного волокна. Образец шерсти встряхивали в водной среде. О способности к свойлачиванию судили по диаметру и плотности образующегося при встряхивании шарика. По его диаметру рассчитывали плотность :

$$V_{ш} = \frac{1}{6} \pi d^3 , \quad Q = \frac{M}{V_{ш}} ,$$

где $V_{ш}$ - объем шарика, см³; d - диаметр шарика, см ; Q - плотность шарика, г/см³ ;
 M - масса волокна, г.

Метод определения прочностных свойств волокнистых текстильных материалов

Основан на измерении показателя разрывной нагрузки одиночного волокна на приборе ZM-40, пучка волокон на динамометре типа ДШ-ЗМ-2, и ткани на разрывной машине РТ-250М-2. Образец испытуемой шерсти помещают между зажимами (12 мм), и подвергают деформированию при скорости 15 мм/мин. Разрывную нагрузку (P) в сантиньютонах вычисляют по формуле:

$$P = \frac{9,8 p}{n} , \quad \text{где } p \text{ — величина разрывной нагрузки, регистрируемая прибором, кгс; } n \text{ —}$$

количество волокон в пучке.

Разрывную нагрузку пучка волокон определяют в соответствии с ГОСТ 20269-93 , а разрывную нагрузку тканей - в соответствии с ГОСТ 3813-72 . Точность метода $\pm 3,0$ %.

9. Методы контроля степени модификации и качества меховых и кожаных материалов

Методики химического анализа и физико-механических испытаний кожи и меха

Схема выполнения полного химического анализа и физико-механических испытаний предусматривает анализ выделанного или выделанного и окрашенного полуфабриката меха и шубной овчины. Не каждый вид меха анализируется по всем приведенным показателям, схема определяет лишь последовательность анализа. При наличии на кожной ткани шубной овчины пленочного покрытия перед тем, как измельчить кожную ткань для химического анализа, производят пробу на растворимость пленочного покрытия в используемом для определения жировых веществ растворителе (при температуре кипения растворителя). Если будет установлена растворимость пленки в растворителе, то пленку удаляют с кожной ткани до ее измельчения.

Физико-механический анализ меха и шубной овчины

Выделяют методы механических испытаний кожной ткани, волосяного покрова и отдельных волос и методы физико-механических испытаний кожной ткани, волосяного покрова и отдельных волос. К методам механических испытаний кожной ткани относятся методы определения следующих показателей: прочности и предела прочности при растяжении, прочности лицевого слоя к растрескиванию, удлинений (при разрыве, при заданном напряжении: полного, остаточного и упругого). К показателям физико-механических свойств кожной ткани относятся температура сваривания, намокаемость, пароводопроницаемость, устойчивость окраски к сухому и влажному трению.

Для измерения **толщины** рекомендуется применять толщимер-микрометр автоматический. На точность измерения толщины влияют форма и размер опорных площадок, величина и продолжительность действия давления,

цена делений циферблата. Поэтому для получения сопоставимых результатов толщину кожной ткани необходимо измерять, соблюдая определенные параметры. Толщину кожной ткани меха и шубной овчины измеряют с точностью до сотых долей миллиметра (последние определяются на глаз) толщемером со сферическими опорными площадками с ценой делений 0,1 мм. Отсчет рекомендуется производить через 5 с после установки измеряемого объекта между опорными площадками.

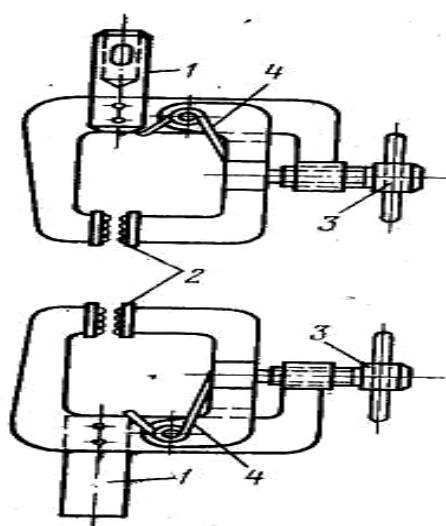


Схема зажимов для испытания целых шкурок на растяжение:

- 1-планка для прикрепления к разрывной машине,
- 2- губка зажима,
- 3- рукоятка зажима,
- 4- разжимающая пружина.

Рис. 57. Разрывная машина для испытания на растяжение кожной ткани и некоторых видов меха и шубной овчины

Испытание на растяжение. Испытание на растяжение для определения прочности кожной ткани некоторых видов меха и шубной овчины выполняют на разрывных машинах различных конструкций. Максимальная нагрузка не должна превышать действительно необходимую для разрыва образца нагрузку более чем в 5 раз. Ремешок кожной ткани меховой овчины испытывают при максимальной нагрузке 490 Н (50 кгс), а разрыв наступает часто при 50—60 Н (5—6 кгс). При испытании кожи допускается увеличение отношения этих нагрузок до 10, если машина позволяет получать показания по шкале нагрузок с ошибкой не более 1 %. (рис. 57).

Испытание меха и шубной овчины рекомендуется производить при такой скорости деформации (скорости движения нижнего зажима), которая

обеспечивает продолжительность испытания образца 10—30 с, а скорость движения нижнего зажима около 100 ± 20 мм/мин.

Определение прочности кожаной ткани. Перед испытанием ремешков на растяжение разрывную машину проверяют, устанавливая нулевые положения по шкале нагрузок и по шкале удлинений. Ремешок укрепляют сначала в верхнем, а затем в нижнем зажиме так, чтобы линии ремешка точно совпали с гранями зажимов и ремешок находился в строго вертикальной плоскости и посередине зажимов. Если разрывная машина имеет прибор для записи диаграммы растяжения, то перо прибора устанавливают в нулевое положение. Включают прибор и растягивают ремешок до разрыва. Если нет записи диаграммы растяжения, наблюдают за шкалой нагрузок и шкалой удлинения, чтобы своевременно отметить удлинение при заданном напряжении, которое рассчитывается заранее.

В момент разрыва ремешка выключают машину и записывают результаты испытания: по шкале нагрузок — нагрузку при разрыве с точностью до 1 Н (0,1 кгс) и по шкале удлинений—удлинение при разрыве с точностью до 0,1 мм. Если записана диаграмма, то показания прибора по шкалам сравнивают с данными диаграммы и отмечают подчеркиванием номер участка, на котором произошел разрыв. Предел прочности при растяжении, Па (кгс/мм²), подсчитывают по формуле

$$\sigma = \frac{P}{F},$$

где P — нагрузка при разрыве, Н (кгс); F — площадь поперечного сечения образца на участке, где произошел разрыв, мм²;

$F = ab$, где a — ширина ремешка, мм;

b — толщина ремешка на участке, где произошел разрыв, мм. Если разрыв произошел на участке № 2 или № 4, то при подсчете площади поперечного сечения за толщину участка принимают среднее арифметическое из измеренных толщин двух смежных участков: № 1 и 3 или № 3 и 5;

Прочность кожаной ткани измеряют при установленной величине

нагрузки, которая определяется соответствующими ГОСТ для шкур различных видов, например для выделанного и крашенного каракуля — 49 Н (5 кгс). Шкурку закрепляют в зажимы разрывной машины и растягивают при постепенном увеличении нагрузки. Если при достижении 49 Н (5 кгс) кожаная ткань не разорвалась, то считают, что шкурка выдержала испытание.

Определение удлинений. На качество меха и шубной овчины влияет способность кожаной ткани к деформации (приросту площади при растяжении) и сохранению этой деформации о способности шкурки увеличивать свои размеры при растяжении под действием нагрузки судят по удлинению. **Удлинение** определяют при испытании на растяжение ремешков кожаной ткани или участков целых шкур, а за общее, или полное, относительное удлинение принимают отношение разности длин испытуемого образца в состоянии растяжения и до растяжения к первоначальной его длине (т. е. длине образца до испытания). Общее удлинение равно сумме упругого и остаточного удлинений. За **упругое относительное удлинение** принимают отношение разности длин образца в состоянии растяжения и непосредственно после снятия нагрузки к первоначальной длине образца (до испытания). За **остаточное относительное удлинение** принимают отношение разности длин образца после снятия нагрузки и до испытания к его первоначальной длине.

Относительное удлинение при разрыве ϵ , %, вычисляют по формуле

$$\epsilon = \frac{l_1 - l_0}{l_0} \cdot 100 = \frac{\Delta l}{l_0} \cdot 100,$$

где l — увеличение длины рабочей части ремешка в момент разрыва, мм; l_0 — начальная длина рабочей части ремешка, мм; U — длина рабочей части ремешка в момент разрыва, мм. Удлинение при заданном напряжении определяют или по диаграмме растяжения или отмечают удлинение ремешка (в миллиметрах по шкале удлинений) при его растяжении в тот момент, когда нагрузка станет равной P_{it} Н (кгс), вычисленной заранее по заданному напряжению:

$$P_1 = pf,$$

где p — заданное напряжение, Па (кгс/мм²); f — площадь поперечного сечения испытуемого ремешка, подсчитанная по средней толщине ремешка (за среднюю толщину принимается среднее арифметическое значение толщин трех участков), мм².

Относительное полное удлинение при заданном напряжении ϵ , %, вычисляют по формуле

$$\epsilon_1 = \frac{\Delta l}{l_0} \cdot 100, .$$

где $\Delta l = h - U$ — увеличение длины рабочей части ремешка при нагрузке P_i , мм; k — длина рабочей части ремешка при нагрузке P_i , мм; l_0 — начальная длина рабочей части ремешка, мм.

При определении относительного удлинения для испытания ремешков кожаной ткани установлено напряжение 4,9 Па(0,5 кгс/мм²). Остаточное удлинение при заданном напряжении определяют также во время испытания ремешка на растяжение при заданном напряжении p .

Определение плотности кожаной ткани. Кожаную ткань тщательно остриженного образца разрезают на кусочки шириной 2—3 мм и длиной 20 мм. Навеску 5—10 г взвешивают с точностью до 0,01 г и вносят в мерную колбу емкостью 100 мл. Колбу до метки заполняют толуолом из калиброванной бюретки, измеряя объем влитого толуола. Затем колбу закрывают пробкой и оставляют в покое на сутки. Поры кожаной ткани заполняются растворителем, и в колбе устанавливается не изменяющийся далее уровень жидкости. После этого в колбу доливают толуол до метки. Разница между объемом колбы и суммарным объемом толуола, влитого в нее, является истинным объемом плотного вещества кожаной ткани $V_{\text{и}}$, мл, который рассчитывают по формуле:

$$V_{\text{и}} = V_0 - (V_1 + V_2),$$

где V_0 — емкость мерной колбы, мл; V_1 — объем толуола, влитого в колбу в первый раз, мл; V_2 — объем толуола, влитого в колбу во второй раз, мл.

Затем из колбы сливают весь толуол, кожаную ткань кладут на

фильтровальную бумагу и осторожно, не нажимая, снимают с поверхности каждого кусочка избыток растворителя. После этого кожную ткань вновь помещают в мерную колбу и заполняют ее до метки толуолом. Кажущийся объем плотного вещества кожной ткани V_k , мл, вычисляют по формуле:

$$V_k = V_0 - V_3,$$

где V_3 — объем толуола, влитого в колбу в третий раз, мл. Объем пор кожной ткани $V_{пор}$, мл, равен:

$$V_{пор} = V_k - V_{и}.$$

Кажущаяся плотность d_k , г/см³, P - истинная плотность d_a , г/см³, где P масса кожной ткани, г.

Пористость Π , %, определяют по формуле:

$$\Pi = \frac{V_{пор} \cdot 100}{V_k}.$$

Метод применим при отсутствии в кожной ткани веществ, растворимых в керосине или толуоле.

Определение намокаемости. Намокаемостью называется способность кожной ткани поглощать влагу при погружении в воду. (рис. 58). Намокаемость по Кубелке выражается отношением количества влаги (в миллилитрах), поглощенной в определенных условиях, к первоначальной массе образца в граммах. Прибор для определения намокаемости по Кубелке состоит из стеклянного сосуда с горлышком, на котором нанесены деления ценой 0,1 мл. Для определения намокаемости вырезают образцы кожной ткани меха или шубной овчины в виде круга диаметром 70 мм, состригают с них волос, приводят в воздушно-сухое состояние и взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г. Образец помещают в прибор, который предварительно заполняют дистиллированной водой до отметки 0 (вода должна иметь температуру 20 ± 2 °C). Прибор закрывают пробкой и опрокидывают. Через 10 мин прибор приводят в первоначальное положение и измеряют объем воды по градуировке на горле сосуда. Затем прибор снова переворачивают и оставляют в таком положении на 2 и 24 ч. По истечении 2, а затем 24 ч прибор

приводят в первоначальное положение и измеряют объем воды по градуировке.

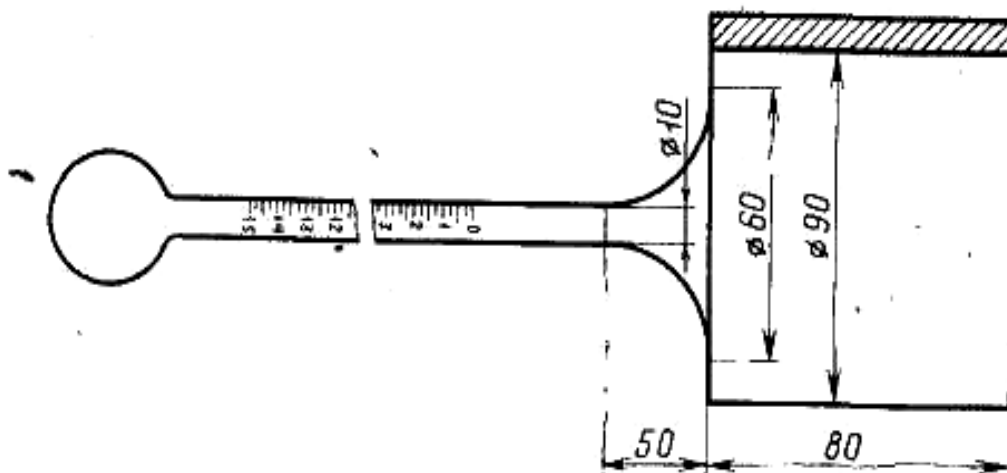


Рис.58. Схема прибора для определения намокаемости по Кубелке

Намокаемость H , %, рассчитывают по формуле:

$$H = \frac{V}{g} \cdot 100,$$

, где V — объем влаги, поглощенной за время испытания (2 или 24 ч), мл; g — масса образца в воздушно-сухом состоянии, г. Испытанию подвергают два параллельных образца. За результат принимают среднее арифметическое из двух определений.

Для большей точности испытания можно вначале определить влажность образцов и расчет производить на массу абсолютно сухой кожаной ткани g_1 , г:

$$g_1 = \frac{g(100 - W)}{100}; \quad H = \frac{V}{g_1} \cdot 100,$$

где g — масса образца в воздушно-сухом состоянии, г; W — влажность образца, %.

Намокаемость можно выразить отношением массы влаги, поглощенной в определенных условиях, к первоначальной массе образца.

Для испытания на намокаемость вырезают прямоугольные куски размером 50x60 мм и взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г. Взвешивание производят одновременно с отбором навесок для определения влаги. Взвешенный образец погружают в дистиллированную воду, взятую в

десятикратном количестве от массы образца, при температуре 20 ± 2 °С. По истечении 2 ч образец вынимают из воды, обсушивают, не отжимая с поверхности фильтровальной бумагой, и взвешивают, затем снова помещают в ту же воду на 22 ч, после чего так же осторожно обсушивают фильтровальной бумагой и взвешивают. Намокаемость Н, % от массы абсолютно сухой кожаной ткани, рассчитывают по формуле

$$H = \frac{g_2 - g_1}{g_1} \cdot 100,$$

где g_2 — масса испытуемого образца после 2 или 24 ч испытания, г; g_1 — масса абсолютно сухой кожаной ткани, г.

Стандартом на выделанную шубную овчину установлены следующие требования: при испытании на растяжение ремешка кожаной ткани шириной 10 мм с пленочным покрытием при напряжении 4,9-10 Па ($0,5 \text{ кгс/мм}^2$) и удлинении до 35 % пленка не должна трескаться и отслаиваться; при испытании на трение о сухой миткаль на приборе ПОМ за 200 оборотов пленка не должна стираться; при трении за 100 оборотов о влажный миткаль пленка не должна стираться.

Определение прочности окраски к трению. Прочность окраски к трению является важным показателем качества меха и шубной овчины. Этот показатель нормируется стандартами для всех видов выпускаемой продукции. Для определения прочности окраски к сухому трению применяются прибор ПОМ и четырехбалльная шкала эталонов. Пятно, полученное при трении испытуемого образца о бумагу, визуально сравнивается с пятнами шкалы (рис. 59). Испытание на ПОМ выполняется следующим образом. Гайку 1 патрона 2 поворачивают на пол-оборота влево. В образовавшийся зазор между кольцом и диском патрона вкладывают лист бумаги размером 90X70 мм. Поворотом гайки вправо закрепляют бумагу. Затем на резиновую подушку 3 помещают испытуемую шкурку (в зависимости от цели испытания — волосным покровом или кожаной тканью вверх), на нее с помощью рукоятки 4 опускают патрон 2, с закрепленной в нем бумагой, включают мотор и наблюдают за счетчиком оборотов. После того как счетчик покажет установленное число

оборотов, переключают мотор, чтобы изменить направление вращения. По окончании испытания поворотом гайки 1 патрона 2 влево освобождают лист бумаги и сравнивают пятно, полученное при испытании, с пятнами шкалы эталонов. Лист бумаги разрезают по диаметру пятна. Под лист с половиной пятна подкладывают белую бумагу и сравнивают его с пятном эталонной шкалы для установления идентичности пятен. Рекомендуется применять писчую белую без желтого оттенка бумагу (ГОСТ 3331—55).

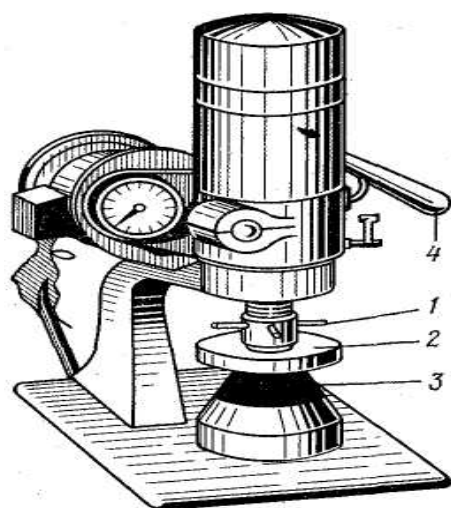


Рис.59. Прибор ПОМ

В соответствии с ГОСТ 9210—59 установлено следующее число оборотов при испытании прочности окраски к сухому трению: для волосяного покрова меха — 300 (по 150 оборотов в обоих направлениях) ; для волосяного покрова и кожаной ткани шубной овчины — 50 (по 25 оборотов в обоих направлениях).

Определение прочности окраски к действию света. Устойчивость окраски к действию света, или светостойкость, т. е. способность сохранять окраску при действии света, — основной показатель, определяющий качество окрашивания меха (при условии, что достигнут нужный колористический эффект). В текстильной промышленности нашей страны стандартами установлено испытание устойчивости окраски к действию света в атмосферных условиях. Испытания по этому методу продолжительны и, кроме того, изменение окраски зависит от метеорологических условий и географического расположения местности, где производится испытание. Применение этого

прибора не только ускоряет проведение испытания, но и позволяет проводить его в стандартных, условиях. Для исключения влияния на результаты любых отклонений от режима испытания, которые могут появиться из-за старения лампы, колебаний температуры, влажности, параллельно с испытуемыми образцами испытанию подвергают эталонные образцы так называемой синей шкалы.

Синяя шкала представляет собой набор из восьми эталонных образцов окрашенной ткани, каждый из которых имеет определенную прочность к действию света, оцениваемую в баллах от 1 до 8. Изменения в цвете испытуемого образца оцениваются путем визуального сравнения с изменением цвета образцов эталонной шкалы. Интенсивность выцветания образцов эталонной шкалы, т. е. контрастность необлученного и облученного участков, в свою очередь контролируется сравнением с так называемой серой эталонной шкалой. Обе шкалы, серую и синюю, составляют по определенным международным стандартам.

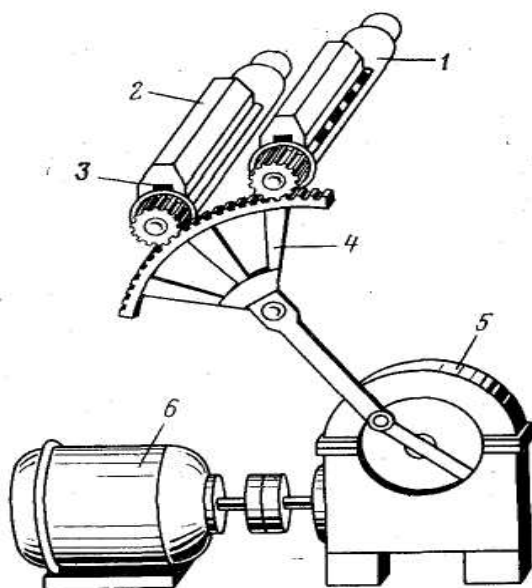


Рис. 60. Прибор УМИ-60

Определение истираемости волосяного покрова меха — показатель, оказывающий решающее влияние на износостойкость меха. Образец меха закрепляют на валу и подвергают трению о поверхность ткани (шинельное сукно, ГОСТ 6621—53 или технический войлок толщиной 9—3,5 мм, ГОСТ

288—61) при реверсивном вращении вала в течение определенного времени при заданных частоте вращения вала и нагрузке. Закрепление испытуемого образца на валу позволяет волосяному покрову «раскрыться» на изогнутой по поверхности вала кожаной ткани, что обуславливает более равномерное истирание волоса (рис.60). Об устойчивости волосяного покрова к истиранию судят по уменьшению массы волоса на образце после испытания.

Для определения устойчивости меха к истиранию используют прибор УМИ-60, состоящий из двух деревянных валиков диаметром 60 мм, грузовой коробки 2, к нижней поверхности которой крепится трущийся материал 3, кулисы 4, редуктора 5 и электромотора 6. На валиках закрепляют образцы. Валики вращаются реверсивно, совершая обороты на 360°. Два оборота составляют один цикл истирания. Количество циклов регистрируется счетчиком. В момент изменения направления вращения валиков образцы меха должны находиться снизу, не соприкасаясь с истирающим материалом. При этом истертый волос удаляется, а сами волоски распрямляются.

Для испытания отбирают образцы меха размером 60X30 мм из шкурок мелкого или среднего размера (белки, кролика, сурка, каракуля и др.) и 100X30 мм — из шкур крупного размера (овчины, шкур морских животных и др.). Образцы вырезают из шкурки так, чтобы большая сторона прямоугольника совпадала по направлению с хребтовой линией.

Если образцы отбирают не из половинок, а из целых шкурок, то пробу отбирают из мест, определенных ГОСТ 9209—59 для механических испытаний (не менее двух образцов из каждой шкурки). Образцы выдерживают в эксикаторе 24 ч до воздушно-сухого состояния (температура 20 ± 2 °С, относительная влажность воздуха 65 ± 5 %), затем взвешивают с точностью до 0,001 г. Образцы закрепляют на валике вплотную друг к другу так, чтобы более длинная сторона их располагалась по окружности валика. Если размер образцов 100X30 мм, то они могут быть закреплены непосредственно на валике с помощью игольчатого устройства. Образцы размером 60X30 мм предварительно нашивают на ткань (бязь, миткаль и т. п.), которую закрепляют

затем вместе с образцами, плотно натягивая на валик и сшивая края. Образцы закрепляют таким образом, чтобы в момент изменения направления валика они находились под нагрузкой.

Нагрузку, под воздействием которой находятся образцы, устанавливают из расчета 7,35 Н (0,75 кгс) на один испытуемый образец шириной 30 мм, т. е., если испытывают одновременно 8 образцов, нагрузка должна быть 58,8 Н (6 кгс), если испытывают 4 образца—29,4 Н (3кгс). По окончании испытания образцы очищают, выдерживают в эксикаторе не менее 12 ч, взвешивают с точностью до 0,001 г, затем тщательно удаляют с них волосяной покров (состригают и сбривают), вновь выдерживают в эксикаторе и взвешивают с той же точностью. Показатель устойчивости волосяного покрова к истиранию И, %, вычисляют по формуле:

$$И = \frac{a - b}{a - c} \cdot 100,$$

где а — масса образца до испытания, г; b — масса образца после испытания, г; с — масса кожной ткани образца, г; (а—с) — масса волосяного покрова образца до истирания, г.

Показатель устойчивости волосяного покрова к истиранию равен среднему арифметическому не менее, чем из 4 определений.

Испытание волоса на растяжение. При испытании волоса на растяжение определяют нагрузку при разрыве и удлинение при растяжении.

Иногда определяют предел прочности при растяжении волоса σ_v , Па, который рассчитывается по формуле:

$$\sigma_v = \frac{P_v}{F_v},$$

где σ_v — нагрузка при разрыве волоса, Н (гс); P_v — площадь поперечного сечения волоса, мк^2 ;

$$F_v = \pi \frac{D^2}{4} \text{ мк}^2,$$

где D — средняя толщина волоса, мк.

Неточность показателя «предел прочности при растяжении» возникает вследствие того, что поперечное сечение волоса принимается за правильный

круг, а это не соответствует действительности. Поэтому правильнее измерять нагрузку при разрыве. Следует учитывать, что колебания измеряемых при этом испытании величин значительны даже при тщательно подобранных волосках. Поэтому обычно для контрольной и испытываемой проб подбирают волоски одинаковой толщины, без дефектов и не менее 100 штук для одной пробы (рис.61).

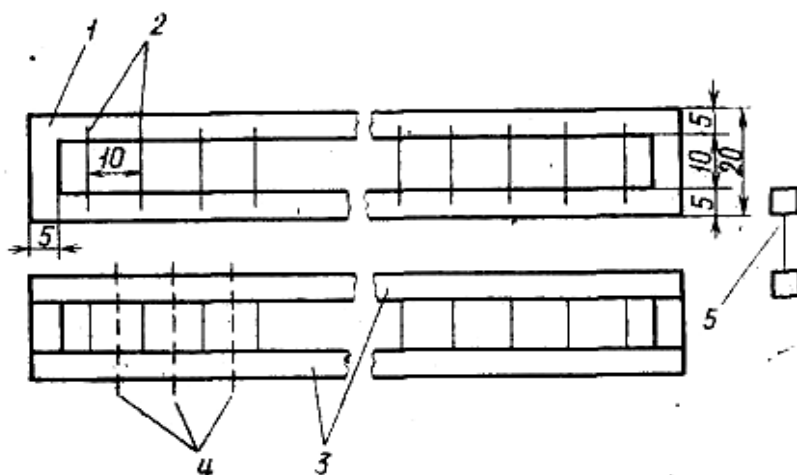


Рис. 61. Схема подготовки одиночных волос для испытания на растяжение или многократный изгиб: 1 — рамки из бумаги; 2 — наклеенные волоски; 3 — наклеенные поверх волосков полоски бумаги; 4 — линии разрезов; 5 — подготовленный для испытания волос

Для испытания одиночного волоса служит динамометр ФО-1с (рис. 62). На плите смонтированы стойка 2 и рабочий цилиндр 3 с пристроенным к нему трехходовым краном с ручкой 4 и регулирующим вентилям 5. На задней стороне вентиля имеются патрубки для присоединения шлангов; справа (если смотреть на машину спереди) входной, слева — выходной, сточный. Ручкой 4 воду направляют в цилиндр над или под поршнем, опуская или поднимая цилиндр со штоком, траверсой с микроскопом 6, сосудом для жидкости 7 и нижним зажимом 8. К микроскопу крепится лампочка 9. Скорость хода поршня может быть установлена вращением маховика регулирующего вентиля 5. К верхнему концу стойки 2 прикреплена ось с призматическим вырезом, в котором находится опорная призма маятника нагрузки. К маятнику могут быть подвешены сменные дисковые грузы для установки разных пределов измерения.

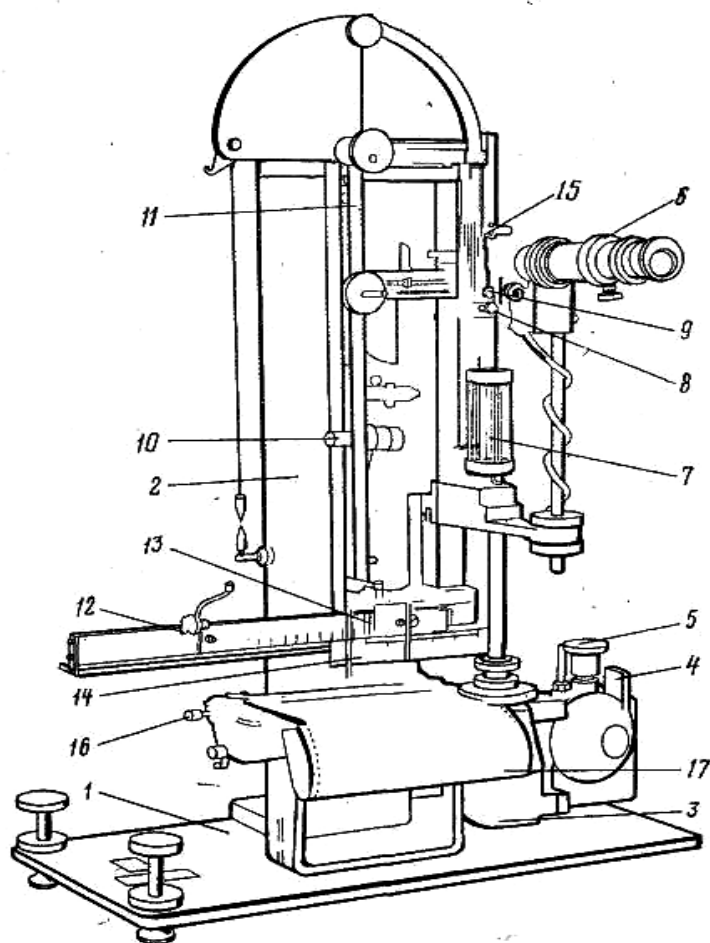


Рис. 62. Схема динамометра ФО-1с для испытания одиночного волоса на растяжение

В вертикальном (нулевом) положении маятник фиксируется рукояткой 10. При отклонении маятник перемещает по шкале нагрузки 12 указатель 13. Под шкалой нагрузки установлена передвижная шкала удлинений 14. К правому плечу маятника

подвешивается на опорной призме верхний зажим 15. На левом конце сегмента маятника имеется крючок для подвешивания контргрузов. Для записи нагрузки и удлинения на диаграммной ленте предназначен самопишущий прибор 16. С помощью подвесных грузов могут быть установлены следующие пределы измерения: 1; 2; 5; 10; 20, 50; 100. Шкала нагрузок разделена на 100 равных делений, соответствующих 0—100 % установленного предела измерений.

После разрыва волоса делают отсчет нагрузки в делениях шкалы и удлинения в миллиметрах по указателю. Нагрузку при разрыве x , Н (гс), рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{mn}{100} + 0,2,$$

где m — предел измерения; n — количество интервалов (делений) по шкале нагрузки; 0,2 — величина предварительной нагрузки, Н (гс); если предел измерения более 10, вводить эту поправочную

величину не нужно.

Относительное удлинение ϵ , %, рассчитывают по формуле:

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \cdot 100,$$

где Δl — удлинение образца по шкале удлинения, мм; l_0 — первоначальная рабочая длина образца (расстояние между зажимами), мм.

Изменение прочности на разрыв после испытания на изгиб P , %, определяют по формуле

$$P = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \cdot 100,$$

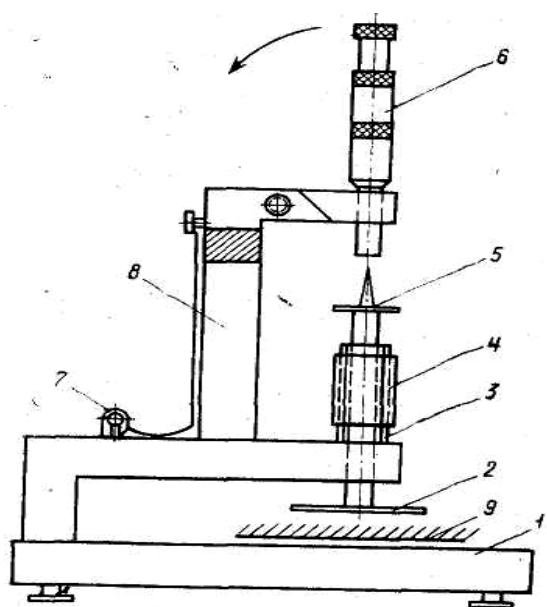
где P_0 — нагрузка при разрыве волоса до испытания на изгиб, Н (гс); P_1 — нагрузка при разрыве волоса после испытания на изгиб, Н (гс).

Определение густоты волосяного покрова. Густота волосяного покрова в значительной степени определяет теплозащитные свойства шкурки, ее износостойкость и внешний вид. Густоту волосяного покрова можно измерить методом подсчета, весовым методом и радиогустомером РГ-4, созданным во ВНИИМП. Метод подсчета заключается в определении числа волос на 1 см² площади шкурки. Специальным резакон вырезают образец площадью 0,25 см², срезают с него волосы, подсчитывают их и полученное число умножают на четыре. Этот метод применяется в научно-исследовательских работах. Для шкурок с волосами одинаковой длины, например стриженных, иногда пользуются весовым методом. С образца определенного размера сбривают волосы и взвешивают их после приведения к воздушно-сухому состоянию в нормальных условиях. Метод применяется или в сочетании с методом подсчета, или для сравнительной характеристики шкурок определенного вида в исследовательских работах. При использовании весового метода необходимо учитывать изменение массы волоса в процессе обработки; например, после крашения масса волоса возрастает на 10—20 %.

Определение упругости и сминаемости волосяного покрова. Если на волосяной покров шкурки положить пластинку определенной массы, то

расстояние между пластинкой и кожной тканью будет характеризовать толщину волосяного покрова. При большем нагружении толщина его уменьшится, а при меньшем — увеличится. Способность волосяного покрова восстанавливать первоначальную толщину по мере уменьшения нагрузки характеризует упругость волосяного покрова.

Упругость волосяного покрова меха измеряют на компрессометре



Вишневого, усовершенствованном во ВНИИМП. Прибор состоит из станины, на которой располагают исследуемую шкурку, опорной платформы 2, соединительного штока 3, подъемной гайки 4, контактной иглы 5, микрометра 6, укрепленного на стойке 8, и контрольной лампы 7 (рис. 63).

Рис. 63. Компрессометр ВНИИМП

Для того чтобы установить микрометр 6 на нуль, опорную платформу опускают на станину и вращают головку микрометра до замыкания электроцепи (загорания электрической лампочки) в момент соприкосновения микрометрического винта и контактной иглы 5. Для измерения поднимают микрометрический винт, микрометр откидывают влево и вращением подъемной гайки против часовой стрелки поднимают опорную платформу. Целую меховую шкурку 9 кладут на станину и плавно опускают на нее опорную платформу. На площадку основания контактной иглы 5 помещают сменный груз. Микрометр 6 устанавливают в вертикальное положение и вращением микрометрического винта замыкают электроцепь. По показанию микрометра измеряют толщину волосяного покрова. Прибор снабжен набором сменных грузов от 100 до 1000 г и сменными опорными платформами площадью 10, 20, 50 см², что позволяет варьировать величину нагрузки (давления) на 1 см² поверхности волосяного покрова. Нагрузку вычисляют

делением величины груза на величину площади установленной опорной платформы. Опорную платформу выбирают в зависимости от вида испытуемого меха. Для меховой овчины рекомендуется опорная платформа площадью 50 см², для шкурок кролика, сурка и других средних и мелких шкурок — 10—20 см².

При определении упругости сначала измеряют толщину волосяного покрова при нагрузке 98 Па (1 гс/см²), затем нагрузку постепенно уменьшают, снимая грузы из расчета снижения нагрузки 490—980 Па (5—10 гс/см²), и измеряют толщину волосяного покрова при заданной нагрузке 980, 1960, 3920 Па (10, 20, 40 гс/сма). Упругость x , %, рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{(a_3 - a_2)}{a_1} \cdot 100,$$

где a_1 — толщина волосяного покрова при нагрузке 98 Па (1 гс/см²), мм; a_2 — толщина волосяного покрова при заданной нагрузке, мм; a_3 — толщина волосяного покрова после снятия заданной нагрузки, мм. Сминаемость, %, рассчитывают по формуле:

$$y = \frac{(a_1 - a_2)}{a_1} \cdot 100.$$

Окончательный результат дается с одним десятичным знаком.

Определение содержания влаги. В обычных условиях содержание влаги в кожной ткани и волосе меха составляет 10—14 %, причем в кожной ткани ее несколько больше, чем в волосе. Содержание влаги в мехе и шубной овчине изменяется в зависимости от относительной влажности воздуха, от содержания в кожной ткани хлористого натрия и жировых веществ, а также от характера дубления. Содержание влаги в кожной ткани оказывает значительное влияние на ее свойства. Для хорошей сохранности меха и шубной овчины также необходимо соблюдать определенную влажность, которая установлена ГОСТ на выделанные шкуры.

Колебания в содержании влаги искажают истинное значение других показателей, полученных при химическом анализе пробы (содержание окиси

хрома, золы и др.), и делают невозможным сравнение результатов анализа различных проб между собой. Поэтому для получения сравнимых результатов результаты химического анализа меха и шубной овчины пересчитывают в процентах по отношению к массе абсолютно сухого вещества (с влажностью 0%). Для пересчета необходимо знать содержание влаги во взятой на анализ навеске, %, т. е. влагу аналитическую. Для пересчета используют переводные коэффициенты K . Пересчет на абсолютно сухое вещество производится умножением содержания в шкурке того или иного вещества, % на коэффициент K . Для пересчета на абсолютно сухое вещество K рассчитывают по формуле

$$K = \frac{100}{100 - W_{\text{ан}}},$$

где $W_{\text{ан}}$ — содержание влаги по данным анализа, т. е. влага аналитическая, %. Для пересчета на условное содержание влаги $K_{\text{усл}}$ рассчитывают по формуле

$$K_{\text{усл}} = \frac{100 - W_{\text{усл}}}{100 - W_{\text{ан}}},$$

где $K_{\text{усл}}$ — условное содержание влаги, на которое делается пересчет, %.

Для пересчета аналитических данных на вещество с 16 % влажностью K_{16} определяют по формуле:

$$K_{16} = \frac{100 - 16}{100 - W_{\text{ан}}}.$$

Для пересчета данных анализа, вычисленных для абсолютно сухого вещества, на вещество с любым условным содержанием влаги K определяют по формуле

$$K = \frac{100 - W_{\text{усл}}}{100}.$$

Ускоренный метод определения содержания влаги

На электроплитку ставят специальную металлическую плиту с отверстием для термометра. В низкий диаметром 60—80 мм металлический бюкс с крышкой помещают навеску 4—5 г измельченной кожаной ткани.

Сушку производят при температуре 140 °С; крышку с бюкса снимают. Через 10—15 мин с помощью стекла проверяют, окончена ли сушка. По окончании сушки бюкс закрывают крышкой, охлаждают на металлической плите до комнатной температуры и взвешивают. Содержание влаги в навеске W , %, рассчитывают по формуле:

$$W = \frac{c_1 - c_2}{c} \cdot 100,$$

где c_1 — масса бюкса с навеской до сушки, г;
 c_2 — масса бюкса с навеской после сушки, г;

c — навеска кожаной ткани, взятая для анализа, г.

Определение содержания жировых веществ. Жировые вещества содержатся на волосе и в кожаной ткани шкурки. Определение их производится раздельно. Жировые вещества с волоса легко смываются водными растворами моющих и обезжиривающих веществ и растворителями. Жиры, содержащиеся в кожаной ткани шкурки, разделяются на экстрагируемые и не экстрагируемые органическими растворителями. Стандартные методы определения содержания жира в меховых шкурках основаны на экстракции растворителями с последующей сушкой экстрагированного жира. Недостатком этих методов является их длительность, связанная с экстрагированием (экстрагирование в аппарате Зайченко продолжается 1 —1,5 ч, в аппарате Сокслета— 4—5 ч), подготовкой посуды и доведением до постоянной массы колб, а также высушиванием экстрагированного жира .

10. Методы оценки экологичности текстильных материалов и технологии их подготовки в целом

Определение реакции водной вытяжки

От общей пробы отбирали навеску массой 10 г. Отобранную навеску помещали в фарфоровую чашку, заливали дистиллированной водой (200-250 см³) и кипятили в течение 15 мин. Затем навеску отжимали, жидкость фильтровали и упаривали до объёма 100 см³ и охлаждали. Реакцию водной вытяжки определяли красной, синей лакмусовой или индикаторной

универсальной бумажкой. Реакция водной вытяжки должна быть нейтральной (ГОСТ 5556-81) .

Определение восстанавливающих веществ

Для определения восстанавливающих веществ применяли раствор водной вытяжки. В пробирку наливали 10 см³ водной вытяжки, добавляли 5-10 капель серной кислоты и 3 капли марганцовокислого калия. Полученное слабое окрашивание жидкости не должно исчезнуть в течение 5 мин (ГОСТ 5556-81) .

Содержание хлористых, кальциевых, сернокислых солей определяют согласно ГОСТ 5556-81. Вата медицинская гигроскопическая. Метод основан на сравнении опалесценции образцового раствора с опалесценцией настоящего стандарта.

Определение интенсивности окраски

Значение оптической плотности исследуемой воды при длине волны, близкой к максимуму поглощения, является мерой интенсивности ее окраски.

Оптическую плотность измеряют при толщине слоя 10 см на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре. Кювету сравнения заполняют дистиллированной водой.

Практическое применение имеет определение степени разбавления сточной воды, при котором интенсивность окраски при толщине слоя 10 см перестает отличаться от эталона (дистиллированная вода).

Для этого на лист белой бумаги помещают два цилиндра диаметром 20-25 мм из бесцветного стекла. В первый заливают дистиллированную воду (10 см), а во второй разбавленную сточную воду, увеличивая каждый раз степень разбавления (1:1; 1:2; 1:3; ... 1:50 и т.д.) пока при просматривании сверху через воду в первом и втором цилиндрах бумага не будет выглядеть одинаково белой.

Определение взвешенных веществ

Количественное определение грубодисперстных примесей в сточных водах проводится путем отделения их фильтрованием через различные пористые материалы – бумажные и мембранные фильтры, стеклянные пористые фильтры. Наиболее полно отделяют взвешенные вещества мембранные фильтры.

Ход определения. Мембранный фильтр, высушенный в сушильном шкафу при 60 °С и взвешенный на аналитических весах помещают в прибор для фильтрования. Через фильтр пропускают 100-150 мл исследуемой воды. Промывание осадка на фильтре допускается только фильтратом. Фильтр с осадком подсушивают на воздухе, а затем в сушильном шкафу при 60 °С в течение 1 ч, после чего взвешивают.

Содержание грубодисперсных примесей (X) вычисляются по формуле, мг/л:

$$X = \frac{(a - b)}{V},$$

где а-масса мембранного фильтра с осадком, мг; b-масса мембранного фильтра без осадка, мг; V-объем анализируемой сточной воды, мл.

Определение сухого остатка

Сухим остатком называется высушенный при 105 °С остаток, получающийся при выпаривании профильтрованной исследуемой воды.

Ход определения. В прокаленную и взвешенную фарфоровую чашку помещают 100 мл анализируемой воды, предварительно профильтрованной. Воду выпаривают на водяной бане досуха. Чашку с остатком переносят в шкаф и высушивают пробу при 105 °С до постоянной массы.

Содержание сухого остатка (X) вычисляют по формуле, мг/л :

$$x = \frac{(a - b)}{v},$$

где а-масса чашки с сухим осадком, мг; b-масса пустой чашки, мг; v-объем анализируемой сточной воды, мл.

Определение химического потребления кислорода (ХПК)

Химическим потреблением кислорода (ХПК) называется величина, характеризующая общее содержание в воде восстановителей, реагирующих с сильными окислителями. Ее обычно выражают в единицах количества кислорода, расходуемого на окисление. Перед окислением ХПК анализируемую воду следует отфильтровать. Фильтрование можно заменить продолжительным отстаиванием.

Ход определения 20-25 мл анализируемой сточной воды разбавляют дистиллированной водой до 50 мл, переносят в круглодонную колбу емкостью 300 мл, прибавляют 25 мл титрованного раствора 0,25 н. раствора бихромата калия и осторожно вливают 75 мл концентрированной серной кислоты малыми порциями при постоянном перемешивании. Затем насыпают 0,3 г сульфата серебра, вводят в колбу несколько стеклянных бусинок, соединяют с обратным холодильником и нагревают до слабого кипения. Кипятят содержимое колбы 2 ч. Затем охлаждают и переводят содержимое колбы в коническую колбу на 500 мл. Добавляют к содержимому колбы дистиллированную воду до объема 350 мл, вводят 3 капли раствора индикатора ферроина (10-15 капель раствора N-фенил-антраниловой кислоты) и оттитровывают избыток бихромата титрованным раствором соли Мора. Для получения холостого опыта 50 мл дистиллированной воды проводят через все ступени анализа.

Соль Мора (0,25 н. водный раствор) готовят следующим образом: 98 г соли Мора растворяют в дистиллированной воде, прибавляют 20 мл концентрированной серной кислоты и раствор разбавляют дистиллированной

водой до 1 л. Титр раствора устанавливают по титрованному раствору бихромата калия.

Химическое поглощение кислорода (ХПК) в мг кислорода на 1 л сточной воды вычисляют по формуле:

$$\text{ХПК} = \frac{(a - b) \cdot N \cdot 8 \cdot 1000}{V},$$

Где а-объем раствора соли Мора, израсходованного на титрование в холостом опыте, мл; b-объем того же раствора, израсходованного на титрование пробы, мл; N-нормальность титрованного раствора соли Мора; V-объем анализируемой сточной воды, мл; 8-эквивалент кислорода.

Биохимическое потребление кислорода (БПК)

Биохимическим потреблением кислорода называют количество кислорода, требуемое для окисления, находящихся в 1 л сточной воды органических веществ.

Определяют полное биохимическое потребление кислорода (БПК) или пятисуточное потребление кислорода (БПК₅).

Метод определения БПК состоит в следующем. Исследуемую сточную воду разбавляют чистой водой, взятой в таком количестве, чтобы содержащегося в ней кислорода с избытком хватило для полного окисления всех органических веществ в сточной воде. Определив содержание воды в полученной смеси, ее оставляют в закрытых склянках на 2,5,10,15 и т.д. суток, определяя содержание кислорода по истечении каждого из перечисленных периодов времени. Уменьшение содержания кислорода в воде показывает сколько его за это время израсходовано на окисление органических веществ, находящихся в сточной воде. Это количество, отнесенное к 1 л сточной воды и, является биохимическим потреблением сточной воды.

Ход определения. Исследуемую сточную воду разбавляют в мерных колбах. Необходимое разбавление можно ориентировочно рассчитать по

результатам определения ХПК. Для этого, значение ХПК, выраженное в мг кислорода на 1 л, делят на 5.

Разбавленную воду наливают сифоном в 6 калибровочных колб емкостью 150-200 мл, заполняя их доверху и, закрывают притертыми пробками. Затем наливают другие 6 калибровочных колб разбавляющей водой (контрольный опыт). В одной из склянок с испытуемой водой и разбавляемой водой сразу определяют растворенный кислород, а остальные соответственно через 2,3,5,10 и 20 суток.

Содержание растворенного кислорода определяют иодометрическим методом. Для этого в склянку, заполненную доверху пробой вводят пипеткой 2 мл раствора сульфата марганца (480 г в 1 л дистиллированной воды), затем 2 мл едкого калия (70 % водный раствор). Закрытую пробкой склянку несколько раз переворачивают для перемешивания содержимого. Добавляют 10 мл разбавленной 20 % серной кислоты и 0,15 мл 40 % раствора сульфаминовой кислоты или мочевины, снова перемешивают содержимое колбы, затем переливают раствор в колбу для титрования и титруют выделившийся йод раствором тиосульфата натрия до светло-желтой окраски, прибавляют 1-2 капли раствора крахмала и продолжают титровать до исчезновения синей окраски.

Содержимое растворенного кислорода (X) находят по формуле, мг/л:

$$X = \frac{akN8 \cdot 1000}{V1 - V2},$$

Где а- объем раствора тиосульфата, израсходованное на титрование, мл;

N- нормальность тиосульфата;

k- поправочный коэффициент для раствора тиосульфата;

V1-емкость колбы для анализа воды;

V2-объем реактивов, добавляемых при анализе;

8-эквивалент кислорода.

БПК сточной воды рассчитывают по формуле:

$$\text{БПК} = \frac{(A1 - B2) - (A2 - B1)}{V} 1000,$$

Где А1-концентрация кислорода в исходной пробе (нулевой день) мг/л;
А2-концентрация кислорода в разбавляющей воде в начале инкубации, мг/л;
В1-концентрация кислорода в конце инкубации, мг/л; В2-концентрация
кислорода в разбавляющей воде в конце инкубации, мг/л, V-объем, пошедший
на титрование.

Список рекомендуемой литературы к главе

1. Рихтер, М. Избранные методы исследования крахмала / М. Рихтер, А. Аугустат, Ф. Ширбаум. - М.: Пищ. пром-сть, 1975. – 178 с.
2. Colowick, S.P. Methods in enzymology / S.P. Colowick, N.O. Kaplan // Ed. Hirs C.H.W. "Academic press". – New York, London, 1977.
3. Гоулдстен, Дж. Практическая растровая электронная микроскопия / Дж. Гоулдстен, Х. Яковиц. – М., 1979. – С. 105.
4. Oatley, C.W. The scanning electron microscope. – Univ. Press Cambridge, 1972. – P.165.
5. Новорадовская, Т.С. Химия и химическая технология шерсти / Т.С. Новорадовская, С.Ф. Садова. – М., 1986. – 254 с.
6. Фридлянд, Г.И. Отделка льняных тканей / Г.И. Фридлянд. – М.: Легкая и пищ. пром-сть, 1982. – 430 с.
7. Кукин, Г.Н. Текстильное материаловедение (волокна и нити): учеб. для вузов - 2-е изд. / Г.Н. Кукин и др. – М.: Легпромышлениздат, 1989. – 214 с.
8. Справочник по химической технологии обработки льняных тканей. – М.: Легкая индустрия, 1973. – 406 с.
9. Чурсина, А.А. Разработка критериев оценки качества котонизированного волокна / А.А. Чурсина, В.К. Палейчук, И.П. Карпец // Льняное дело. – 1996. – №3. – С. 24.

10. Коновалова, Л.Д. Определение степени подготовки ровницы к вытягиванию в вытяжном приборе кольцепрядильной машины ПМ-88-Л5 / Л.Д. Коновалова // Текстильная промышленность. – 1981. – Вып.1. – С. 5.
11. Городов, В. В. Испытания лубоволокнистых материалов / В.В. Городов и др. – М.: Легкая индустрия, 1969.
12. Зильберглейт, М.А. Принципы кинетической оценки превращений лигнина в химических реакциях / М.А. Зильберглейт, В.М. Резников // Химия и использование лигнина: материалы 7-й Всесоюзной конференции. – Рига, 1987. – С.91-92.
13. Der Einfluss Oxidativer Bleichmittel auf den AOX-Gehalt von Bleichereiabwässern // Textile Praxis Int. – 1989. – Vol. 44. – № 8. – P. 841 – 843.
14. Поверхностно-активные вещества: справочник / Под ред. А.А. Абрамзона. – М.: Химия, 1979. – 276 с.
15. Методы исследования в текстильной химии: справочник / Под ред. Г.Е. Кричевского. – М.: Легпромбытиздат, 1993. – 401 с.
16. Лабораторный практикум по химической технологии волокнистых материалов: учеб. пособие / Под ред. Ф.И. Садова. – М.: Гизлегпром, 1963. – 428 с.
17. Усов, А.И. Раздельное определение гексоз и пентоз при помощи ортолуидинового реагента / А.И. Усов, С.В. Яроцкий // Изв. АН СССР, Сер. химия. – 1994. – №4. – С. 877-880.
18. Резников, В.М. Сравнение кальцийпектатного и спектрофотометрического методов анализа пектиновых веществ / В.М. Резников, Л.Г. Матусевич, Т.С. Селиверстова // Химия древесины. – 1982. – №2. – С. 108-113.
19. Закис, Г.Ф. Методы определения функциональных групп лигнина / Г.Ф. Закис, Л.Н. Можейко. – Рига, 1975. – 174 с.
20. Гоулдстен, Дж. Практическая растровая электронная микроскопия / Дж. Гоулдстен, Х. Яковиц — М, 1979. – 105 с.

21. Карлинь, В.Б. Дифференциальная ИК спектроскопия в исследовании лигнина / В.Б. Карлинь, Я.А. Эйдус // УФ и ИК спектроскопия лигнина: материалы всесоюзного семинара. – Рига, 1977. – С. 27-30.
22. Жбанков, Р.Г. ИК спектры целлюлозных волокнистых материалов / Р.Г. Жбанков, И.Н. Ермоленко // Изв. вузов АН БССР. Серия физ.-хим. – 1959. – №1. – С. 15-24.
23. Збинден, Р. ИК спектроскопия высокополимеров / Р. Збинден. – М.: Мир, 1966. – С. 355.
24. Калиновски, Е., Урбанчик, Г.В. Химические волокна / Е. Калиновски, Г.В. Урбанчик. – М.: Легкая индустрия, 1966. – 320 с.
25. Завадский, А.Е. Рентгенографический метод определения степени кристалличности анизотропных льняных материалов / А.Е. Завадский // Физика волокнистых материалов: структура, свойства, наукоемкие технологии и материалы: сб. науч. тр. VII Международного научно-практического семинара. – Иваново, 2004. – С. 72-75.
26. Завадский, А.Е. Рентгенографический метод определения степени кристалличности целлюлозных материалов различной анизотропии / А.Е. Завадский // Химические волокна. – 2004. – № 6. – С. 28-32.
27. Мартынов, М.А. Рентгенография полимеров / М.А. Мартынов, К.А. Вылегжанина. – Л.: Химия, 1972. – 96 с.
28. Чиргадзе, Ю.Н. ИК спектры и структура полипептидов и белков / Ю.Н. Чиргадзе. – М., 1965.
29. Голубчиков, О.А. Инфракрасные спектры органических соединений: методические указания к лекционному курсу и семинарским занятиям по органической химии / О.А. Голубчиков, С.А. Сырбу. – Иваново, 1988. – 32 с.
30. Регламентированные режимы крашения шерстяного волокна и ленты при пониженной температуре АООТ “Ивановский камвольный комбинат”, 1995.
31. Лабораторный практикум по применению красителей: учеб. пособие для вузов / Под ред. Б.Н. Мельникова. – М.: Легкая индустрия, 1972. – 246 с.

- 32.Красители для текстильной промышленности: колористический справочник / Под ред. А.Л. Бяльского, В.В. Карпова. – Химия, 1971. – 311с.
- 33.Химические и физические показатели качества жиров: методическое пособие. – Иваново: ИГХТУ, 2000. – 59 с.
- 34.Куликов, А.В. Определение взаимосвязи свойств трепаного льняного волокна с его цветом / А.В. Куликов, Е.А. Пашин, А.Е. Виноградова // Технология текст. пром-сти. – 2004. – № 1 (276). – С. 8-10.
- 35.Ольшанская, О.М. Современные методы и подходы к экологической оценке текстильного производства и продукции / О.М. Ольшанская, А.В. Артемов // Текстильная химия. – 2000. – № 1 (17). – С. 98 – 100.
- 36.Артемов, А.В. Диоксины в текстильной промышленности / А.В. Артемов // Директор. – 2001. – № 6 (32). – С. 17-19.
37. Василенко, В.А. Сплайн-функции: теория, алгоритмы, программы / В.А. Василенко. – Новосибирск, 1983. - С. 48 – 52; 116 – 130.
38. Кукин, Г.Н. Текстильное материаловедение (волокна и нити) / Г.Н. Кукин, А.Н. Соловьев, А.И. Кобляков. – М.: Легпромбытиздат, 1989. – 352 с.

Список ГОСТов

1. ГОСТ 5556-81. Вата медицинская гигроскопическая. – М.: Изд-во стандартов, 1988. – 20 с.
2. ГОСТ 18057-83. Материалы текстильные. Метод определения белизны. – М.: Изд-во стандартов, 1982. – 8 с.
3. ГОСТ 8837-83. Материалы текстильные. Методы определения вязкости растворов целлюлозы. - М.: Изд-во стандартов, 1984. - 13 с.
4. ГОСТ 18054-72. Материалы текстильные. – М.: Изд-во стандартов, 1982. – 8с.
5. ГОСТ 21244-75. Шерсть натуральная сортированная. Методы определения средней длины. – М.: Изд-во стандартов, 1976. – 8 с.
6. ГОСТ 17514-93. Шерсть натуральная. Методы определения тонины – М.: Изд-во стандартов, 1994. – 8 с.
7. ГОСТ 13411-77. Шерсть натуральная. Методы определения степени извитости. – М.: Изд-во стандартов, 1978. – 8с.

8. ГОСТ 20269-93. Шерсть. Методы определения разрывной нагрузки. – М.: Изд-во стандартов, 1994. – 8 с.
9. ГОСТ 5012-82. Ткани чистошерстяные и полушерстяные. Метод определения изменения линейных размеров после замочки. – М.: Изд-во стандартов, 1983. – 5 с.
10. ГОСТ 3811-72. Ткани и штучные изделия текстильные. Методы испытаний. – М.: Изд-во стандартов, 1994. – С. 83-29.
11. ГОСТ 9913-90 (СТ СЭВ 5784-86). Материалы текстильные. Методы определения стойкости к истиранию. – М.: Изд-во стандартов, 1990. – 8 с.
12. ГОСТ 21008-93. Шерсть натуральная мытая. Методы определения массовой доли жира. – М.: Изд-во стандартов, 1994. – 8с.
13. ГОСТ 4659-79. Ткани и пряжа чистошерстяные и полушерстяные. Методы химических испытаний. – М.: Изд-во стандартов, 1980. – 8с.
14. ГОСТ 9733.4.6.27-83. Материалы текстильные. Методы испытания устойчивости окраски к стиркам, поту, трению. – М.: Изд-во стандартов, 1983. – С. 21-22.

11. Правила работы с ферментами. Лабораторные работы

Эффективное использование ферментов предполагает правильный выбор препаратов и знание техники работы с ними.

1. Ферментный препарат должен обладать способностью специфически катализировать реакцию превращения субстрата в продукт(ы). Предпочтительны препараты, где основному ферменту не сопутствуют другие, вызывающие побочные реакции превращения того же субстрата.

2. При выраженной способности основного фермента катализировать побочные реакции следует создать условия, при которых скорость побочных реакций минимальна.

3. Режим проведения биокаталитического процесса должен соответствовать физико-химическим характеристикам ферментного препарата, таким как оптимум pH и температуры, pH и термостабильности, зависимость

каталитической активности от ионного состава и ионной силы среды и т.д. При использовании двух или более ферментных препаратов с различающимися оптимумами действия, целесообразно разделить биокаталитический процесс на соответствующее число стадий, каждую из которых проводить в режиме, оптимальном для вводимого фермента.

4. При проведении биокатализа в закрытой системе важно определить оптимальное соотношение фермент: субстрат. Правильный выбор этого соотношения позволяет сократить продолжительность процесса. В большинстве процессов ферментативного гидролиза основные превращения субстратов могут быть завершены в течение 3 часов.

5. Степень очистки ферментного препарата должна соответствовать санитарным требованиям к качеству продуктов ферментации.

6. Процессы биокатализа следует проводить в реакторах, выполненных из стекла, эмалированного металла, нержавеющей стали. Необходимо исключить попадание в реакционную среду продуктов коррозии металлов из коммуникационных линий.

7. Ферментацию субстратов, диспергированных в жидкой среде, проводят при перемешивании. Это необходимо для интенсификации диффузии внутри и вблизи частиц сырья. Скорость диффузии лимитирует скорость ферментации диспергированных субстратов.

8. При регуляции температуры и реакции среды в ходе ферментации следует избегать резких локальных изменений этих параметров, во избежание инактивации ферментов.

9. Для регуляции pH используют слабые растворы кислот и щелочей таких как уксусная, фосфорная кислота, аммиак.

10. При проведении длительных ферментаций в реакционную среду вводят антисептики для предотвращения развития инфицирующей микрофлоры.

Работа № 1 .Ферментативная расшлихтовка амилазами

Исследование влияния способа ферментативной обработки на степень расшлихтовки и капиллярность ткани.

Ход эксперимента. Образец суровой хлопчатобумажной, полульняной или льняной ткани размером 5,5х20 см (по основе) пропитывают при температуре 30-40 °С, в растворе фермента, содержащем в г/л;

Фермент или композиция ферментов – 0,5; 1; 2

Неионогенный ПАВ Неонол (или Феноксол) – 0; 0,1; 0,3

Образцы отжимают на лабораторной плюсовке до степени отжима 80-100 % и помещают в стакан установленный в термостате (температура 50 °С, 65 °С). Через 20,30,60 минут образцы промывают горячей (70-75 °С) и холодной водой, сушат на воздухе. Далее оценивают степень удаления крахмала, капиллярность. По результатам исследования строят график зависимости степени расшлихтовки и капиллярности от концентрации фермента, температуры и длительности обработки.

Работа № 2. Модификация льняного волокна

Ход эксперимента. Короткое льняное волокно или льняную ровницу выдерживают в растворе ферментов, например, целлюлазы Целлюсофт (0,5 –1 % от массы обрабатываемого материала), пектиназы Вискозим (0,5-1) и смачивателя Неонол (0,1 г/л) при температуре 50-55 °С в течение 60 минут. Далее осуществляют кислование (1,5 г/л серной кислоты) в течение 10 минут при температуре 30 °С и промывают в холодной проточной воде. Образец волокна высушивают в сушильном шкафу при температуре 60 °С. Из короткого льняного волокна выделяют прядку волокон путем вычесывания нерасщепленных волокон. Производят сравнение расщепленности, гибкости

(мм), капиллярности (мм), белизны (%) по методикам ГОСТ (текстильные материалы) в сравнении с необработанным волокном или волокном подвергнутым щелочной отварке (концентрация едкого натрия 8 г/л, длительность обработки при температуре 98 °С в колбе с обратным холодильником 60 минут, кислование и промывка аналогичная).

Работа №3. Определение термостабильности амилаз

Пользуясь известными методиками, определите активность представленного препарата амилазы по отношению к крахмалу и крахмальной шликте, оценив степень расшлихтовки суровой хлопчатобумажной ткани при различных температурах (39,40,50,60,70,80, 90 °С). Сравните полученные результаты. Чем Вы можете объяснить разницу температурного оптимума активности амилаз в растворе крахмала и по отношению к крахмалу шликты?

Работа № 4. Определение активности мультиэнзимных препаратов

Осуществить анализ представленного ферментативного препарата. Выявить, какой активностью он обладает. Определить температурный и рН оптимум активности каждого из ферментов входящего в мультиэнзимный препарат. Выдать рекомендации по его использованию в технологиях подготовки текстильных препаратов.

Работа № 5. Определение действия липазы на примеси и загрязнения хлопчатобумажной ткани

Ход эксперимента. Готовят состав, моделирующий загрязнения (г): сажа – 2, минеральное масло – 20, технический ланолин – 10, технический бензин до 1000 мл.

Образцы ткани 4 шт. (миткаль) размером 5x10 см пропитывают приготовленной смесью, отжимают на плюсовке, выдерживают на воздухе до испарения бензина, и затем сушат при 100 °С в течение 60 минут. Полученные образцы обрабатывают в растворе Липолазы 1 г/л при температуре 40 °С в течение 30 минут и для сравнения в растворе ПАВ (ОП-10 или Сульфосид-61) 1 г/л, Липаза 1 г/л с ПАВ 0,1 г/л и контрольный опыт (водой). Затем образцы вынимают и промывают горячей (30 с T=70 °С) и холодной водой (проточной) и сравнивают белизну ($\lambda=540$ нм, Spekol-11) промытого образца и исходной белой ткани.

Моющую способность рассчитывают по формуле:

$$M = B_{\text{пром}} \cdot 100 / B_{\text{исх}},$$

B пром – белизна ткани (%) после обработки ферментом или ПАВ;

B исх – белизна исходной ткани (%) без загрязнения.

Работа № 6 Определение действия целлюлаз на хлопчатобумажные текстильные материалы

Ход эксперимента. Образцы суровой и отбеленной льняной ткани размером 6x25 см обрабатывают в растворе препарата Целлюсофт, концентрацией 0,5 г/л, при температуре 50 °С в термостате течение 60 минут, рН 6,5-7, далее ткань промывают горячей (T=70 °С) и холодной водой.

Сравнивают жесткость ткани по величине угла прогиба полоски ткани размером 2,5*14 см, капиллярность (за 60 мин), крашиваемость активными, прямыми красителями.

Содержание	стр.
Введение. Современное состояние и перспективы использования ферментов при подготовке текстильных материалов.	5
1. Общие принципы строения и действия ферментов	11
1.1. Особенности действия гидролаз.	11
1.2. Специфика действия амилаз, свойства, структура. Технологии подготовки , включающие ферментативную расшлихтовку.	17
1.3.«Биоотварка». Назначение и свойства компонентов полиферментных композиций в процессах очистки хлопчатобумажных и льняных тканей от примесей.	33
1.4.Перспективы использования целлюлаз и их композиций амилазами и пектиназами в технологиях подготовки целлюлозных текстильных материалов. Особенности технологических режимов биополировки и биомягчения.	46
1.5.Особенности действия гидролитических ферментов на белки. Классификация протеаз.	67
1.6. Использование окислительно-восстановительных ферментов в технологиях подготовки текстильных материалов.	97
2.Ферменты для моющих средств.	109
2.1.Свойства липаз, ферментативные препараты на их основе.	111
2.2 Приготовление жидких моющих средств (МС).	116
3. Ферментативные технологии для отделки кожи и меха	128
3.1. Ферменты для отделки кожи и меха	128
3.2. Изменение кератина и эластина при действии ферментов.	133
3.3. Использование ферментных препаратов в кожевенном и меховом производстве	135
4. Получение ферментных препаратов.	150
5. Характеристика коммерческих ферментных препаратов	153
6. Технологии биохимического синтеза и модификации химических волокон.	176
7. Методики определения каталитической и субстратной активности ферментов.	186
7.1. Определение амилазной активности ферментов	187
7.2. Методы определения липолитической активности	192
7.3. Методы определения активности липаз	196
7.4. Методы определения целлюлитической активности	198
7.5. Методы определения пектолитической активности	207
7.6. Методы определения активности протеаз	211
8 Методы оценки глубины и степени модификации субстратов растительного и животного происхождения.	218
9 Методы контроля степени модификации и качества меховых и кожевенных материалов.	246
10. Методы оценки экологичности текстильных материалов и технологии их подготовки в целом.	264
11. Правила работы с ферментами. Лабораторные работы.	274

Чешкова Анна Владимировна

Учебное пособие

*Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств,
кожи, меха :Учеб.пособие для вузов.*

Редактор О.А.Соловьёва. Подписано в печать 20.03.2007.

Формат 60X84 1/16.Бумага писчая.Усл.печ.л.16,28.

Уч.-изд.л.18,06.Тираж 100 экз. Заказ

ГОУВПО «Ивановский государственный химико-технологический
университет»

Отпечатать на полиграфическом оборудовании кафедры экономики и финансов
ГОУ ВПО «ИГХТУ»

153000, г.Иваново, пр.Ф.Энгельса, 7