



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Fermentinio apdorojimo įtakos chrominto odos pusgaminio savybėms tyrimai

Baigiamasis magistro projektas

Lukrecija Strumskytė

Projekto autorė

Prof. dr. Virgilijus Valeika

Vadovas

Kaunas, 2023



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Fermentinio apdorojimo įtakos chrominto odos pusgaminio savybėms tyrimai

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Lukrecija Strumskytė

Projekto autorė

Prof. dr. Virgilijus Valeika

Vadovas

Doc. dr. Kristina Kantminienė

Recenzentė

Kaunas, 2023



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lukrecija Strumskytė

Fermentinio apdorojimo įtakos chrominto odos pusgaminio savybėms tyrimai

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1.baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;

2.baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;

3.įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);

4 suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Lukrecija Strumskytė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Strumskytė, Lukrecija. Fermentinio apdorojimo įtakos chrominto pusgaminių savybėms tyrimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovas prof. dr. Virgilijus Valeika; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: biotechnologijos, technologijos mokslai.

Reikšminiai žodžiai: chromintas pusgaminis, oda, fermentinis preparatas.

Kaunas, 2023, 59p.

Santrauka

Odos pramonė jau nuo seno buvo svarbi žmonijos veiklos sritys. Oda yra sudėtingas įvairių baltymų ir nebaltyminių medžiagų kompleksas, todėl jos apdorojimui reikia daug sudėtingų procesų, norint iš gyvūnų odų gauti kokybišką produktą. Išdirbta oda naudojama įvairių gaminių tokių kaip avalynė, rūbai, rankinukai, automobiliai, baldai ar kitokių aksesuarų gamybai. Svarbiuose odos apdorojimo procesuose naudojamos įvairios cheminės medžiagos, kurių atliekos ir susidarę šalutiniai produktai teršia aplinką. Odos pramonėje naudojami, bet nesunaudoti chemikalai sudaro apie 80 – 90 % visų pramonėje susidarantių teršalų.

Dėl aplinkosaugos problemos, kurią sukelia didelis kiekis susidarantių teršalų, odos pramonei keliami reikalavimai griežtinami, o tai pastumia ieškoti švaresnių gamybos alternatyvų. Fermentai šioje pramonėje minkštinimo procese naudojami jau seniai, tačiau jų pritaikymas kituose procesuose dar neįgyvendintas. Mokslininkai vis dažniau atlieka tyrimus siekiant sukurti naujas, ekologiškesnes technologijas odų išdirbimui. Kadangi fermentai yra laikomi aplinkai draugiškos medžiagos juos siekiama pritaikyti ne tik gamyboje, bet ir atliekų tvarkyme.

Daug mokslinių tyrimų yra atlikta fermentus naudojant atmirkymo, plaukų šalinimo, minkštinimo bei riebalų šalinimo procesuose ir jų rezultatai skatina tobulinti esamus odų išdirbimo metodus.

Darbo metu buvo atlikti tyrimai, siekiant įvertinti fermentinių preparatų Mystozyme ABL new, Mystozyme 2000 LC, Vilzim PRO N, Zime SB Conc. ir Zime SB Extra Conc. poveikį chrominto odos pusgaminių ir odos po šlapios apdailos procesų savybėms. Jie bandyti naudoti pusgaminių neutralizavimo metu ir po jo. Tiriamojo darbo metu buvo nustatyta fermentinių preparatų įtaka chromintos odos suvirimo temperatūrai, pH, pašalintų kolageninių baltymų kiekiui, chromo junginių, dichlormetane tirpių medžiagų kiekiams po šlapios apdailos procesų, taip pat nustatytos fizikinės ir mechaninės pusgaminių savybės. Chrominto odos pusgaminių struktūros pokyčiai buvo įvertinti atlikus infraraudojimų spindulių spektroskopijos ir termogravimetrinę analizes.

Strumskytė, Lukrecija. Investigation of Enzymatic Treatment Influence on Properties of Chromes Semi Manufactured Leather. Master's Final Degree Project / supervisor prof. Dr. Virgilijus Valeika; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: biotechnology, technological sciences.

Keywords: chromed semi-finished product, leather, enzymatic preparation.

Kaunas, 2023, 59.

Summary

The leather industry has been an important area of human activity since ancient times. Leather is a complex of various proteins and non-protein substances, so its processing requires many different and complex processes in order to obtain a quality product from animal hides. Processed leather is used in production for all kinds of products such as footwear, clothes, handbags, cars, furniture or other accessories. Important leather processing steps use various chemicals, and the accumulated waste and by-products pollute the environment. Chemicals used in the leather industry account for about 80-90% of all industrial pollutants.

Due to the environmental problem caused by the large amount of pollutants produced, the requirements placed on the leather industry are being tightened, which is pushing the search for cleaner production alternatives. Enzymes have been used in the softening process in this industry for a long time, but their application in other processes has not yet been realized. Scientists are increasingly conducting research to develop new, more ecological technologies for leather processing. Since enzymes are considered environmentally friendly materials, they are intended to be applied not only in production, but also in waste management.

A lot of scientific research has been conducted on the use of enzymes in soaking, hair removal, softening and degreasing processes, and their results encourage the improvement of existing leather processing methods.

During the work, tests were carried out to evaluate the enzyme preparations Mystozyme ABL new, Mystozyme 2000 LC, Vilzim PRO N, Zime SB Conc. and Zime SB Extra Conc. effect on the properties of the chromed leather semi-finished product and leather after wet finishing processes. They were used during and after the neutralization of the semi-finished product. During the research work, the influence of enzymatic preparations on the welding temperature of chrome-plated leather, pH, the amount of removed collagen proteins, the amount of chromium compounds, substances soluble in dichloromethane after wet finishing processes was determined, as well as the physical and mechanical properties of the semi-finished product. Changes in the structure of the chrome-plated leather semi-finished product were evaluated by infrared spectroscopy and thermogravimetric analyses.

Turinys	
Paveikslų sąrašas	8
Lentelių sąrašas	9
Įvadas.....	11
1. Literatūros apžvalga	12
1.1 Odos baltyminė sandara.....	12
1.1.1 Kolageno savybės ir jo panaudojimas	14
1.1.2 Biologinės kolageno savybės	16
1.2 Bioaktyvių medžiagų panaudojimas išdirbant odas	17
1.2.1 Fermentai odų pramonėje	17
1.3 Literatūros apžvalgos apibendrinimas	22
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	22
2.1 Tyrimo objektas	22
2.2 Naudotos medžiagos ir technologijos.....	22
2.3 Analizių metodai	24
2.3.1 Fermentų aktyvumo nustatymas	24
2.3.2 Kolageninių baltymų kiekio nustatymas	26
2.3.3 Kolagenolitinio fermentinių preparatų aktyvumo nustatymas	27
2.3.4 Suvirimo temperatūros nustatymas	28
2.3.5 Cr (III) oksido kiekio nustatymas	28
2.3.6 Fizikinių ir mechaninių savybių nustatymas	29
2.3.7 Odos ištraukos pH nustatymas	29
2.3.8 Vandens garų sorbcijos nustatymas.....	29
2.3.9 Drėgnio nustatymas	30
2.3.10 Dichlormetane tirpių medžiagų kiekio nustatymas	30
2.3.11 Infraraudonoji spektroskopija.....	30
2.3.12 Termogravimetrinė analizė.....	31
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	32
3.1 Fermentinių preparatų proteolitinio aktyvumo tyrimas.....	32
3.1.1 Kazeinolitinis fermentų aktyvumas	32
3.1.2 Fermentinių preparatų kolagenolitinio aktyvumo tyrimai.....	36
3.2 Fermentinio apdorojimo įtaka chrominto pusgaminių struktūros pokyčiams	37
3.2.1 Suvirimo temperatūros pokyčiai.....	37
3.2.2 Cr (III) oksido kiekis odoje nustatymas	40
3.2.3 Poveikio kolagenui tyrimai.....	41

3.2.4 Fermentinio apdorojimo įtaka fizikinėms ir mechaninėms chrominto pusgaminio savybėms	43
3.2.5 Kolagenolitinio fermentinių preparatų aktyvumo kitimo chrominto pusgaminio neutralizavimo metu tyrimai.....	44
3.3 Fermentinio apdorojimo įtaka odos pusgaminio po šlapios apdailos savybėms	45
3.3.1 Dažų įsiskverbimas ir pasiskirstymas odos pusgaminyje.....	45
3.3.2 Fizikinių ir mechaninių odos savybių nustatymas.....	47
3.3.3 Pusgaminio cheminės savybės	48
3.4 Odos bandinių infraraudonoji spektroskopinė analizė	48
3.5 Odos bandinių termogravimetrinė analizė.....	52
4. Rekomendacijų dalis	53
Literatūros sąrašas	55
Priedai.....	60

Paveikslų sąrašas

1.1. pav. Odos apdorojimo procedūrų schema.....	18
3.1 pav. Fermentinių preparatų kazeinolitinio aktyvumo priklausomybė nuo pH kai temperatūra 30 °C	33
3.2 pav. Fermentinių preparatų kazeinolitinio aktyvumo priklausomybė nuo pH kai temperatūra 40 °C	34
3.3 pav. Fermentinių preparatų kazeinolitinio aktyvumo priklausomybė nuo pH kai temperatūra 50 °C	35
3.4 pav. Fermentinių preparatų kolagenolitinio aktyvumo priklausomybė nuo terpės pH kai temperatūra 40 °C.	37
3.5 pav. Pašalintų iš odos kolageninių baltymų kiekio priklausomybė nuo apdorojimo būdo.....	42
3.6 B pav. Vandens sorbcijos chromintu pusgaminiu priklausomybė nuo jo apdorojimo būdo. I – įprastai neutralizuotas; II – neutralizuotas kartu dedant FP Zime SB Extra Conc. 5%; III – neutralizuotas ir papildomai 1,5 val. apdorotas dedant FP Zime SB Extra Conc. 5%	44
3.7 pav. Fermentinių preparatų aktyvumo priklausomybė nuo neutralizavimo trukmės.....	45
3.8 pav. Dažyto chrominto pusgaminio skerspjūvio nuotraukos. A – kontrolinis dažytos odos bandinys; B – neutralizavimo metu dėta 5% FP Zime SB Extra Conc ; C – atliktas papildomas fermentinis apdorojimas po neutralizavimo dedant 5% FP Zime SB Extra Conc	46
3.9 pav. Dažyto pusgaminio, kontrolinis be FP, IR spektras	50
3.10 pav. Dažyto pusgaminio, kurį neutralizuojant naudotas Zime SB Extra Conc FP, IR spektras	51
3.11 pav. Dažyto pusgaminio, kuris po neutralizacijos buvo papildomai apdorotas Zime SB Extra Conc. FP, IR spektras	51
3.12 pav. Odos bandinių masės pokyčio priklausomybė nuo temperatūros. I – neutralizuotas kartu dedant FP Zime SB Extra Conc. 5%; II – neutralizuotas ir papildomai 1,5 val. apdorotas dedant FP Zime SB Extra Conc. 5% III – įprastai neutralizuotas	52
4.1 pav. Odos apdorojimo technologinė schema:	53

Lentelių sąrašas

2.1 lentelė. Cheminiai reagentai.....	22
2.2 lentelė. Techniniai produktai.....	23
2.3 lentelė. Pusgaminio išdirbimo metodika.....	24
3.1 lentelė. Neutralizavimo ir fermentinio apdorojimo parametrų, ir jų atlikimo tvarkos įtaka pusgaminio suvirimo temperatūrai bei tirpalo ir pusgaminio pH.....	39
3.2 lentelė. Skirtingai apdorotų odos bandinių suvirimo temperatūra po šlapios apdailos procesų .	40
3.3 lentelė. Chromo junginių kiekis odoje	40
3.4. A lentelė. Chrominto pusgaminio fizikinių ir mechaninių savybių priklausomybė nuo apdorojimo būdo	43
3.5 lentelė. Dažinių spalvos įvertinimas	47
3.6 lentelė Pusgaminio po šlapios apdailos stiprio savybių priklausomybė nuo chrominto pusgaminio apdorojimo būdo.....	47
3.7 lentelė. IR spektroskopijos analizė po dažymo ir riebinimo procesų.....	49

Santrumpų ir terminų sąrašas

FP – fermentinis preparatas

IR – infraraudonieji spinduliai

TGA – termogravimetrinė analizė

Įvadas

Didėjant socialiniai ir ekonominei žmonijos veiklai pasaulio gamta palaipsniui nyksta, o tai sukelia socialinę ir aplinkosaugos krizę. Gamybos pramonės šakos daro neigiamą poveikį gamtai, todėl yra griežtinamos gamybos taisyklės ir standartai. Viena iš tokių pramonės šakų yra odos gamyba. Nors odų gamyboje naudojamos mėsos pramonės atliekos (oda / kailiai), tačiau gamyba apima daugybę procesų, kuriuose yra naudojamos labai įvairios ir kenksmingos medžiagos [1].

Dabartinė odos apdorojimo pramonė pereina prie švaresnių technologijų, tokių kaip fermentiška sustiprintų procesų, kūrimo ir panaudojimo. Fermentų pritaikymas įvairiuose procesuose sėkmingai tiriamas bei integruojamas geresnės kokybės odų gamyboje, kuri sukuria mažesnę taršą, taip pat palengvina atliekų tvarkymą [2].

Projekto tikslas – nustatyti chromintos ir neutralizuotos odos apdorojimo fermentais įtaką chrominto pusgaminio struktūros pokyčiams, šlapios apdailos procesams ir odos savybėms po šių procesų.

Projekto uždaviniai:

1. nustatyti odos pramonėje naudojamų fermentinių preparatų kazeinolitinio ir kolagenolitinio aktyvumo priklausomybes nuo terpės pH ir temperatūros.
2. nustatyti ir įvertinti įvairiais būdais apdoroto fermentais chrominto odos pusgaminio struktūrinius pokyčius ir fizikines bei mechanines savybes.
3. ištirti fermentinių preparatų aktyvumo kitimo priklausomybę nuo neutralizavimo proceso trukmės.
4. ištirti fermentinių priedų įtaką šlapios apdailos (dažymo ir riebinimo) procesų eigai.
5. nustatyti ir įvertinti odos pusgaminio po šlapios apdailos procesų chemines ir fizikines savybes.
6. infraraudonosios spektroskopijos analize įvertinti odos pusgaminio struktūrinius skirtumus įvairiai apdorojant fermentiniais preparatais.

1. Literatūros apžvalga

1.1 Odos baltyminė sandara

Oda yra didžiausias žmogaus kūno organas. Oda apsaugo išorinės aplinkos kenksmingo poveikio, taip pat dalyvauja medžiagų apykaitoje ir padeda reguliuoti organizmo temperatūrą. Gebėjimą reaguoti į aplinkos dirginimą lemia odoje išsidėsčiusios nervinės galūnės. Odos sluoksnių storis, pigmentacija ir pasiskirstymas įvairiose kūno vietose skiriasi, priklausomai nuo srities funkcijos ir poreikių [3].

Tai sudėtingas epitelio ir mezenchiminis audinys, susidedantis iš daugiasluoksnio epidermio, dermos ir poodžio bei papildomų struktūrų, tokių kaip plaukų folikulai, prakaito liaukos ir riebalinės liaukos. Oda sudaro apie 15% viso suaugusio žmogaus kūno svorio ir jo paviršiaus plotas yra 1,5- 2 m², todėl jis yra didžiausias organas žmogaus kūne. Šis organas susideda iš trijų pagrindinių sluoksnių:

- epidermio;
- dermos;
- poodžio [4].

Epidermio sluoksnis yra labiausiai išorinis sluoksnis, kuriame daugiausia yra keratinocitų. Bazalinė membrana, esanti tarp epidermio ir dermos sluoksnių, yra plonas specializuotos tarpląstelinės matricos sluoksnis, prie kurio laikosi epidermis. Po bazaline membrana yra odos sluoksnis, susidedantis iš dviejų sričių – papiliarinės (liaukinės) dermos ir tinklinės dermos. Odos sluoksnio ekstraląstelinė matrica daugiausia sudaryta iš fibrilinių kolagenų ir kitų susijusių baltymų. Liaukinis dermos sluoksnis yra viršutinis dermos sluoksnis ir yra sudarytas iš plonų kolageno plaušelių, o tinklinė derma yra apatinis dermos sluoksnis ir susideda iš storesnių, tankesnių kolageno plaušelių [5].

Epidermis yra išorinis odos sluoksnis, o pagrindinės ląstelės yra keratinocitai (95 % ląstelių). *Melanocitai*, *Langerhanso* ląstelės ir *Merkel* ląstelės sudaro likusius 5 proc. Epidermis susideda iš keturių pagrindinių sluoksnių – raginio (išorinis sluoksnis), grūdėtojo, spygliuotojo ir bazalinio sluoksnių. Po bazaliniu yra pamatinė membranos sluoksnis (vidinis sluoksnis), kuri apriboja ir atskiria epidermį nuo dermos [4].

Epidermis įsiterpdamas į dermą, sudaro iškyšas žemyn, vadinamas keteromis, kur skylutės užpildytos kupolo formos papilėmis. Ši konfiguracija padeda pritvirtinti epidermio struktūrą prie dermos. Kateros ryškiausios odos dalyse, kuriose yra didžiausia trintis, pavyzdžiui delnų ir padų oda.

Epidermio ląstelės dalijasi ir diferencijuojasi. Ląstelių dalijimasis vyksta pamatinių ląstelių sluoksnyje, ir diferencijuojasi virš jo esančiuose sluoksniuose [6, 7].

Odos kamieninės ląstelės yra pamatiniame arba kitaip tariant, bazaliniame sluoksnyje (*stratum basale*) vidiniame folikuliniame epidermyje ir iš jų susidaro keratinocitai. Normaliai odos homeostazei dukterinės ląstelės iš pamatinio ląstelių sluoksnio migruoja aukštyn ir pradeda procesą – diferenciaciją. Tai trunka apie 2 savaites, ląstelės migruoja iš pamatinio ląstelių sluoksnio į viršų link grūdėtojo ląstelių sluoksnio ir dar 2 savaites užtrunka ląstelės, kol per raginį sluoksnį patenka į

paviršių, kur pagaliau pasišalina. Įvairūs sužalojimai ir uždegimai padidina ląstelių dauginimosi ir brendimo greitį [6].

Stratum spinosum arba kitaip dygliuotasis ląstelių sluoksnis yra virš pamatinio sluoksnio ir susideda iš keratinocitų, kurie išsiskiria iš pamatinių ląstelių, esančių po juo. Keratinocitai gamina keratiną, pluoštinį baltymą, kuris yra pagrindinis raginio sluoksnio komponentas. Diferenciacijos procesas toliau tęsiasi granuliuotame ląstelių sluoksnyje (*stratum granulosum*), kuriame ląstelės įgauna papildomo keratino ir tampa plokštesnės. Taip pat juose yra išskirtinių tamsių granulių, kurios yra sudarytos iš keratohialino. Keratohialino sudėtyje yra du baltymai, iš kurių vienas vadinamas profilagrinas, filagrino pirmtakas. Filagrinas yra svarbus agreguojant keratino gijas raginiame sluoksnyje. Kitas baltymas yra vadinamas involukrinas (lotynų kalboje reiškia „vokas“) ir yra svarbus formuojant raginio sluoksnio ląstelių apvaskalą. Granuliuotose ląstelėse taip pat yra sluoksniuotų granulių. Sluoksniuotose granulėse yra polisacharidai, glikoproteinai ir lipidai, kurie išsiveržia į tarpląstelinę erdvę ir manoma, kad tai padeda sudaryti „cementą“, laikantį raginį sluoksnį. Taip pat granuliuotose ląstelėse randami degraduojantys fermentai, jie yra atsakingi už galutinį ląstelių branduolių ir intracitoplazminių organelių sunaikinimą [5].

Išorinis epidermio sluoksnis yra raginis sluoksnis (*stratum corneum*). Čia esančios ląstelės, žinomos kaip korneocitai, pradėję savo branduolius ir citoplazmines organeles. Korneocitų plazminės membranos sudarytos iš labai netirpių suragėjusių „vokų“, kryžminiu ryšiu sujungtų tirpių baltymų pirmtakų, tokio kaip involukrino ir lorikrino. Pastarasis sudaro 70–85 % masės suragėjusios ląstelės apvaskalo. Raginiame sluoksnyje taip pat yra keletas lipidų (riebalų rūgščių, sterolių, keramidų), išsiskiriančių iš sluoksniuotų granulių viršutiniame gyvajame epidermyje [4].

Epidermį nuo dermos skiria bazinės membranos zona. Zonos skersmuo <200 nm, ši odos sritis sudaryta iš sudėtingo makromolekulių tinklo, kurios jungia pamatinio sluoksnio keratinomicetus tarpinėmis keratino gijomis su kolageno skaidulomis paviršinėje dermoje [4]. Bazalinė membrana yra sudėtingas IV tipo kolageno, laminino, nidogeno / entaktino ir heparino sulfato proteoglikanų rinkinys. Be to, kiti baltymai, tokie kaip VII tipo segmentinis kolagenas, tinklinį sluoksnį pritvirtina prie pamatinio sluoksnio bazalinėje membranoje, kuri skatina epidermio ir odos sukibimą [8]. Pagrindinė baltymų ir glikoproteinų funkcija, bazinės membranos zonoje yra užtikrinti sukibimą tarp epidermio ir dermos [3, 4].

Apie 70 % sausos dermos masės sudaro kolagenai, gerai žinoma, kad dermos sluoksnio baltymų sudėtis apima fibriles formuojantį I ir III tipo kolageną [4, 9]. Derma sudaryta iš komponentų: kolageno skaidulų, elastinių audinių, gruntinių medžiagų ir ląstelių: fibroplastų, plazmos ląstelių, limfocitų, dextritinių ląstelių, histocitų [4]. Dermoje nėra akivaizdžios diferenciacijos sekos, lyginant su epidermio diferenciacija, tačiau jungiamojo audinio komponentų struktūra ir forma yra nuspėjama priklausomai nuo gylio. Matricos komponentai, įskaitant kolageną ir elastinį jungiamąjį audinį, taip pat skiriasi priklausomai nuo gylio ir keičiasi bei remodeliuojasi normalioje odoje, vykstant patologiniams procesams ir reaguojant į išorinius dirgiklius [3]. Pagrindinis dermos komponentas yra kolagenas, pluoštinių baltymų šeima, turinti mažiausiai 15 genetiškai skirtingų tipų žmogaus odoje ir dar didesnę tipų įvairovę kituose stuburiniuose gyvūnuose. Kolagenas yra pagrindinė stresui atspari odos medžiaga. Čia taip pat yra baltymas elastinas, kurio elastingi plaušeliai atlieka tam tikrą

vaidmenį išlaikant elastingumą, tačiau labai mažai atsparūs odos deformacijai ir plyšimui. Kolageno plaušeliai egzistuoja nuolat keičiantis, skaidomi proteolitinių fermentų, vadinamų atsarginėmis kolagenazėmis, pakeičiami naujais plaušeliais [3].

Elastino plaušeliai yra minkštesni nei kolageno plaušeliai, bet suteikia odai tamprumo. Jie sudaro apie 5 proc. sausos dermos masės ir susideda elastino mikrofibrilių [4, 7]. Turi du skirtingus baltymų komponentus: amorfinę elastino šerdį ir aplinkinį elastininį mikrofibrilinį komponentą. Elastino šerdis sudaryta iš polipeptidų, turinčių daug glicino, desmozino ir valino, susieta su mikrofibriliniu komponentu per savo desmozino radikalus [7].

Kolagenas ir elastinas yra pluoštiniai baltymai, kurie sudaro stiprią, tačiau suderinamą skeleto matricą. Viršutinėje dermos dalyje (liaukiniame sluoksnyje) kolageno plaušeliai yra smulkūs ir laisvai išsidėję. Likusioje dermos dalyje (tinkliniame sluoksnyje) plaušeliai yra stori ir tankūs. Elastino plaušeliai daugiausia yra tinkliniame dermos sluoksnyje, kur jie yra plonesni ir laisviau išsidėję nei kolageno plaušeliai. Ekstrafibrilinė matrica užpildo tarpą tarp plaušelių. Tai nepluoštinė medžiaga, sudaryta iš kelių skirtingų gleivinių polisacharidų molekulių, bendrai vadinamų proteoglikanais arba glikozaminoglikanais. Ekstrafibrilinė matrica suteikia dermai skystesnę būseną, o tai palengvina judėjimą skysčių, molekulių ir uždegiminių ląstelių [5].

Amorfinę pagrindinę dermos medžiagą daugiausia sudaro du glikozaminoglikanai (hialurono rūgštis ir dermatano sulfatas) su mažesniais kiekiais heparino sulfato ir chondroitino sulfato. Glikozaminoglikanai yra sujungti su pagrindiniu baltymu ir egzistuoja kaip proteoglikanai [7].

Poodis yra vidinis odos sluoksnis ir susideda iš lipocitų [4]. Poodinių riebalų sluoksnis yra tarp dermos ir apatinės fascijos. Lipocitai yra išdėstyti į riebalines skilteles, kurias viena nuo kitos skiria plaušelių pertvaros. Plaušelių pluoštai, kylantys iš dermos ir besitęsiantys į poodį, sustiprina ryšį tarp šių dviejų sluoksnių [5]. Poodinis audinys, laikomas endokrininiu organu, suteikia kūnui gyvumo ir veikia kaip energijos sandėlis [4, 6].

1.1.1 Kolageno savybės ir jo panaudojimas

Kolagenas yra gausiausias baltymas žinduoliuose. Jis suteikia mechaninį stabilumą, stiprumą ir tvirtumą įvairiems audiniams nuo sausgyslių ir raiščių iki odos, ragenos, kaulų ir dentino. Šie audiniai turi gana skirtingus mechaninius reikalavimus, vieni turi būti elastingi arba kaupti mechaninę energiją, o kiti turi būti standūs ir kieti. Tai rodo kolageno, kaip statybinės medžiagos, universalumą. Nors kai kuriais atvejais (kaulo ir dentino) standumas padidėja įterpus mineralinių medžiagų, mechaninės savybės paprastai labiau priklauso nuo hierarchinės struktūros, o ne nuo cheminės sudėties. Pagrindinė kolageno turtingų audinių statybinė medžiaga yra kolageno fibrilė – plaušelis, kurio storis gali būti nuo 50 iki kelių šimtų nanometrų. Tada šios fibrilės sudaro daugybę sudėtingesnių struktūrų, turinčių labai skirtingas mechanines savybes [10]. Kolagenas yra baltymas, turintis tris polipeptidines grandines. Kiekviena grandinė turi apie 1000 aminorūgščių ir turi bent vieną pasikartojančios aminorūgščių sekos Gly-X-Y atkarpą (kur X ir Y gali būti bet kuri aminorūgštis, bet paprastai yra atitinkamai prolinas ir hidroksiprolinas [11]). Pagrindinis kolageno vienetas – tropokolagenas, yra standžios lazdelės formos molekulė, kurios ilgis yra maždaug 3000 Å

ir skersmuo – 15 Å [12]. Kolagenai turi dviejų skirtingų tipų struktūras: trispiralinę spiralę ir globulinę. Dauguma kolagenų susideda iš dviejų α -1 grandinių ir vienos α -2 grandinės. Atskira α grandinė yra kairinė spiralė, turinti maždaug 3,3 pozicijos radikalus viename posūkyje. α -grandinės yra susuktos kartu, kad susidarytų dešinioji superspiralinė struktūra. Vandeniliniai ryšiai susidaro tarp skirtingų grandinių radikalų. Būdinga abiejų grandinių struktūra yra pasikartojantis trijų aminorūgščių vienetas; trečdalis visų aminorūgščių kiekvienoje kolageno grandinėje yra glicinas (Gly), prolinas (Pro) ir hidroksiprolinas (Hyp) dažnai būna išsidėstę vienas paskui kitą, o apie 10% molekulės turi seką Gly-Pro-Hyp [13]. Prokolagenas yra tropokolageno pirmtakas. Prokolageno molekulė turi tris pro- α grandines, išsidėsčiusias trispiralinėje spiraleje konformacijoje ir skiriasi nuo tropokolageno tuo, kad joje yra šešios ekstraglobulinės uodegos. Amino grupės gale propeptide yra intragrandinių (bet ne tarpgrandinių) disulfidinių ryšių, o polipeptidai iš karboksi grupės galo srities yra sujungti vienas su kitu disulfidiniais tilteliais. Nespiralinės prokolageno sritys iš dalies skaidomos prokolageno peptidazės [14].

Kolageno superšeimą sudaro 28 nariai (kolageno tipai), sunumeruoti romėniškais skaitmenimis stuburiniams gyvūnams (I–XXVIII) [12]. Kolagenai susideda iš trijų polipeptidinių grandinių, jos sunumeruotos arabiškais skaitmenimis. Yra daug genetiškai skirtingų kolageno baltymų, kurių visi turi trigubas spiralinės molekules ir kuriuose gausu hidroksiprolino ir hidroksilizino [7]. Be 28 kolageno tipų, tolesnė įvairovė atsiranda kolageno šeimoje, nes egzistuoja kelios molekulinės to paties kolageno tipo izoformos (pvz., IV ir VI kolagenai) ir hibridinės izoformos, sudarytų iš grandinės, priklausančios dviem skirtingiems kolageno tipams [12].

Fibriliniai kolagenai yra gausiausias kolagenas stuburiniuose gyvūnuose, atlieka struktūrinį vaidmenį, prisidėdamas prie molekulinės architektūros, formos ir mechaninių savybių audinių [12]. Šioje grupėje yra I, II, III, V ir XI tipo kolagenai. Tie kolagenai sudaro labai organizuotus plaušelius ir fibriles, ir suteikia struktūrinę kūno atramą skelete, odoje, kraujagyslėse, nervuose, žarnyne ir organų pluoštinėse kapsulėse [15]. Fibrilės dažnai suskirstytos į pluoštelių arba lameles, o fibrilių dydis ir aukštesnės eilės išsidėstymas lemia specifines audinių, biomechanines ir kitas biologines savybes [16]. I tipo kolagenas yra gausiausias iš kolagenų [10]. Taip pat žinoma, kad III tipo kolageno yra daugelyje audinių, įskaitant odą, tačiau jo koncentracija mažesnė nei I tipo [8]. Beje, nustatyta, kad tiek I, tiek III tipo kolagenų kiekių santykiai bet kurioje dermos vietoje yra maždaug 81–90:10–19 [6]. I tipo kolagenas susideda iš trijų grandinių, dviejų identiškų α -1 (I) grandinių ir vienos skirtingos grandinės, vadinamos α -2 (I). I tipo kolageno gausu kauluose, sausgyslėse, odoje, raiščiuose, arterijose, gimdoje ir ragenoje ir sudaro 80–99 % viso kolageno. I tipo kolagenas yra labai svarbus, tą įrodo mutacijų tyrimai, kai dėl delecijų, intarpų ir pavienių aminorūgščių pakeitimų atsirado netobula osteogenezė, Ehlers-Danlos sindromai ir daugelis degeneracinių ligų. I tipo kolagenas yra viena iš svarbiausių stresą pernešančių baltymų struktūrų žinduoliuose. Kad fibrilė galėtų atlikti šią funkciją, formavimosi metu fibrilių tarpinės sritys susilenkia dėl mažo prolino ir hidroksiprolino kiekio, todėl sumažėja tankis, palyginti su persidengimo sritimi [13]. III tipo kolagenas susideda iš trijų identiškų α -1 (III) grandinių. Šiame kolagene yra daug hidroksiprolino ir mažai hidroksilizino. Tai yra normalios odos sudedamoji dalis (10–20 % viso kolageno) ir randama daugelyje kitų jungiamųjų audinių. Kartu su I tipo kolagenu randamas plaučiuose, širdies vožtuvuose, širdies raumenyje, gimdoje, nervuose, kepenyse, placentoje, virkštelėje, kraujagyslėse, blužnyje, dantenose, inkstuose, limfmazgiuose, skleroje taip pat normaliose akių, kaulų struktūrose. III tipo

kolagenas yra susijęs su audinių tamprumu ir gali prisidėti prie elastingumo, šios unikalios biologinės savybės, susijusios su šia kolageno izoforma [13].

Nefibriliniai kolagenai klasifikuojami pagal jų molekulinės charakteristikas, supramolekulinės struktūras ir tarpląstelinių tinklų tipus bazinės membranos kolagenuose, trumpos grandinės kolagenuose ir su fibrilėmis susijusiuose kolagenuose [13].

Bioaktyvūs fragmentai, kurie susidaro dėl proteolitinio kolagenų skilimo, reguliuoja daugybę fiziologinių ir patologinių procesų, tokių kaip vystymasis, angiogenezė, naviko augimas ir metastazės bei audinių atstatymas. Šie fragmentai, vadinami matrikriptiniais, padidina funkcinę kolagenų įvairovę, nes dauguma iš jų pasižymi biologine veikla, kuri skiriasi nuo savo pradinės molekulės funkcijų. Vienas kolageno tipas gali skilti į keletą matrikriptinų (kolageno IV). Dauguma kolageno matrikriptinai gaunami iš bazinės membranos kolagenų (IV, VIII ir XVIII kolagenai) arba esančių bazinės membranos zonoje (XV ir XIX kolagenai) ir pasižymi antiangiogeninėmis bei priešnavikinėmis savybėmis [12].

Kai kurie kolageno tipai su ribotu audinių pasiskirstymu atlieka specifines biologines funkcijas. Kolagenas VII yra tvirtinimo komponentas fibrilių ir dalyvauja dermos-epidermio sukibime [12].

1.1.2 Biologinės kolageno savybės

Kolagenas pasižymi daugybe biocheminių ir biofizinių savybių, todėl jis yra svarbi biomedžiaga. Šios savybės apima: tirpumą, stiprumą, tarpląstelinės sąveikos tarpininkavimą, kontroliuojamą stabilumą, biologinį skaidomumą ir mažą imunogeniškumą [13]. Kolagenas biosintetinamas tokiu būdu, kuris leidžia ląstelėms išskirti tirpų kolageną ir vėliau jį modifikuoti, kad susidarytų įvairūs struktūriniai modeliai [17]. Didesnė dalis natūralaus kolageno yra netirpi, tačiau didžioji dalis netirpaus kolageno yra ištirpinama proteolitiniais fermentais, nepažeidžiant pagrindinės, standžios trigubos spiralės struktūros [13]. Svarbios fizikinės ir mechaninės kolageno savybės yra didelis atsparumas tempimui ir minimalus tamprumas, kuris priklauso nuo netirpaus kolageno kiekio (skersinių ryšių skaičiaus) ir sąveikos su glikoproteinais ir proteoglikanais. Todėl kolagenas turi savybę atlaikyti stiprias tempimo ir gniuždymo jėgas [18]. Kolagenas yra natūralus substratas įvairių kūno ląstelėms ir audiniams palaikyti ir augti. Jis veikia kaip karkasas kartu su kitomis tarpląstelinėmis molekulėmis, tokiomis kaip glikozaminoglikanai ir fibronektinas. Be to, manoma, kad kolagenas gali skatinti žaizdų gijimą dėl kitų chemotoksinių savybių, veikdamas kaip branduolių susidarymo centrai, formuojantys fibrilines struktūras [19]. Cheminės kolageno savybės priklauso nuo kovalentinių skersinių ryšių, kurie suteikia kolagenui kontroliuojamą stabilumą. Yra dviejų tipų skersiniai ryšiai: vidiniai molekuliniai ir tarpmolekuliniai skersiniai ryšiai [20]. Skersiniai ryšiai gali susidaryti kolagene in vitro veikiant fiziniams veiksniai arba cheminiais reagentais, suteikiant jam struktūrą ir stabilumą [13]. Kolagenas yra biologiškai skaidus, jį in vitro skaido kolagenazės, kurios skaido esant tinkamiems pH ir temperatūrai [18]. Šis procesas yra biologinis mechanizmas, kuris kartu su jo biosinteze kontroliuoja augimą, morfogenezę ir kolageno atstatymą [20]. Kolagenas turi mažą imunogeniškumą, ypač kai yra išgrynintas, nedenatūruotas [21, 22]. Pirminio antigeninio kolageno vieta yra nesprialinėse struktūrose, C-, ir N-galų molekulės srityse, vadinamomis telopeptidais. Silpnas

kolageno antigeniškumas susijęs su jo atsparumu skaidymui įprastais proteolitiniais fermentais [23] ir jo spiralinės struktūros gebėjimu užmaskuoti galimus antigeninius determinantus [13].

1.2 Bioaktyvių medžiagų panaudojimas išdirbant odas

1.2.1 Fermentai odų pramonėje

Odos išdirbimas buvo svarbi žmonių poreikių dalis jau nuo civilizacijos pradžios. Odos paklausa nuolat skatino šio sektoriaus technologijų tobulinimą. Kiekvienais metais visame pasaulyje odų gamybai sunaudojama apie septynis milijonus tonų neišdirbtų kailių ir odų. Tačiau dėl didelės koncentracijos chemikalų, naudojamų apdorojant gyvūnų odas ir liekančių nuotėkose, kelia didelį pavojų aplinkai [24].

Odos gamyba yra viena iš plačiai paplitusių visame pasaulyje pramonės sričių, apimanti įvairių cheminių medžiagų, kurių daugelis yra pavojingos, naudojimą. Dėl didelio kiekio naudojamų chemikalų ir cheminių produktų susidarantių nuotekos lieka užterštos didele cheminių medžiagų koncentracija [25].

Odos pramonė dėl vandens taršos, neatsakingo kietųjų atliekų šalinimo ir išmetamųjų dujų charakterizuojama kaip raudonoji pramonė ir patiria didelį spaudimą plėtoti aplinką tausojančius odos gamybos procesus, kurie atitiktų šiuolaikinius taršos ir atliekų tvarkymo teisės aktus [26].

Yra žinoma, kad procesuose iki tanidinimo ir ir tanidinant susidaro apie 80–90 % visos odos taršos apkrovos. Siekiant sumažinti nuodingų cheminių medžiagų keliamus pavojus, buvo nustatyta, kad fermentai yra perspektyvi alternatyva naudoti apdorojimo metu ir atliekų tvarkymui. Nors fermentai odos pramonėje buvo naudojami seniai, daugiausia dėl jų aktyvumo baltymams ir riebalams, tačiau visiškai pakeisti visus kitus chemikalus fermentais dar nepavyksta [24, 27]. Fermentai yra ypatingos baltymų molekulės, kurios cheminėse reakcijose elgiasi kaip katalizatoriai. Jų specifiškumas suteikia daug tikslesnę proceso kontrolę, o jų efektyvumas, reikalaujantis mažai energijos sąnaudų ir švelnių sąlygų, turi akivaizdžių aplinkosaugos pranašumų. Jie gali būti naudojami biologinėms pramonės atliekoms apdoroti, o patys yra biologiškai skaidūs ir lengvai sorbuojami atgal į gamtą. Jie yra pavyzdiniai žaliųjų technologijų agentai. Fermentai plačiai naudojami odos gamyboje mirkymo, plikimo, minkštinimo ir riebalų šalinimo procesuose [25].

Oda yra natūrali medžiaga. Odos dermos pagrindas yra trijų matmenų kolageno pluošto spiralės, kurios yra natūralūs pluoštiniai baltymai. Odos apdorojimas apima odų pavertimą nepūvančia funkcine medžiaga, pasižyminčia terminiu ir mechaniniu stabilumu [28].

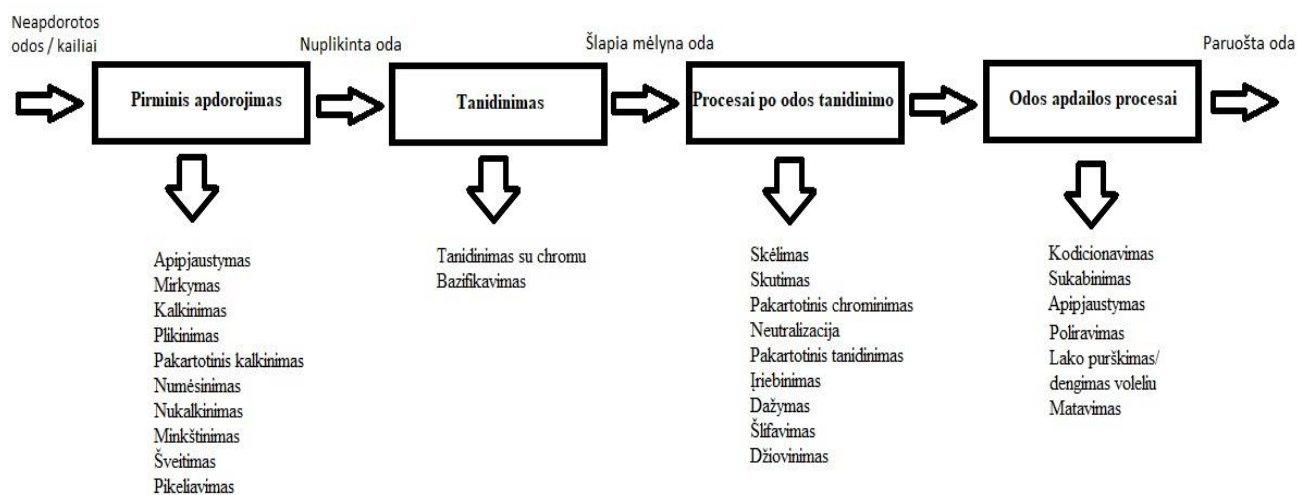
Fermentais pagrįstas biologinis apdorojimas naudojamas kai kuriuose svarbiuose odos gamybos etapuose, pvz., mirkymo, kalkinimo, balinimo, riebalų šalinimo ir kt. Be to, fermentai tampa vis svarbesni plaukų šalinimo procese, todėl mažėja poreikis naudoti natrio sulfidą, kuris apsunkina atliekų tvarkymą [29].

Odų apdorojimas apima daugybę atskirų procesų ir operacijų, kurias galima sugrupuoti į tris pagrindines grupes:

- procesai ir operacijos prieš tanidinimą;
- tanidinimas;
- procesai ir operacijos po tanidinimo.

Procesuose prieš tanidinimą iš odų šalinamos nekolageninės medžiagos. Tanidinimo procesas laikui stabilizuoja odos ar kailio matricą tarpmolekuliniiais ir intramolekuliniiais ryšiais kolagene per tinkamas tanidinimo medžiagas, o po tanidinimo atliekami apdailos procesai, kurie suteikia apsauginį paviršių ir estetinę vertę [30].

Šiuo metu dauguma odų išdirbimo procesams skirtų fermentinių preparatų nėra pakankamai specifiški. Fermentai gali būti naudojami visuose odos pramonės gamybos etapuose, galbūt išskyrus patį tanidinimą. Šiuo metu gana sėkmingai yra naudojami biologiniai metodai mirkymui (plovimui ir rehidratacijai), plaukų šalinimui, nepageidaujamų baltymų šalinimui ir daliniam riebalų šalinimui [29].



1.1. pav. Odos apdorojimo procedūrų schema

1.2.1.1 Atmirkymo ir plikinimo skatinimas fermentais

Atmirkymas yra pirmasis odos gamybos procesas. Kailiai ir odos, gautos iš odų gamyklos, yra užkonservuotos dehidratuojant (dažniausiai dideliu kiekiu NaCl). Todėl atmirkymo tikslas yra pašalinti konservuojančias medžiagas, rehidratuoti odą ir padaryti ją imlesnę vėlesniuose procesuose naudojamoms medžiagoms. Kita vertus, atmirkymo procese svarbu pašalinti nekolageninius komponentus iš odos. Įprastos atmirkymo medžiagos yra šarmai, natrio sulfidas, NaCl ir kai kurios aktyviosios paviršiaus medžiagos. Tačiau šios medžiagos teršia aplinką [2]. Šiuolaikinėse technologijose naudojami fermentai, palengvinantys odos mirkymo procesą. Kai kurios šarminės proteazės naudojamos siekiant užtikrinti greitesnę vandens įsisavinimą ir sutrumpinti odos atmirkymo laiką, tačiau jos sunkiai degraduoja ir gali ardyti odą [31].

Odos pramonėje daugiausiai naudojami fermentai yra hidrolazės, proteazės, lipazės, amilazės ir gliukoamilazės. Daugiafermentinė sistema dažnai naudojama odos fermentiniam apdorojimui, nes

kelių fermentų sistema būna efektyvesnė dėl skirtingų fermentų sinerginio poveikio. Tačiau fermentams atmirkymo procese įtakos turi daug veiksnių, tokių kaip fermentų rūšys, fermentų santykis, aktyviosios paviršiaus medžiagos ir kai kurie kiti priedai. Apskritai fermentinis aktyvumas vandeninėje fazėje labai priklauso nuo pH verčių ir druskos kiekio, koncentracijos ir rūšies [26].

Komerciniai fermentai naudojami atmirkymui, kad būtų lengviau pašalinti nešvarumus, mėšlą ir kraują, taip pat pagerinti rehidracijos procesą. Fermentai naudojami kaip pagalbinė medžiaga, siekiant pagreitinti ir sutrumpinti apdoravimo procesus [32]. Beje, papildomi priedai taip pat atlieka svarbų vaidmenį naudojant fermentus odos atmirkymo procese. Pavyzdžiui, paviršinio aktyvumo medžiaga turi įtakos fermento aktyvumui ir pritaikymui. Paviršinio aktyvumo medžiagos vaidmuo yra palengvinti drėkimą ir skatinti fermentų įsiskverbimą į odos matricą [33].

Atmirkymo būdas paprastai nustatomas atsižvelgiant į žaliavinių odų konservavimo būdą. Rehidracijos pagalbinės priemonės, kurios dedamos kartu į atmirkymo tirpalą, yra labai skirtingos: nuo nejoninių aktyviųjų paviršiaus medžiagų, veikiančių kaip drėkikliai, iki fermentų, kurie užtikrina greitesnį vandens įsisavinimą odos matricoje [34].

Plaukų šalinimas nuo odos yra vienas iš odos gamybos procesų, kurių metu naudojamos kalkės (kalcio hidroksidas) ir natrio sulfidas. Kalkinimo nuotekose lieka daug kalkių ir natrio sulfido, kartu baltymų ir riebalinių medžiagų, atsiskyrusių iš odos. Natrio sulfidas yra pavojinga ir dusinanti cheminė medžiaga [25, 35]. Didelis darbas buvo atliktas kuriant fermentų pagrindu veikiančias plaukų šalinimo sistemas. Tačiau dažniausiai rašoma apie plaukų šalinimą naudojant fermentą ir minimalų natrio sulfido kiekį [36]. Pastaruoju metu daugelis mokslininkų tyrinėjo fermentų pritaikymą odoms apdoroti ir atliko tyrimus, kurių tikslas buvo visiškai pakeisti kitas chemines medžiagas plaukų šalinimui. Nustatyta, kad šarminė proteazė yra efektyvus plaukus šalinantis fermentas, kurį naudojant, mažėja tarša ir pagerėja odos stiprumo savybės. Buvo padaryta išvada, kad dedamų kalkių ir sulfidų kiekį galima sumažinti naudojant tokį fermentą [37]. Kadangi naudojamas fermentas paprastai nepasižymi keratinolitiniu aktyvumu, plaukai pašalinami nepažeisti, o ne apardyti, kaip būna taikant chemines plaukų šalinimo sistemas. Yra du pagrindiniai trūkumai, susiję su plikiniu be sulfidų. Pirma, fermentų kaina yra daug didesnė nei kalkių ir natrio sulfido. Antra, fermentinė plikimo sistema reikalauja labai tikslios proceso kontrolės [25].

1.2.1.2 Fermentinis minkštinimas

Minkštinimas yra fermentinis procesas, atliekamas siekiant pašalinti su kolagenu susijusias nekolagenines medžiagas, tokias kaip tarpfibrilinės glikoproteininės medžiagos, angliavandeniai, riebalai ir pigmentas, esantis nukalkintoje odoje, naudojant proteolitinio veikimo fermentus, o pats procesas laikomas ekologišku [30, 34]. Pašalinus šias medžiagas, pluoštas pasidaro pralaidesnis, todėl kiti chemikalai geriau prasiskverbia ir oda tampa vientisesnė. Tradiciškai minkštinimui naudojami kasos fermentai. Nukalkintos gyvūnų mėsos atliekos buvo naudojamos kaip substratas *Pseudomonas aeruginosa* padermės, išskirtos iš tanidinimo nuotekų, stipriai šarminei proteazei gaminti [34].

Antra vertus, šarminė proteazė gali pažeisti odos kolageną, ypač kolageną, esančiam plaušeliuose, ir taip nulemti odos kokybę. Taip gali atsitikti todėl, kad dauguma proteazių turi reakcijos santykinį specifiškumą, o ne struktūrinį (absoliutų) specifiškumą [35].

Tarp įvairių fermentų proteazės jau seniai buvo naudojamos odos minkštinimo stadijoje [24]. Tačiau ekologiškos ir efektyvios rūgštinės proteazės sulaukia vis didesnio dėmesio dėl galimybės minkštinti

chromintą pusgaminių. Deja, rūgštinės proteazės lėtai skverbiasi į tokią odą, o tai sumažina odos kolageno pluošto purenimo efektyvumą ir veikimo tolygumą [37]. Rūgštinės proteazės gali hidrolizuoti baltymus per vidinį arba išorinį skilimą esant mažam pH 2–4, iki mažos molekulinės masės peptidų ir aminorūgščių. Chrominto pusgaminių pH būna apie 3,5 pH. Taigi rūgštinės proteazės yra fermentinis preparatas, tinkančios kontroliuojamai ir nestipriai odos baltymų hidrolizei ir kokybiškam odos kolageno pluošto purenimui. Chrominto odos pusgaminių minkštinimas rūgštine proteaze užtrunka ilgai (daugiau nei 2 val.), todėl minkštinimo efektyvumo padidinimas tampa labai aktualus. Viena iš priežasčių yra ta, kad chromo junginiais tanidintos odos baltymus sunku hidrolizuoti proteazei [38]. Lėtą rūgštinės proteazės prasiskverbimą į chromintą pusgaminių iš dalies lemia didelis dalelių dydis ir, deja, rūgštinės proteazės didelės molekulinės masės (30–45 kDa) neįmanoma sumažinti modifikuojant [37]. Antra vertus, pavyzdžiui, *Aspergillus usami* išskiriama rūgštinė proteazė yra ideali priemonė avių kailiams. Avių kailių minkštinimo eksperimentiniai rezultatai parodė, kad optimalios sąlygos buvo, kai rūgštinės proteazės koncentracija siekė apie 45 µg/ml, temperatūra apie 38 °C, trukmė apie 8 valandas ir pH 2,5–3,0. Tyrimas taip pat parodė, kad rūgštinė proteazė buvo veiksmingesnė už neutralią proteazę kaip avių kailių minkštinimo priemonė. Taip pat yra atlikta tyrimų su proteaze, aktyvia 4M NaCl tirpale, ir nustatyta, kad ją apdorojant gaunama patenkinamų fizinių savybių oda. Didelė druskos koncentracija buvo naudojama norint atlaisvinti dekorino ryšį su kolagenu, todėl proteoglikanas tapo jautresnis proteolizei ir buvo lengviau pašalinamas iš odos [1]. Kitame tyrime buvo tiriama odų minkštinimas po kalkių pašalinimo panaudojus peracto rūgštį. Pastebėta, kad fermentiniai preparatai aktyvūs šarminėse terpėse tokias odas veikė silpnai ir patenkinamai nepašalina gneisto ir plaukų likučių, todėl buvo pasiūlyta naudoti fermentinius preparatus, veikiančius rūgštinėje terpėje [40]. Pikeliuotos odos ir chrominti odos pusgaminiai „wet-blue“ yra svarbios prekės, nes dėl nehomogeniškumo būtinas antrinis minkštinimas. Odai, kuri nebuvo kalkinta ir drėkinta, rūgštinės proteazės ir lipazės derinys užtikrina didesnę tolygumą, minkštumą ir vienodumą dažymo procese [41].

Tradiciskai naudojamos odų ir kailių minkštinimo technologijos remiasi tripsino, neutralių ir mikrobinių šarminių proteazių panaudojimu, tačiau dėl sudėtingo veikimo, riboto minkštinimo efektyvumo ir nepatenkinamų odos savybių ieškoma alternatyvų. Siekdami šio tikslo, mokslininkai sukūrė naują metodą kailių minkštinimui naudojant rūgštines proteazes pikeliavimo procese.

Buvo ištirtos kai kurių tipinių rūgščių proteazių pagrindinės fermentinės charakteristikos ir minkštinimo efektyvumas odų pikeliavimo procese; minkštinimo efektyvumas buvo kiekybiškai charakterizuojamas rūgštinės proteazės aktyvumu ir buvo lyginamas su įprasto minkštinimo fermento efektyvumu. Rezultatai parodė, kad visos tirtos rūgštinės proteazės gerai toleravo druskas ir optimaliai veikė esant 3,0–4,0 pH [42].

1.2.1.3 Pikeliavimas dedant fermentų

Pikeliavimas paprastai atliekamas siekiant palengvinti tam tikroms tanidinimo priemonėms, pvz., chromo junginiams (taip pat ir kitų metalų tanidintiems junginiams, aldehydams ir kai kurioms polimerinėms tanidinimo medžiagoms), prasiskverbti ir tolygiai pasiskirstyti odos dermoje [1]. Įprastiniame odos gamybos procese tanidinant chromo junginiais, pradžioje atliekamas pirminis

minkštintos odos apdorojimas sieros ir skruzdžių rūgštimi, kad būtų pasiektas odos pH 2,8–3,0. Šis procesas vadinamas pikeliavimu. Pikeliuojant odas be rūgščių dedama ir neutralių druskų (įprastai NaCl) 6–8 % (odos masės), kad būtų išvengta odos kolageno išbrinkimo. Tada į tą patį tirpalą pridama 6–8 % bazinio chromo sulfato, kuris suteikia odai aukštą hidroterminį stabilumą, geresnes mechanines savybes, atsparumą bakterijoms ir geras organoleptines savybes [40, 41]. Deja, tanidavimo atliekose yra daug Cr^{3+} ir neutralių druskų, todėl nuotėkose gali padidėti bendras ištirpusių kietųjų medžiagų kiekis, o tai yra žalinga aplinkai [43]. Geriausiai pikeliuojant ištirtas fermentas, kuris taikomas įvairiose odos gamybos etapuose yra lipazės. Kai fermentas naudojamas vandeninėje terpėje (pikeliavimo etape) pastebėtas kompleksinis poveikis apimantis riebalų ląsteles supančių membranų plyšimą ir trigliceridų suskaidymą, o tai padeda pagerinti riebalų šalinimo procesą. Taip pat yra atlikta tyrimų, kuriuose pepsinas, buvo naudojamas pikeliavimo metu chromo junginiais tanidintoms odoms ir kailiams. Šis fermentas plačiai naudojamas kiaulių ir avių odoms, kurios iš prigimties yra labai riebios. Šis rūgštinis proteolitinis fermentas hidrolizuoja ląstelių membranas ir pašalina nemažą dalį riebalų. Taigi šis fermentas taip pat veikia kaip riebalus šalinantis agentas [2]. Komercinių proteazių, kurios yra aktyvios rūgštinėje terpėje, atsiradimas leido jas naudoti tiesiogiai odos / kailio pikeliavimo procese. Toks fermentų naudojimas gali turėti papildomą poveikį kolagenui, o tai savo ruožtu paveiktų kolageną tolesnių procesų metu [45]. Tiriamuosiuose darbuose teigiama, kad mikrobines neutralios ir šarminės proteazės turi didesnę poveikį kolageno pluoštui nei rūgštinės proteazės; šarminės proteazės turi didesnę poveikį elastino pluoštui nei neutralios, o rūgštinės proteazės neturi jokios įtakos elastino pluoštui [46, 47]. Optimalus rūgštinių proteazių veikimo pH yra 3,0–4,0, o tai yra artima pikeliavimo proceso sąlygoms [47]. Tyrimais taip pat nustatyta, kad rūgštinės proteazės gali giliai ir tolygiai prasiskverbti į pikeliuotas odas / kailius ir saikingai pureniti kolageno pluoštus, toks procesas ypač tinka išdirbant aukščiausios kokybės odas avalynės viršui [42]. Nors rūgštinių proteazių pridėjimas į pikeliavimo tirpalą gali padėti gauti aukščiausios kokybės batų viršutinę odą ir pašalinti įprastos tripsino pagrindu pagamintos avalyninių odų išdirbimo technologijos trūkumus, tačiau įprastoje pikeliavimo technologijoje yra naudojama didelė druskos koncentracija, kuri gali slopinti fermentų proteolitinį veikimą. Dėl to padidėja fermentų poreikis ir nepasiekiamas pakankamas minkštinimo efektyvumas. Todėl toks pikeliavimas-minkštinimas paprastai būna naudojamas kaip papildomas minkštinimui tripsinu, siekiant pilniau pašalinti tarpfibrilines medžiagas ir atverti kolageno pluoštus, kad būtų pagaminta aukščiausios kokybės oda [47].

1.2.1.4 Fermentų įtaka šlapios apdailos procesams

Įvairūs ir svarbūs odos gamyboje taikomi apdorojimo būdai yra konservavimas, atmirkymas, kalkinimas, plaukų šalinimas, minkštinimas, pikeliavimas, riebalų šalinimas ir tanidavimas. Visi šie vienas po kito einantys odos gamybos etapai tiesiogiai arba netiesiogiai siejasi su fermentų naudojimu ir jų poveikiu, nes jie palengvina procesus ir padidina norimos gauti kokybės odos išeigą [2].

Tyrimuose mokslininkai taikę proteolitinius fermentus atliekant šlapią odos apdailą ir pirminį dažymą, pateikė išvadas, kad pagerėjo tokios savybės kaip dažų afinitetas, spalvos vienodumas, dažų įsiskverbimas į odą, pluošto drėkinamumas, dažų absorbcija, sumažėjo susitraukimas ir pagerėjo tempimo parametrai [48].

1.3 Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Apibendrinant literatūros duomenis galima teigti, kad gausūs fermentų odų išdirbimo technologijose panaudojimo tyrimų aprašymai ir pateikiamos tyrėjų išvados rodo, kad fermentų taikymas šioje pramonėje tik plėsis. Fermentų taikymas sudaro sąlygas keisti išdirbamos odos savybes norima kryptimi, o tokie procesai leidžia mažinti taršą, kuria odos pramonė ypatingai pasižymi.

Fermentų panaudojimas chromintam pusgaminiu apdoroti palyginti su kitai technologiniais procesais yra mažai ištirtas. Atitinkamai, tokio apdorojimo tyrimai leistų gauti ne tik praktinę naudą, jei pasireikštų savybių pokyčiai naudinga linkme, bet ir suteiktų papildomų, visiškai naujų žinių apie tokio pusgaminių kolageno ir naudotų fermentų sąveiką.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1 Tyrimo objektas

Tyrimo objektas buvo galvijų oda (karvės oda) po tanidinimo chromo junginiais – chromintas odos pusgaminiu „wet-blue“. Jo pagrindinės charakteristikos suvirimo temperatūra – 123°C; drėgnis 40-42 %, storis – 1,8-2,2 mm.

2.2 Naudotos medžiagos ir technologijos

2.1 lentelė. Cheminiai reagentai

Medžiagos pavadinimas	Cheminė formulė	Medžiagos grynumas
Acto rūgštis	CH ₃ COOH	p.a./G.R. 99 %
Aktyvuota anglis	C	-
Amonio sulfatas	(NH ₄) ₂ SO ₄	Chemiškai grynas, 99,9 %
Azoto rūgštis	HNO ₃	Analitiškai švari, 70 %
Boro rūštis	H ₃ BO ₃	p.a./G.R. 99,9 %
Druskos rūgštis	HCl	p.a./G.R. 36,5 %
Dichlormetanas	CH ₂ Cl ₂	ACS reagentas, 99,5 %
Izopropanolio alkoholis	C ₃ H ₇ OH	p.a./G.R. 99,7 %
Karbamidas	CH ₄ N ₂ O	p.a./G.R. 99,5 %
Kazeinatas	-	Chemiškai švarus
Kalio jodidas	KJ	p.a./G.R. 99,5 %
Natrio šarmas	NaOH	Chemiškai švarus, 99,0 %

2.1 lentelės tęsinys

Natrio hidrokarbonatas	NHCO_3	p.a./G.R. 99 %
Natrio formiatas	HCOONa	p.a./G.R. 99 %
Natrio Tiosulfatas	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	p.a./G.R. 99,0 %
Orto fosforo rūgštis	H_3PO_4	p.a./G.R. 85,0 %
p-dimetilaminobenzaldehydas	$(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CHO}$	p.a./G.R. 99,0 %
Sieros rūgštis	H_2SO_4	p.a./G.R. 85,0 %
Trichloracto rūgštis	$\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$	ACS reagentas, 99,0 %
Tirozinas	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Chemiškai švarus
Vario sulfatas	CuSO_4	p.a./G.R. 99,0 %
Vandenilio peroksidas	H_2O_2	p.a./G.R. 30,0 %

2.2 lentelė. Techniniai produktai

Medžiagos pavadinimas	Gamintojas
Vilzim PRO N	Baltijos enzimai, Lietuva
Mystozyme ABL new	Catomance technologies, Didžioji Britanija
Mystozyme 2000 LC	Catomance technologies, Didžioji Britanija
Zime SB conc. 9000 U.E	River Chimica, Italija
Zime SB Extra Conc. 120000 U.E.	River Chimica, Italija
Chromo sulfatas (bazinis)	Boruta, Lenkija
Neutragene Mg-120	Codeyco, Italija
Sellaset rot H (dažas)	TFL Ledertechnik GmbH, Vokietija
Oleal 146	Codeyco, Italija
Oleal 1946	Codeyco, Italija
Fospholiker 661	Codeyco, Italija
Fospholiker 6146	Codeyco, Italija
Skruzdžių rūgštis	Eurochemicals, Lietuva
Mimozos tanidai	Tanac S.A., Brazilija
Kvebracho tanidai	Tanac S.A., Brazilija

2.3 lentelė. Pusgaminio išdirbimo metodika

Procesas	Medžiaga, kiekis % nuo chrominto pusgaminio masės	Temperatūra, °C	Trukmė, min	Papildoma informacija
Plovimas	H ₂ O – 300	40 ±2	15	Po proceso išpilamas vanduo
Chrominimas	1. H ₂ O – 150 2. Chromo sulfatas - 4		30	
	3. Neutragene Mg-120 – 0,15		10	
	4. Neutragene Mg-120 – 0,15		50	Nupilama
Plovimas	H ₂ O – 150		30	Nupilama
Neutralizacija	1. H ₂ O – 150 2. NaHCO ₃ – 1,5		30	
A variantas (kontrolinis)	3. HCOONa – 2		90	
B variantas FP neutralizacijos metu	3. HCOONa – 2 4. FP 1 – 5		90	
C variantas:	3. HCOONa – 2		90	
Plovimas	H ₂ O – 200		30	
Fermentinis apdorojimas	H ₂ O – 200 FP 1 – 5		60 / 180	
Plovimas	H ₂ O – 200	60±5	30	Nupilama
Po neutralizavimo ir papildomo fermentinio apdorojimo dalis bandinių paaimami atlikti kitiems tyrimams, kaip suvirimo temperatūros nustatymui, mechaninių savybių analizei ir kt.				
Dažymas	H ₂ O – 200 Sellaset rot H (dažas) – 4,5	60	60	Nupilama
Riebinimas	1. H ₂ O – 100 2. Oleal 146 – 2 3. Oleal 1946 – 4 4. Fosholicker 661 – 3 5. Fosholicker 6146 – 4		90	
	6. HCOOH – 1		20	
Plovimas	H ₂ O – 200	30	15	
Pripildymas	1. Mimoza – 2 2. Kvebrachas – 2		60	
Plovimas	H ₂ O – 200		15	
Atlikus visus procesus odos bandiniai paliekami išdžiūti ore padėjus ant lygaus paviršiaus.				

2.3 Analizių metodai

2.3.1 Fermentų aktyvumo nustatymas

Fermentinių preparatų aktyvumas nustatytas remiantis Ansono metodu [49]

Proteazėms, pH 2,5±0,2; 5,5±0,2; 6,5 ±0,2; 7,5 ±0,2; 8,5±0,2; 10,0±0,2; 11,5±0,2; 12,5±0,2; 13,5±0,2

Fermentinio preparato tirpalo paruošimas. 0,01–1,0 g fermento (0,001 g tikslumu) ištirpinti stiklinėje, maišant stikline lazdele, įpylus nedidelį kiekį universalus buferio 0,1 mol/l koncentracijos, kurio pH 2,5 / 5,5 / 6,5/7,5 / 8,5 / 10/ 11,5 / 12,5 / 13,5 Gautą tirpalą kokybiškai perkelti į matavimo kolbą (100 ml) ir praskiesti universaliu buferiu iki žymos. Tolimesniems skiedimams naudojamas universalus atitinkamo pH (koncentracija 0,1 mol/l) buferis.

2,5 ir mažesnio pH kazeinato tirpalo (2%) paruošimas. 2 g orausio natrio kazeinato (0,01g tikslumu) ištirpinti maišant ir šildant (< 70 °C) 90 ml universalus buferio (koncentracija 0,1 mol/l, pH 5,5) ir privesti NaOH (1mol/l) tirpalu iki pH 5,5. Po to, naudojant HCl 1 mol/l, pH sumažinti iki 2,5. Tirpalą pernešti į matavimo kolbą (100 ml) ir praskiesti iki žymos universaliu buferiniu tirpalu (0,1 mol/l, pH 2,5).

Rūgščioje terpėje, esant mažiau nei 5,1 pH stebimas tirpalo susidrumstimas, pasiekus 4,5 pH iškrenta stambūs dribsniai. Žemėjant pH 3,1–3,2 dribsniai pradeda tirpti, prie 3,0–3,05 pH susidarę dribsniai ištirpsta.

pH 5,5 / 6,5/7,5 / 8,5 / 10/ 11,5 natrio kazeinato tirpalo (2 %) paruošimas. 2 g orausio natrio kazeinato (0,01g tikslumu) ištirpinti 90 ml universalus buferio (koncentracija 0,1 mol/l, pH 5,5 / 6,5/7,5 / 8,5 / 10/ 11,5/ 12,5/ 13,5) ir privesti NaOH (1 mol/l) tirpalu iki atitinkamo pH. Po to, tirpalą pernešti į matavimo kolbą (100 ml) ir praskiesti iki žymos universaliu buferiniu tirpalu (0,1 mol/l, pH 5,5 / 6,5/7,5 / 8,5 / 10/ 11,5). Pagreitinti natrio kazeinato tirpumui tirpalą galima maišyti magnetine maišykle ir pašildyti iki 70±1°C. Tirpalas laikomas šaldytuve iki 2 dienų.

Tyrimo sąlygos. Fermentinė hidrolizė vykdoma 30,0±0,2°C/ 40,0±0,2°C/ 50±0,2°C.

Paimto fermento kiekis turi būti paskaičiuotas taip, kad būtų substrato perteklius ir kad optinis tankis pamatavus būtų 0,1 – 0,7.

Tyrimo eiga. Į 2 kolbas įpilama po 2 ml substrato ir patalpinama į termostatą (30,0±0,2°C/ 40,0±0,2°C/ 50,0±0,2°C). Po 10 min į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 2 ml fermento tirpalo, mėgintuvėliai papurtomi ir paliekami hidrolizei 10 min, 30,0±0,2°C/ 40,0±0,2°C/ 50,0±0,2°C.

Po 10 min stabdoma fermentinė reakcija į abu mėgintuvėlius pridedant po 4 ml trichloracto rūgšties 0,3 mol/l, tai nusodina baltymą bei hidrolizės reakcijos produktus.

Mišinys greit sumaišomas ir mėgintuvėliai su mišiniu palaikomi 30,0±0,2°C/ 40,0±0,2°C/ 50,0±0,2°C temperatūroje dar 20 min. Tada mišinį nufiltruoti į sausus mėgintuvėlius naudojant mažus piltuvėlius su popieriniu filtru. Filtratas turi būti visiškai skaidrus.

Kontrolinis bandinys: į mėgintuvėlį įpilama 2 ml fermentinio tirpalo (to paties praskiedimo) laikoma termostate, 10 min, po to pridedama 4 ml trichloracto rūgšties (0,3 mol/l), laikoma termostate 30,0±0,2°C/ 40,0±0,2°C/ 50,0±0,2°C 10 min, tada pridedama 2 ml substrato. Po 20 min termostate filtruojama.

Kolorimetrinė analizė atliekama prie bangos ilgio **280nm**, 1 cm pločio kiuvetėse.

Gradavimo grafikas sudaromas tirozino ekvivalentui (t.y. optinis tankis, kurį duotų 1 μmol tirozino 1 l standartinio tirpalo). Tirozino gradavimo grafikas pateikiamas priede.

Rezultatų apdorojimas. Proteolitinio aktyvumo (PA) vnt/g arba nt/ml apskaičiuojama pagal formulę (2.1)

$$PA = \frac{D \times 4}{TE \times 10 \times m} * 1000; \quad (2.1)$$

čia: D – optinis tankis;

4 – mišinio santykis (fermento:substrato:trichloracto r.);

TE – tirozino ekvivalentas, nustatomas pagal gradavimo grafiką (koeficientas iš lygties pateiktos priedo 1 paveiksle);

10 – hidrolizės reakcijos laikas, min;

m – fermentinio preparato kiekis, paimtas proteolizei (mg/ml fermentinio tirpalo);

1000 – pervedimo koeficientas, gautų vienetų vienam g fermentinio preparato.

Iš gautų rezultatų vedamas aritmetinis vidurkis, nes atliekami 2 paralelūs matavimai. Galima ne didesnė nei 5% paklaida tarp matavimo rezultatų.

2.3.2 Kolageninių baltymų kiekio nustatymas

Kolageninių baltymų kiekis nustatytas pagal metodiką pateiktą literatūroje [50]:

Į porcelianinę lėkštelę įpilama 10 ml tiriamojo neutralizacijos tirpalo. Tirpalas lėkštelėje yra išgarinamas virš vandens garų. Sausas likutis yra suplaunamas 10 ml 6 mol/l druskos rūgšties į sausą atsparų kaitinimui mėgintuvėlį. Mėgintuvėlis užlydomas, taip gaunama sandari ampulė ir dedama į džiovavimo spintą bandinio hidrolizei. Hidrolizė vykdoma 120 ° C temperatūroje 6–10 val. (tikslinga palikti nakčiai). Po hidrolizės ampulė atidaroma, į ją įberama aktyvuotos anglies, hidrolizatas supurtomas, palaikoma apie 15 min ramybės būsenoje ir filtruojama į porcelianinę lėkštelę (jei filtratas po filtravimo yra rusvas, procedūrą su aktyvuota anglimi reikia kartoti). Ampulė praplaunama distiliuotu vandeniu tris kartus plovimo vandenį per filtrą surenkant į tą pačią porcelianinę lėkštelę. Lėkštelės turinys išgarinamas virš vandens vonios garų. Sausas likutis suplaunamas distiliuotu vandeniu ir praskiedžiamas iki 25 ml (praskiedžiama priklausomai nuo tikėtino gauti rezultato). Gautas tirpalas filtruojamas ir naudojamas tolimesnei analizei.

Tyrimo eiga. Į du mėgintuvėlius įpilama po 1 ml tiriamo tirpalo, o į vieną (kontrolinį) - 1 ml distiliuoto vandens. Į visus mėgintuvėlius įpilama po 0,5 ml 0,05 mol/l vario sulfato, po 0,5 ml 2,5 mol/l natrio šarmo tirpalo ir po 0,2 ml 4 % vandenilio peroksido tirpalo. Mėgintuvėliai 5 min. purtomi, po to 5 min paliekami ramiai. Vėliau 10 min. laikomi 70±1 °C temperatūros vandens vonioje, retkarčiais supurtant. Išėmus iš vandens vonios mėgintuvėliai atvėsunami ir į juos įpilama po 0,5 ml 0,01 mol/l karbamido tirpalo, jie supurtomi ir paliekami 5–10 min. ramybės būsenoje. Tada įpilama po 0,8 ml 8 N (4 mol/l) sieros rūgšties tirpalo bei po 2,5 ml 5 % p-dimetilaminobenzaldehido tirpalo izopropanolio alkoholyje ir gerai supurtomi. Mėgintuvėliai 22 min laikomi 70 °C temperatūros vandens vonioje, vėliau atvėsunami iki 20 °C ir fotokolorimetruojami. Optinis tankis matuojamas

fotokolorimetru GENESYS 8 (Spectronic, JAV), esant bangos ilgiui 558 nm. Hidroksiprolino kiekis (HK) apskaičiuojamas remiantis kalibravimo kreive (priedo 2 paveikslas), pagal 2.2 formulę.

$$HP = \frac{D \times V \times N}{10 \times M \times 0.033} \times 1000; \quad (2.2)$$

čia: D – optinis tankis;

V – tirpalo tūris, gautas suplovus ir praskiedus porcelianinės lėkštelės turinį;

N – neutralizacijos tirpalo tūris;

10 – į lėkštelę įpilto tirpalo tūris;

M – odos bandinio imto analizei masė;

0.0303 – iš gradavimo kreivės rastas koeficientas optinio tankio vertei perskaičiuoti į hidroksiprolino koncentraciją, ml/g.

Iš gauto hidroksiprolino kiekio perskaičiuojamas kolageninių baltymų kiekis (2.3):

$$KB = HP \times 7.8; \quad (2.3)$$

čia: 7,8 – koeficientas hidroksiprolinui perskaičiuoti į kolageninius baltymus (pasikartojančiais tyrimais įrodyta, kad raguočių odos kolagene yra 12,8 % hidroksiprolino).

2.3.3 Kolagenolitinio fermentinių preparatų aktyvumo nustatymas

Substrato paruošimas. Sūdytu konservuota oda yra atmirkoma, plaunama, nuo jos mechaniškai pašalinama plaukų danga ir yra liofilizuojama. Liofilizuota oda yra susmulkinama iki mažų gabalėlių ir homogenizuojami iki odos plaušelių, naudojant homogenizatorių A 11 Basic (IKA, Vokietija).

Aktyvumo nustatymas. Į dvi mažas plokščiadugnes kolbas yra pasveriami po 300 ± 1 mg liofilizuotos odos pluošto ir įpilama 9 ml atitinkamo pH universalaus buferio. Kolbutės termostatuojamos $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min nepertraukiamai maišant. Tada į kolbas įpilama po 1 ml fermento tirpalo ir vykdoma hidrolizės reakcija pastoviai maišant $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min. Šios reakcijos metu fermentas hidrolizuoja kolageninius baltymus iki tirpių polipeptidų. Stabdant fermentinę reakciją įpilama 4 ml trichloracto r. 0,3 mol/l, gerai supurtoma ir į termostatuojama ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$) 10 min. Gautas tirpalas nufiltruojamas. 4 ml filtrato įpilama į karščiui atsparius mėgintuvėlius, filtrate esančių tirpių kolageno polipeptidų hidrolizės reakcijai vykdyti įpilama 8 ml 6 mol/l druskos rūgšties ir mėgintuvėliai yra užlydomi, gaunama sandari ampulė, kuri kaitinama $120 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje nuo 6-12 valandų. Įvykus hidrolizei ampulės atidaromos, jei matoma, kad gautas tirpalas yra drumstas, dedamas nedidelis kiekis aktyvuotos anglies, jei tirpalo spalva nepakitusi, jis iškart išgarinamas porcelianinėse lėkštelėse virš verdančio vandens vonios. Sausas likutis yra suplaunamas distiliuotu vandeniu į 10 ml matavimo kolbutę. Gautas tirpalas filtruojamas ir toliau naudojamas tyrimuose jame nustatant hidroksiprolino kiekį.

Hidroksiprolino kiekio nustatymas. Hidroksiprolino kiekis nustatomas pagal 2.3.2 poskyryje pateiktą metodiką. Pagal nustatytą hidroksiprolino kiekį apskaičiuojamas kolagenolitinio fermentinio preparato aktyvumas.

2.3.4 Suvirimo temperatūros nustatymas

Suvirimo temperatūros nustatymas atliekamas pagal ISO standartą [51].

Tyrimui atpjaunamos maždaug 3 mm pločio ir 5,5 cm ilgio tiriamosios odos juostelės. Juostelės pritvirtinamos specialiaame prietaise, iš abiejų galų taip, jog prietaise šviestų kontaktą indikuojanti lemputė. Pritvirtinti bandiniai yra įmerkami į indą su glicerolio ir vandens mišiniu (priklausomai nuo galimos odos suvirimo temperatūros). Indas yra kaitinamas iki tam tikros temperatūros, kurioje odos matmenys sumažėja (susitraukia), kuomet kontakto lemputė užgęsta. Fiksuojama odos suvirimo temperatūra.

2.3.5 Cr (III) oksido kiekio nustatymas

Cr₂O₃ kiekis odoje yra nustatomas remiantis standartu [52] pateiktu literatūroje.

Bandinio paruošimas. Tyrimui naudojama crominto pusgaminio oda yra susmulkinama ir analitinėmis svarstyklėmis tiksliai pasveriamas 0,3 – 0,6 g kiekis.

Tyrimo eiga. Pasverti bandiniai sudedami į kūgines kolbas, kurių talpa – 500 ml. Į jas įpilama po 10 ml koncentruotos azoto rūgšties (70 %) ir paliekama ramybės būsenoje 4 – 5 min. Tada į kolbas supilama po 15 ml koncentruotų sieros ir perchloracto rūgšties mišinio. Kolbos uždengiamos piltuvėliais ir pastatomos ant kaitinimo plytelės, kuri kaitinama vidutinišku stiprumu. Kaitinama iki kol tirpalo spalva pasikeičia iš žalsvos į oranžinę.

Kai spalva pasikeičia kaitinimas yra truputį sumažinamas ir dar pakaitinama ne mažiau nei 2 min. Po to kolbos yra nuimamos nuo plytelės ir pastatomos atvėsti oro sąlygomis apie 10 min. Atvėsinus į kolbas yra įpilama po maždaug 200 ml distiliuoto vandens ir vėl pastatomos ant kaitinimo plytelės. Kaitinama kol užverda ir švelniai virinama 10 minučių, kol pasišaliną susidaręs chloras tirpaluose.

Analizė. Kolbos atvėsinamos po šalto vandens srove ir į jas įpilama po 5 ml ortofosforo rūgšties, geležies jonams maskuoti. Analizė vykdoma jodometriškai. Į kolbas įpilama po 20 ml kalio jodido tirpalo, uždengiamos piltuvėliais ir 10 min laikomos tamsoje.

Titruojama 0,1 mol/l koncentracijos natrio tiosulfato tirpalu tol, kol kolboje esančio tirpalo spalva tampa šviesiai žalsva. Kaip indikatorius naudojamas 1 % koncentracijos krakmolo tirpalas. Užrašomas titravimui sunaudoto 0,1 mol/l koncentracijos natrio tiosulfato kiekis (ml) – V. Cr₂O₃ kiekis (%) kietose liekanose apskaičiuojamas pagal (2.4) formulę.

$$\text{Cr}_2\text{O}_3 = \frac{V \times 0.00253 \times 100}{m_0}; \quad (2.4)$$

čia: V – titravimui sunaudoto 0,1 mol/l koncentracijos natrio tiosulfato kiekis, ml;
0,00253 – Cr₂O₃ kiekis atitinkantis 1 ml 0,1 mol/l koncentracijos natrio tiosulfato tirpalo, g/ml;
m₀ – analizuoto bandinio masė, g.

2.3.6 Fizikinių ir mechaninių savybių nustatymas

Odos fizikinių ir mechaninių savybių, tokių kaip santykinis pailgėjimas, tempiamasis stipris, nustatomi pagal galiojantį standartą [53].

2.3.7 Odos ištraukos pH nustatymas

Odos ištraukos pH nustatomas pagal galiojantį standartą [54].

Tiriamosios odos $5 \pm 0,1$ g yra pasveriami ir susmulkinami. Odos gabalėliai yra sudedami į plokščiadugnę kolbą ir įpilama 100 ml vandens. Kolbą papurtoma, kad bandiniai tolygiai sudrėktų. Tada purtoma mechaniškai purtyklėje nuo 6 iki 6,5 valandų. Prieš dekantavimą paliekama nusistovėti.

2.3.8 Vandens garų sorbcijos nustatymas

Vandens garų sorbcijos nustatymas atliekamas pagal standarte [55] pateiktą metodiką,

Bandinio paruošimas. Odos bandiniai yra paruošiami pagal standarto reikalavimus. Po to, tyrimui numatyti odos bandiniai įmerkami į 4 kartus didesnę (nei bandiniai) acetono kiekį, taip, kad būtų visiškai apsemti ir laikomi 3 paras eksikatoriuje. Kas 24 valandas acetonas pakeičiamas nauju. Po 3 parų gabalėliai ištraukiami iš eksikatoriaus, ištiesiami ir acetonas yra išgarinamas esant kambario temperatūrai, traukos spintoje. Išdžiūvę bandiniai 24 val. kondicionuojami eksikatoriuje su kalio bichromato tirpalu (santykinis drėgnis 52 %).

Tyrimo eiga. Bandiniai yra tris kartus pasveriami analitinėmis svarstyklėmis ir užfiksuojamas masė. Bandiniai yra įtvirtinami į aparatą SATRA's STD 478 pripildyta 50 ml vandens. Metalinių cilindro dangteliai yra tvirtai prisukami. Bandiniai paliekami 16 valandų. Praėjus nurodytai trukmei bandiniai yra išimami iš aparato ir vėl pasveriami analitinėmis svarstyklėmis ir masė yra užfiksuojama.

Vandens garų sorbcija yra apskaičiuojama pagal (2.5) formulę:

$$Awv = \frac{4(m_2 - m_1) \times 10^5}{\pi \times d^2}; \quad (2.5)$$

Čia: m₂ – bandinio masė po eksperimento;
m₁ – bandinio masė prieš eksperimentą;
d – vidinis metalinio cilindro diametras.

2.3.9 Drėgnio nustatymas

Nustatyti drėgnį tiriamieji bandiniai džiovinami spintoje, palaikant 105 ± 2 °C temperatūrą. Džiovinimas atliekamas iki pastovios masės. Tyrimas atliekamas laikantis ISO standartų [56]. Drėgnis % apskaičiuojamas pagal formulę (2.6):

$$W = \frac{100(m_1 - m_2)}{m_1}; \quad (2.6)$$

čia: m_1 – bandinio masė prieš džiovinimą;
 m_2 – bandinio masė po džiovinimo.

2.3.10 Dichlormetane tirpių medžiagų kiekio nustatymas

Riebinimo metu į odą įsiskverbusių medžiagų kiekis nustatomas remiantis galiojančiu standartu [57]. Metodo esmė – paruošta oda yra ekstrahuojama dichlormetanu, kurio likutis vėliau yra išgarinamas iš ekstrakto.

Odos bandiniai yra susmulkinami, tiksliai pasveriami analitinėmis svarstyklėmis ir susukami į filtravimo popieriaus tūtą taip, jog neiškristų. Ekstrakcija vykdoma Soksleto ekstraktoriumi. Paruošta tūta įdedama į ekstraktorių ir pradedama nepertraukiama ekstrakcija dichlormetanu. Ekstrahavimas vykdomas apie 8 valandas. Baigus ekstrakciją ekstraktas džiovinamas džiovinimo spintoje 105 ± 2 °C parą laiko. Po paros 30 minučių ekstraktas laikomas eksikatoriuje ir pasveriamas analitinėmis svarstyklėmis. Džiovinimas spintoje (1 val) ir laikymas eksikatoriuje (30 min) kartojamas, kol pasiekama pastovi masė.

Išekstrahuotos dichlormetanu medžiagos kiekis išreiškiamas procentais nuo absoliučiai sausos odos masės pagal formulę (2.7)

$$\frac{m_1}{m_2} \times F \times 100; \quad (2.7)$$

čia: m_1 – ekstrakto masė gramais;
 m_2 – bandinio masė gramais.

F reikšmė apskaičiuojama pagal formulę (2.8):

$$F = \frac{100}{100 - w}; \quad (2.8)$$

Čia: w – lakiosios medžiagos pagalmasės dalį procentais (ISO 4684).

2.3.11 Infraraudonoji spektroskopija

Bandinio paruošimas. Odos bandiniai IR analizei paruošiami, jų struktūra fiksuojant acetonu, kaip aprašyta 2.3.8 poskyryje. Po to bandiniai 24 val. kondicionuojami eksikatoriuje virš kalio bichromato tirpalo (santykinis drėgnis 52%).

Po kondicionavimo IR atspindžio spektrai užrašomi naudojant Perkin-Elmer FTIR Spectrum GX (JAV) spektrofotometrą.

Skiriamoji geba atliekant analizę parinkta 1 cm^{-1} , skanavimo greitis $0,2 \text{ cm/s}$, skanuojama 16 kartų.

2.3.12 Termogravimetrinė analizė

Termogravimetrinės analizė (TGA) remiasi labai tiksliai temperatūros kėlimu, tuo pačiu metu fiksuojant masės pokyčius. Kaitinamo mėginio masės kinta priklausomai atitinkamai nuo jo savybių, ji mažėja arba didėja, o papildomas oro maišymas leidžia sutrumpinti tyrimo laiką [58]. Kaitinimo krosnies temperatūra yra kontroliuojama pagal nustatomus parametrus. Temperatūros kėlimo greitis – $1 \text{ }^\circ\text{C/min}$.

Etalono ir tiriamos medžiagos bandiniai sudedami į tiglius, kurie įdedami į kaitinimo krosnį. Joje yra termoporos, fiksuojančios bandinių temperatūrą. Vienos pagrindinių TGA sudedamųjų dalių yra jautrios svarstyklės su padėklu, jos visos analizės metu fiksuoja mėginio masės pokyčius. Eksperimento metu temperatūra keliama nuo $33 - 35 \text{ }^\circ\text{C}$ iki $450 \text{ }^\circ\text{C}$

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1 Fermentinių preparatų proteolitinio aktyvumo tyrimas

3.1.1 Kazeinolitinis fermentų aktyvumas

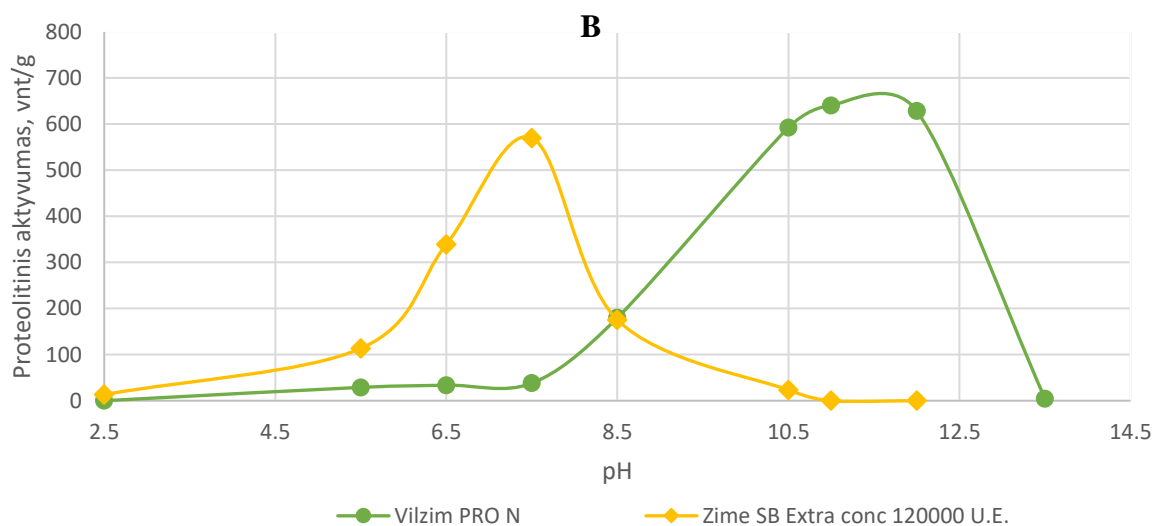
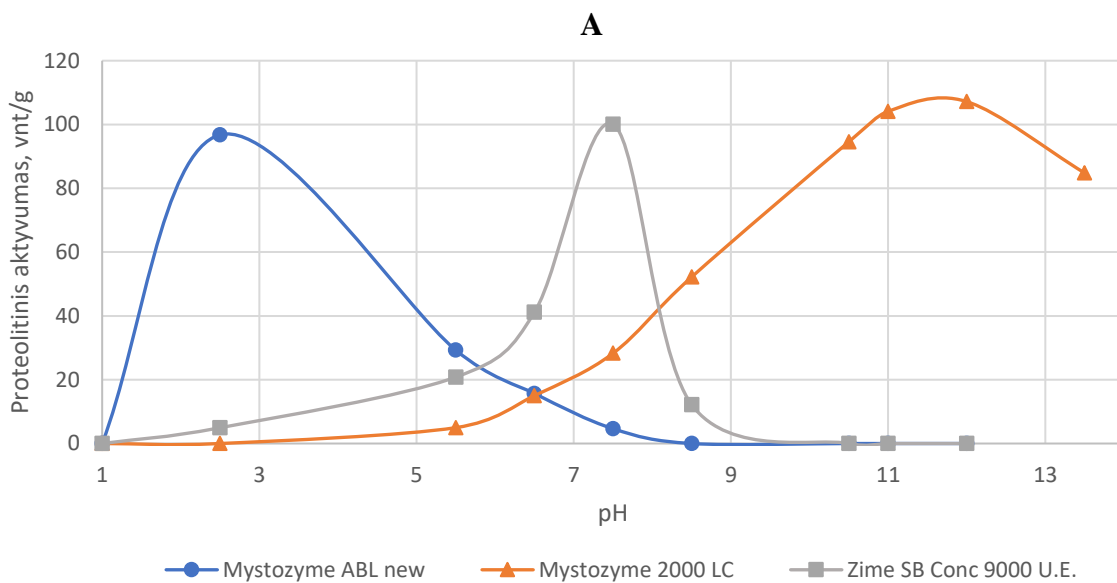
Apžvelgiant literatūrą apie fermentų naudojimą odos išdirbimo procesuose galima pastebėti tendenciją, kad dauguma autorių pateikdami fermentų/fermentinių preparatų proteolitinio aktyvumo duomenis, dažniausiai pateikia jų kazeinolitinio aktyvumo vertes. Matyt, taip susiklostė istoriškai, kad kazeinolitinio aktyvumas dažniausiai atitinka poveikio nekolageniniams, o iš dalies ir kolagenui, efektyvumą. Taigi, žinant kazeinolitinį aktyvumą galima spręsti apie fermentinio preparato tinkamumą vienam ar kitam procesui. Antra vertus, matyt, nulėmė ir tai, kad kazeinolitinio aktyvumo nustatymas yra įprastas ir pakankamai gerai visiems tyrėjams žinomas analizės metodas.

Taigi tyrimų pradžioje buvo nustatytas kazeinolitinio aktyvumas pasirinktiems darbo tikslui pasiekti fermentiniams preparatams.

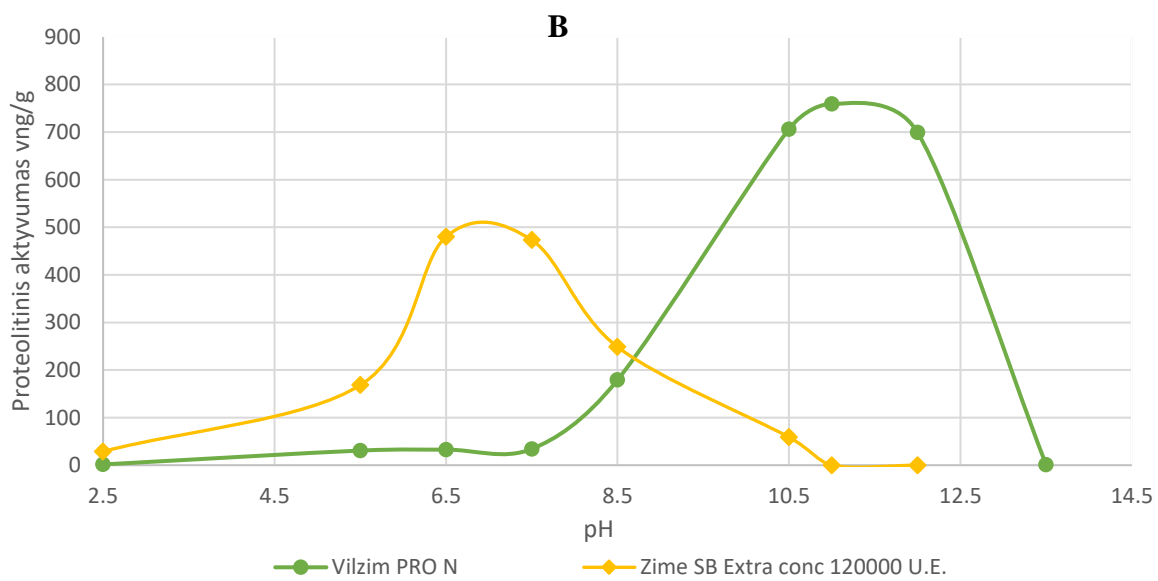
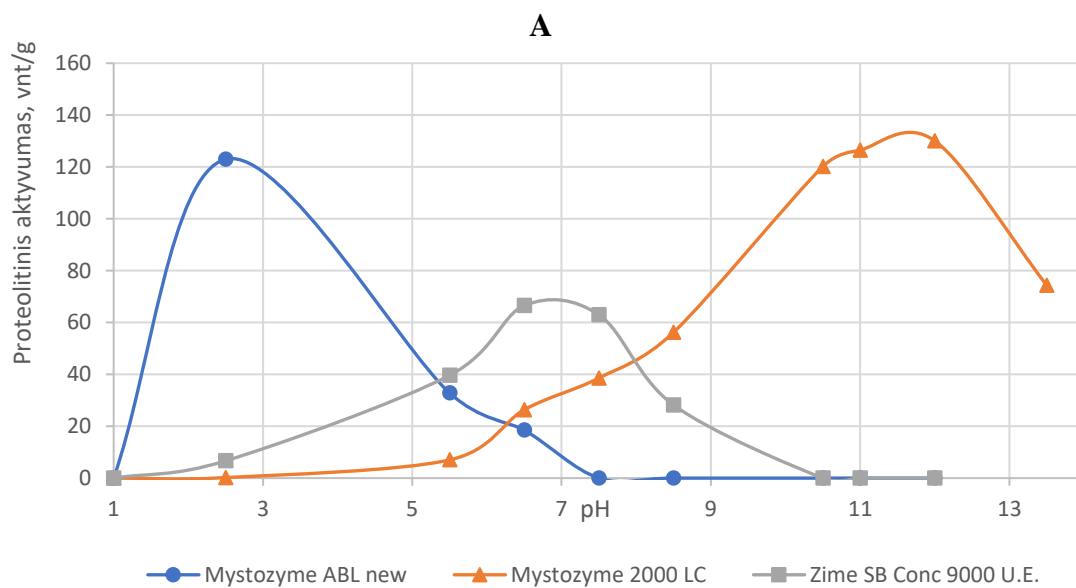
Fermentinio aktyvumo tyrimams buvo pasirinkti penki fermentiniai preparatai (FP) – Mystozyme ABL new, Mystozyme 2000 LC, Zime SB Conc. 9000 U.E., Vilzim PRO N, Zime SB EXTRA Conc. 12000 U.E. Kiekvienas fermentas turi optimalias sąlygas, kuriose geriausiai veikia, todėl svarbu įvertinti fermentų aktyvumo pokytį keičiantis sąlygoms. Vienas iš labai svarbių parametru fermentinių preparatų veikimui yra terpės pH.

Kita labai svarbi sąlyga yra temperatūra. Įvairūs odos apdorojimo procesai yra atliekami skirtingose temperatūrose, o norint pritaikyti fermentus tuose procesuose reikia žinoti optimaliausią fermentinio preparato veikimo temperatūrą, todėl atliekant tyrimus su fermentais labai svarbu yra pirmiausia nustatyti jų aktyvumą įvairiose aplinkos sąlygose.

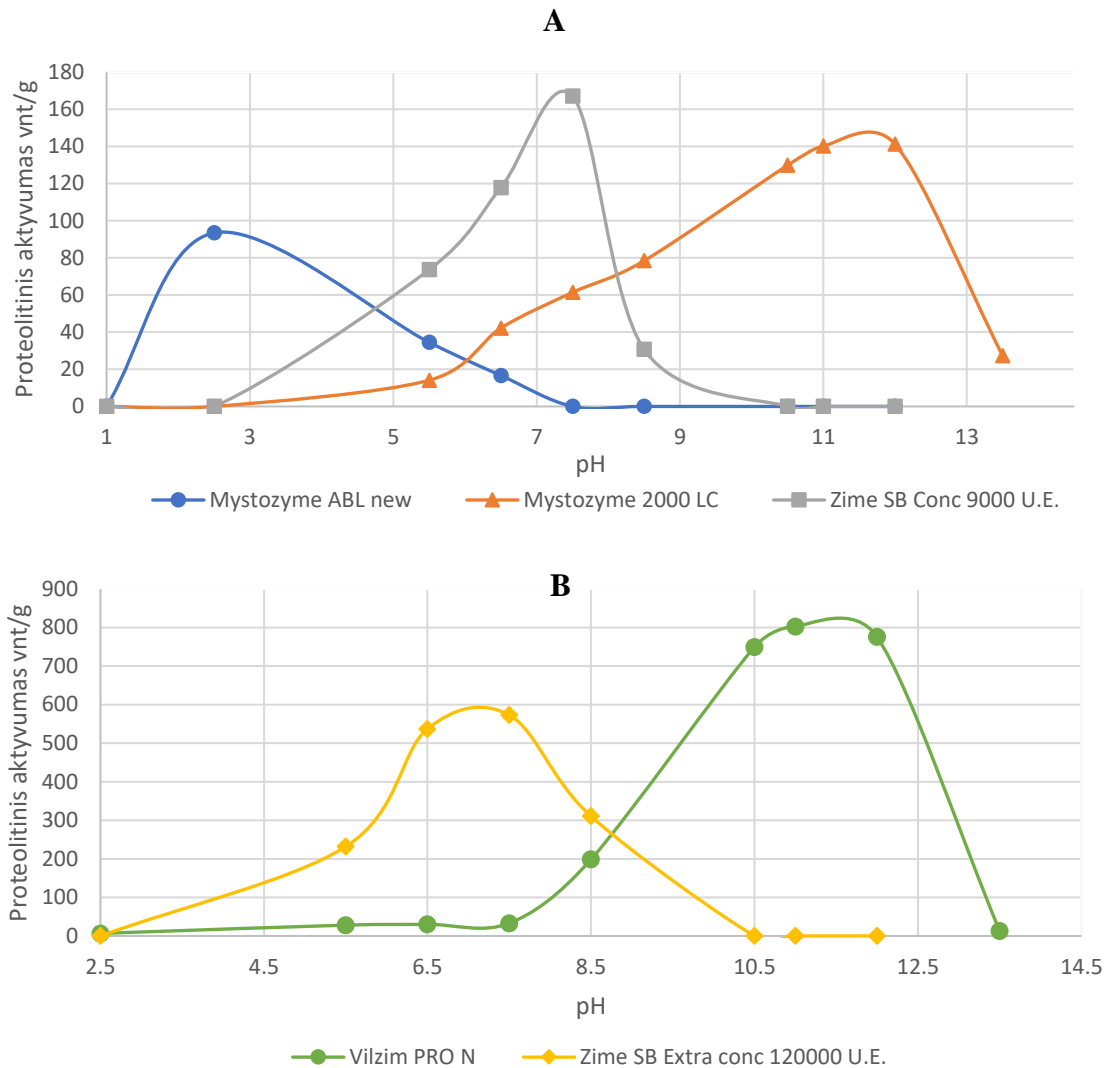
Taikant Ansono metodą buvo nustatytas fermentinių preparatų kazeinolitinio aktyvumas esant skirtingoms temperatūroms (nuo 30 iki 50 °C) ir pH (nuo 1 iki 13,5). 3.1 paveiksle pateikta fermentinių preparatų proteolitinio (kazeinolitinio) aktyvumo priklausomybė nuo terpės pH kai temperatūra 30 °C, atitinkamai, 3.2 paveiksle – kai temperatūra 40 °C ir 3.3 paveiksle – kai 50 °C.



3.1 pav. Fermentinių preparatų kazeinolitinio aktyvumo priklausomybė nuo pH kai temperatūra 30 °C



3.2 pav. Fermentinių preparatų kazeinolitinio aktyvumo priklausomybė nuo pH kai temperatūra 40 °C



3.3 pav. Fermentinių preparatų kazeinolitinio aktyvumo priklausomybė nuo pH kai temperatūra 50 °C

Nustačius fermentinių preparatų proteolitinį (kazeinolitinį) aktyvumą, iš gautų rezultatų matoma, kad fermentinių preparatų aktyvumas labai priklauso nuo terpės pH, taip pat aktyvumą ir temperatūra įtaka aktyvumui. Vertinant pH įtaką FP Mystozyme ABL new aktyvumui, matyti, kad jis yra aktyviausias kai pH 2,5, o temperatūra – 40 °C. Šiose sąlygose fermentinio preparato aktyvumas siekė 123 vng/g, tai indikuoja, kad fermentinis preparatas yra aktyviausias kai aplinka gan stipriai rūgštinė. FP Mystozyme 2000 LC didžiausias aktyvumas nustatytas kai pH buvo 12, toliau didinant pH – aktyvumas staigiai mažėjo. Temperatūra, kurioje buvo stebimas didžiausias šio FP aktyvumas – 50 °C. FP Zime SB Conc. 9000 U.E. buvo aktyviausias praktiškai neutralioje terpėje – pH 7,5, šio fermentinio preparato proteolitinio aktyvumas didinant pH nuo 1 iki 7,5 tolygiai didėjo, bet toliau didinant pH, matomas staigus aktyvumo sumažėjimas, vertinant temperatūros įtaką, matomas žymus aktyvumo pokytis keliant temperatūrą nuo 30 iki 50 °C ir didžiausias aktyvumas nustatytas kai temperatūra buvo 50 °C, o pH 7,5. Vertinant tyrimo rezultatus galima daryti prielaidą, kad fermentinio preparato Vilzim PRO N optimaliausias veikimo pH yra 12, tačiau pagal tyrimo rezultatus matyti, kad temperatūra šiam fermentiniam preparatui žymios įtakos neturėjo, kai ji buvo keliamą nuo 30 iki 50 °C aktyvumas nežymiai didėjo ir pasiekė 802 vng/g. Šis fermentinis preparatas

pasivymėjo apskritai didžiausiu proteolitinu aktyvumu iš visų penkių tirtų fermentinių preparatų, pagal gautus tyrimo rezultatus akivaizdu, kad Vilzim PRO N yra aktyviausias šarminėje aplinkoje. Zime SB Extra Conc. 120000 U.E. didžiausias aktyvumas tyrimo metu stebėtas prie 7,5 pH, tai leidžia suprasti, jog šis fermentinis preparatas taip pat aktyviausias praktiškai neutralioje aplinkoje. Vertinant temperatūros įtaką fermentinio preparato aktyvumui matoma, kad ji neženkliai, bet aktyvumas didėja keliant temperatūrą ir didžiausias aktyvumas buvo esant 7,5 pH ir 50°C – 573 vnt/g.

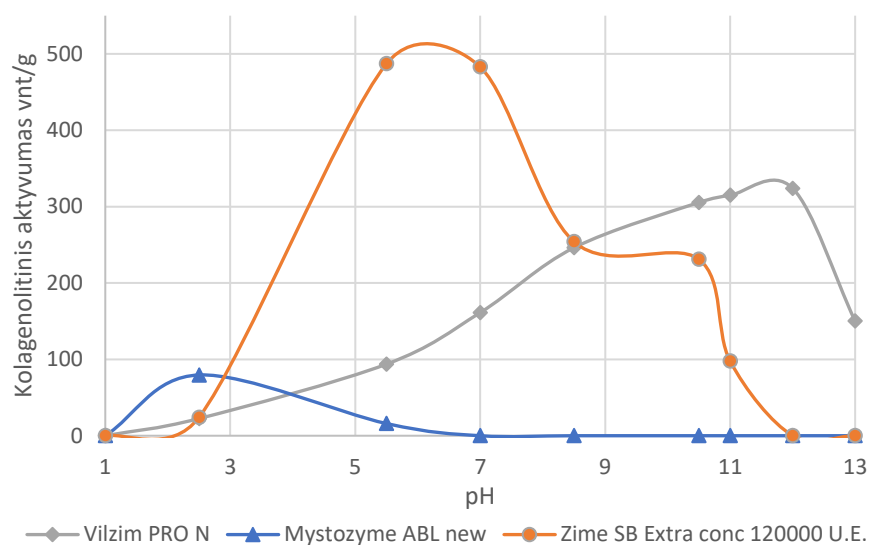
Iš tyrimo rezultatų matyti, kad visi preparatai turi skirtingas optimalias veikimo sąlygas. Mystozyme ABL new vienintelis aktyviai veikia rūgštinėje aplinkoje, o optimali temperatūra yra 40 °C. Abu Zime SB preparatai aktyviausi neutralioje pH aplinkoje esant 50 °C. Mystozyme 2000 LC ir Vilzim PRO N fermentiniai preparatai pasivymėjo didžiausiu aktyvumu šarminėje aplinkoje esant 50°C.

Kadangi fermentinius preparatus numatyta taikyti chromintam odos pusgaminiui apdoroti prieš papildomą chrominimą, kai to pusgaminių pH yra apie 2,5 – 3,5 arba tokiam pačiam pusgaminiui, bet po neutralizavimo proceso, kai jo pH būna padidinamas iki 5 ar daugiau, galima teigti, kad pirmuoju atveju tinkamiausias būtų FP Mystozyme ABL new, o neutralizuotam pusgaminiui apdoroti būtų galima taikyti ir FP Zime SB Conc. 9000 U.E. bei FP Zime SB EXTRA Conc. Beje, reikia pažymėti, kad FP Vilzim PRO N būdamas stipriai aktyvus šarminėje aplinkoje, neutralioje aplinkoje taip pat pasivymi, nors ir nedideliu, bet pastebimu aktyvumu.

3.1.2 Fermentinių preparatų kolagenolitinio aktyvumo tyrimai

Apdorojant chromintą pusgaminį yra svarbu, kad būtų kuo stipriau veikiami nekolageniniai baltymai, tokie kaip elastinas ar dermatansulfatai ir kuo mažiau – kolageniniai. Dėl šios priežasties buvo pabandyta įvertinti anksčiau minėtų fermentinių preparatų kolagenolitinį aktyvumą.

Tyrimuose buvo nustatomas trijų fermentinių preparatų – Mystozyme ABL new, Vilzim PRO N ir Zime SB Extra Conc. 120000 U.E. kolagenolitinio aktyvumas esant skirtingoms terpės pH vertėms. Kolagenolitinio aktyvumas parodo preparatų gebėjimą hidrolizuoti kolageną. Kolagenolitinio aktyvumo tyrimu siekiama išsiaiškinti, kaip stipriai fermentai gali paveikti kolageną odoje. Todėl analizės metu, kaip substratas buvo naudotas natyvus kolagenas, o poveikis substratui vertintas pagal hidroksiprolino kiekį apdorojimo tirpale. Tyrimo rezultatai pateikti 3.4 paveiksle.



3.4 pav. Fermentinių preparatų kolagenolitinio aktyvumo priklausomybė nuo terpės pH kai temperatūra 40 °C.

Iš gautų rezultatų matyti, kad fermentinio preparato Mystozyme ABL new kolagenolitinio aktyvumas buvo santykinai mažiausias lyginant su kitais fermentiniais preparatais ir jis buvo aktyvus tik rūgštinėje terpėje. Jo maksimalus aktyvumas nustatytas kai pH buvo 2,5 pH ir siekė 80 vnt/g. Zime SB preparatas aktyviai kolagenolitiškai veikė pakankamai plačiame pH verčių intervale, o ypač kai pH 6. Apskritai, šio preparato kolagenolitinio aktyvumas buvo ženkliai didesnis, palyginus su kitais fermentiniais preparatais. Fermentinio preparato Vilzim PRO N didžiausias kolagenolitinio, beje kaip ir kazeinolitinio, aktyvumas buvo prie pH 12, bet, reikia pastebėti, kad jis buvo aktyvus pakankamai plačiame pH intervale ir buvo aktyvus net kai pH buvo ženkliai mažesnis nei 7.

Įdomu yra tai, kad lyginant kazeinolitinio ir kolagenolitinio aktyvumo nustatymo rezultatus matyti, kad neutralioje ar šarminėje terpėje aktyvesniems FP kolagenolitinio aktyvumo pH intervalas yra platesnis nei kazeinolitinio, o rūgštinėje terpėje veikiančiam FP preparatui kolagenolitinio veikimo šis pH verčių intervalas yra siauresnis nei kazeinolitiniam aktyvumui.

3.2 Fermentinio apdoravimo įtaka chrominto pusgaminio struktūros pokyčiams

3.2.1 Suvirimo temperatūros pokyčiai

Suvirimo temperatūra yra vienas iš svarbiausių odos kokybės parametrų. Jis apibūdina odos elgesį keliant temperatūrą. Suvirimo temperatūra tiesiogiai priklauso nuo odos kolageno hidroterminio stabilumo. Įprastai suvirimo temperatūros nustatymas yra atliekamas distiliuotame vandenyje (iki 100 °C) vandens arba glicerolio-vandens tirpale esant jų santykiui 50:50 (virš 100 °C), į kurį nustatymo metu panardinama oda.

Prieš šią analizę chrominto pusgaminio bandiniai buvo papildomai chrominti ir tada skirtingai neutralizuoti. Fermentiniai preparatai apdorojimui buvo dedami arba tiesiai į neutralizavimo tirpalą kartu su neutralizuojančiomis medžiagomis arba dedant fermentinius preparatus po neutralizavimo papildomai. Abiem atvejais naudoti tokie FP – Mystozyme ABL new, Zime SB Extra Conc. Dėti

įvairūs šių FP kiekiai. Atlikus procesus bandiniai plauti sunaudojant 200 % H₂O (40 °C temperatūroje) ir nustatyta jų suvirimo temperatūra (3.1 lentelė).

Fermentams veikti įtakos turi aplinkos (tirpalo bei odos pusgaminio pH) sąlygos. Kadangi FP sudėtyje yra lydinčių medžiagų, kurios gali turėti įtakos tirpalų pH pokyčiams, kartu buvo matuoti ir tirpalų, į kuriuos buvo dedama fermentinių preparatų, pH procesui pasibaigus ir tuo pat metu matuotas pusgaminio ištraukos pH (3.1 lentelė).

Analizuojant gautus duomenis galima teigti, kad turbūt svarbiausia išvada iš gautų rezultatų (3.1 lentelė) galėtų būti ta, kad dedant fermentus kartu su neutralizavimu ar atskirai, praktiškai visais atvejais bandinių suvirimo temperatūra būna aukštesnė nei jų nededant.

Bandant vertinti atskirus rezultatus matyti, kad neutralizavimo metu naudojant mažiau FP, gautos suvirimo temperatūros vertės yra artimos kontrolinio bandinio suvirimo temperatūros vertei, kai FP nededamas. Mažiausia vertė gauta kai neutralizavimo metu buvo įdėtas 1 % Zime SB Extra Conc. Aukštesnė suvirimo temperatūra buvo dedant neutralizavimo metu Mystozyme ABL new 5 % arba Zime SB Extra Conc. 5 %.

Kai fermentinis apdorojimas atliekamas po neutralizavimo kaip atskiras procesas (1 valandą) dedamo FP kiekis pastebimos įtakos neturėjo, tačiau matoma akivaizdi skirtingų fermentinių preparatų įtaka. Naudojant Mystozyme ABL new hidroterminis odos stabilumas buvo 4°C aukštesnis lyginant su kontroliniu bandiniu.

Atliekant papildomą apdorojimą FP po neutralizavimo 3 valandas pastebėta, kad Mystozyme ABL new paveiktų odos bandinių suvirimo temperatūra buvo žemesnė 2 °C lyginant su bandiniais, kai veikiama buvo 1 valandą, Zime SB Extra Conc. naudojimo atveju aukštesnė 2 °C.

Analizuojant eksperimento rezultatus galima teigti, kad vertinant bandinių hidroterminį stabilumą papildomas apdorojimas fermentiniais preparatais po neutralizavimo pastebimos naudos nedavė. Skirtumas lyginant bandinius, kuriuos apdorojant kai FP buvo naudojami neutralizavimo metu bei po neutralizavimo yra minimalus, todėl, suvirimo temperatūros padidėjimo požiūriu, žvelgiant iš ekonominės perspektyvos fermentinį apdorojimą labiau apsimoka atlikti neutralizavimo metu. Tuomet neprailgėja procesų trukmė ir nepadidėja energijos sąnaudos procesams atlikti. Be to, tokiu atveju reikėtų naudoti daugiau fermentinių preparatų. Apibendrinant šiuos rezultatus galima teigti, kad fermentai veikia odos baltymus, šalindami likusias nestruktūruotas baltymines medžiagas [2] dėl ko kolageno plaušeliai suartėja, galimai susidarant papildomiems vandeniliniams ryšiams tarp kolageno makromolekulių ir tai, atitinkamai, nulemia suvirimo temperatūros pakilimą.

Siekiant įvertinti ar įvykęs minėtas fermentinių preparatų poveikis išlieka pastebimas ir įvykdžius kitus išdėrbimo procesus, po šlapios apdailos procesų buvo pakartotinai nustatyta suvirimo temperatūra.

Neutralizavimo metu ar po jo dėta FP Zime SB, kaip turėjusio ženklėsnį poveikį tokio apdorojimo metu. Rezultatai pateikti 3.2 lentelėje.

3.1 lentelė. Neutralizavimo ir fermentinio apdorojimo parametrų, ir jų atlikimo tvarkos įtaka pusgaminio suvirimo temperatūrai bei tirpalo ir pusgaminio pH

Procesų atlikimo tvarka, fermentinis preparatas, jo kiekis % chrominto pusgaminio, proceso trukmė	Suvirimo temperatūra °C	pH	
		tirpalo su FP	pusgaminio
Neutralizavimas be FP (kontrolinis bandinys), 1,5 val.	119±0,42	6,88	4,97
Neutralizavimas ir fermentinis apdorojimas kartu, Mystozyme ABL new, 1; 1,5 val.	121±0,61	7,13	5,07
Neutralizavimas ir fermentinis apdorojimas kartu, Mystozyme ABL new, 5; 1,5 val.	122±0,58	6,73	5,33
Neutralizavimas ir fermentinis apdorojimas kartu, Zime SB Extra Conc., 1; 1,5 val.	119±0,44	6,13	5,58
Neutralizavimas ir fermentinis apdorojimas kartu, Zime SB Extra Conc., 5; 1,5 val.	122±0,62	6,8	5,01
Neutralizavimas (1,5 val.) ir papildomas apdorojimas fermentais po neutralizavimo Mystozyme ABL new, 1; 1 val.	123±0,67	6,85	5,3
Neutralizavimas (1,5 val.) ir papildomas apdorojimas fermentais po neutralizavimo Mystozyme ABL new, 5; 1 val	123±0,74	6,26	4,76
Neutralizavimas (1,5 val.) ir papildomas apdorojimas po neutralizavimo Zime SB, 1; 1 val.	120±0,61	5,75	4,94
Neutralizavimas (1,5 val.) ir papildomas apdorojimas po neutralizavimo Zime SB, 5; 1 val	120±0,59	6,26	5,46
Neutralizavimas (1,5 val.) ir papildomas apdorojimas po neutralizavimo Mystozyme ABL new, 1; 3 val	121±0,57	5,85	5,34
Neutralizavimas (1,5 val.) ir papildomas apdorojimas po neutralizavimo Mystozyme ABL new, 5; 3 val	121±0,58	5,85	5,29
Neutralizavimas (1,5 val.) ir papildomas apdorojimas po neutralizavimo Zime SB, 1; 3 val	122±0,64	6,7	5,49
Neutralizavimas (1,5 val.) ir papildomas apdorojimas po neutralizavimo Zime SB, 5; 3 val	122±0,70	6,42	6,04

3.2 lentelė. Skirtingai apdorotų odos bandinių suvirimo temperatūra po šlapios apdailos procesų

Paruošimo šlapiai apdailai procesų atlikimo tvarka, fermentinis preparatas, jo kiekis % chrominto pusegaminio, proceso trukmė	Suvirimo temperatūra °C
Neutralizavimas be F.P, (kontrolinis bandinys). 1,5 val	124±0,74
Neutralizavimas ir fermentinis apdorojimas kartu, Zime SB Extra Conc., 5; 1,5 val.	126±0,70
Neutralizavimas (1,5 val.) ir papildomas apdorojimas Zime SB, 5; 1,5 val.	126±0,70

Iš pateiktų rezultatų matoma, kad po šlapios apdailos procesų bandinių suvirimo temperatūra pasikeitė, ji ženkliai pakilo. Kontrolinio bandinio suvirimo temperatūra pakilo 5 °C. Tai reiškia, kad po neutralizavimo vykdomuose procesuose naudojamos medžiagos teigiamai veikia odos struktūrą. Kai neutralizavimo metu buvo kartu dedama FP Zime SB Extra Conc. pastarojo veikimas suvirimo temperatūrą pakėlė dar keliais laipsniais, o tai leido suprasti, kad toks apdorojimas yra reikšmingas.

Pagal gautus rezultatus, kai fermentinis apdorojimas vykdomas po neutralizavimo ir kai FP dedamas neutralizavimo metu, galima patvirtinti anksčiau paminėtą teiginį, kad ekonominiu požiūriu, efektyviau fermentus naudoti neutralizavimo metu, nei daryti papildomą apdorojimą fermentais po neutralizavimo..

Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti, jog neutralizavimo metu dedant fermentus stebimas akivaizdus odos hidroterminio stabilumo pasikeitimas, suvirimo temperatūra pakyla. Taip pat aišku, kad suvirimo temperatūrai turi įtakos ne tik neutralizavimo metu naudotos medžiagos.

3.2.2 Cr (III) oksido kiekis odoje nustatymas

Chromo junginių kiekis buvo nustatytas neapdorotos odos ir po papildomo chrominimo ir neutralizavimo. Tyrimo rezultatai pateikti 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. Chromo junginių kiekis odoje

Procesas	Cr ₂ O ₃ kiekis odoje %
Chrominta odos žaliava	3,02
Papildomai chrominta oda	2,49

Iš pateiktų rezultatų matoma, kad atlikus papildomą chrominimą ir neutralizavimą chromo junginių kiekis odoje sumažėja. Tai patvirtina, jog po papildomo chrominimo ir neutralizavimo buvo stebėtas odos suvirimo temperatūros sumažėjimas. Prieš neutralizavimą suvirimo temperatūra buvo 123 °C, o po neutralizavimo 119±0,42 °C, tam daro įtaką chromo junginių kiekis odoje.

3.2.3 Poveikio kolagenui tyrimai

Suvirimo temperatūros pokyčiai parodo naujų ryšių susidarymą ar esančių irimą. Antra vertus tie ryšiai gali būti ne vien tarp kolageno makromolekulių, bet tarp kolageno ir kitų nekolageninių medžiagų, elastino ar dermatansulfato bei kitų. Taigi, tai yra tik netiesioginis rodiklis, parodantis kitimus kolagene ar odos dermoje apskritai. Geriau įvertinti poveikį kolagenui galima tiriant patį kolageną. Jei apdorojimo tirpale randama kolageninių baltymų, tai reiškia, kad yra ardomas pats kolagenas, o randama kiekis apibūdina įvykusio poveikio lygį. Atitinkamai, tirpale nustačius hidroksiprolino (amino rūgštis būdinga kolagenui) kiekį galima spręsti apie taikomo apdorojimo metodo poveikį odos kolagenui.

Apskritai, beveik bet kurio odos proceso tikslas yra šalinti nekolageninius baltymus ir purenti kolageno plaušelius, tuomet oda tampa pralaidesnė ir reaktingesnė cheminėms medžiagoms naudojamoms odoms išdirbti ir norimoms savybės suteikti, be to ji tampa minkštesnė, įgyja geresnę prekinę išvaizdą. Kartu, yra svarbu pačio kolageno nepažeisti, nes tai lemtų blogesnes fizikines mechanines odos savybes – stiprio mažėjimą, silpnesnį išviršinį sluoksnį ir t.t.

Apibendrinant tai reikėtų, kad nekolageninius baltymus šalinti reikia, kolageną purenti reikia, bet jo negalima pažeisti.

Poveikiui kolagenui nustatyti buvo chrominto pusgaminio bandiniams buvo atliktas papildomas chrominimas ir plovimas. Toliau buvo apdorojama FP dedant jų į neutralizavimo tirpalą arba apdorojant papildomai po neutralizavimo. Apdorojimui buvo pasirinkti tokie fermentinių preparatų kiekiai (% nuo chrominto pusgaminio masės): Mystozyme ABL new 1 %; Mystozyme ABL new 5 %; Zime SB Extra Conc. 120000 U.E 1 %; Zime SB Extra Conc. 120000 U.E 5 %. Papildomo chrominimo procedūra atliekama kaip aprašyta metodikose. Kitame – neutralizavimo etape, buvo taikomi skirtingi metodai apdorojant su fermentiniais preparatais. Tačiau pagrindiniai neutralizavimo parametrai buvo vienodi visais atvejais: H₂O – 150 %; NaHCO₃ – 1,5 %; HCOONa – 2 %. Temperatūra viso proceso metu buvo 40±1 °C. Kai fermentinis apdorojimas buvo atliekamas po neutralizavimo, bandiniai tarp šių apdorojimų buvo praplaunami naudojant 200 % H₂O.

Apdorojimo variantai:

I variantas (kontrolinis) buvo apdorojama (neutralizuojama) taikant įprastinę metodiką be fermentinių preparatų.

II – V variantai. Bandiniai buvo neutralizuojami kartu dedant dedami fermentinių preparatų į neutralizavimo tirpalą. Po proceso surinkti tirpalai hidroksiprolino nustatymo kiekiui nustatyti. Buvo dedama fermentinių preparatų:

II variantas – 1 % Mystozyme ABL new;

III – 5 % Mystozyme ABL new;

IV – 1 % Zime SB Extra Conc. 120000 U.E.;

V – 5 % Zime SB Extra Conc. 120000 U.E..

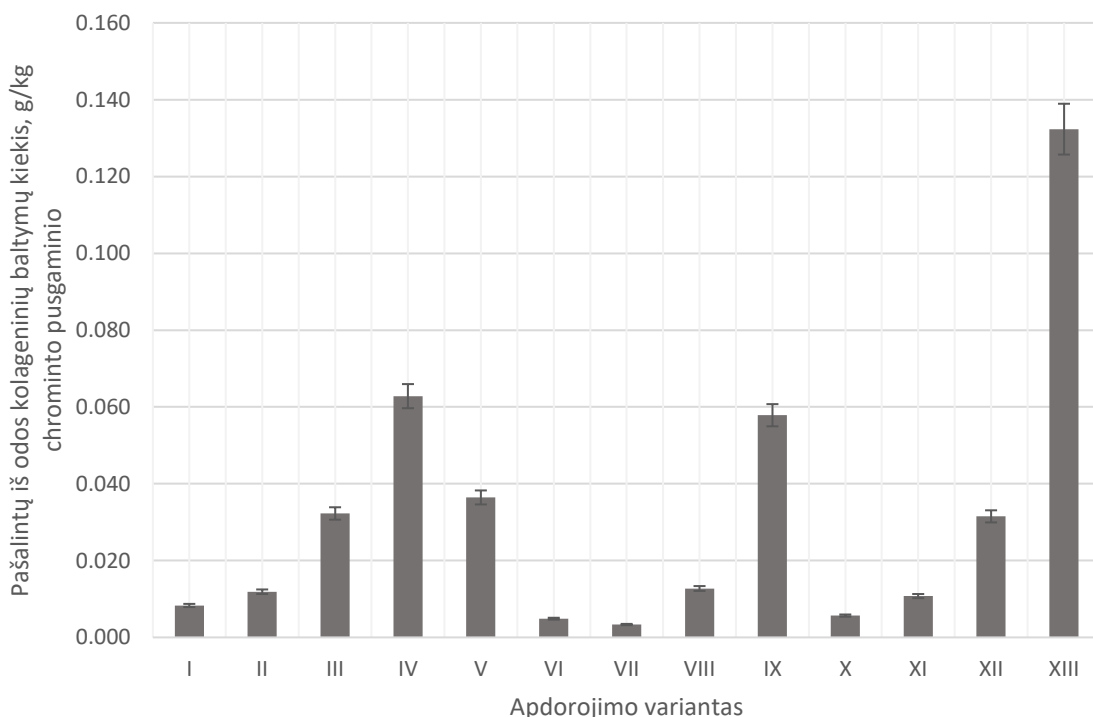
VI – IX variantai. Bandiniai po įprasto neutralizavimo buvo papildomai veikiami fermentiniais preparatais. Procesas vykdytas 1 valandą. Tirpalai surinkti ir juose nustatytas kolageninių baltymų kiekis. Buvo naudojami tokie fermentiniai preparatai:

VI variantas – 1 % Mystozyme ABL new;
 VII – 5 % Mystozyme ABL new;
 VIII – 1 % Zime SB Extra Conc.;
 IX – 5 % Zime SB Extra Conc..

X – XIII variantai. Bandiniai po neutralizavimo, 3 val. papildomai apdoroti fermentiniais preparatais.
 Naudoti tokie FP:

X – 1 % Mystozyme ABL new;
 XI – 5 % Mystozyme ABL new;
 XII – 1 % Zime SB Extra Conc.;
 XIII – 5 % Zime SB Extra Conc..

Visi procesai vyko nepertraukiamai maišant. Gauti kolageninių baltymų nustatymo rezultatai pateikti 3.5 paveiksle



3.5 pav. Pašalintų iš odos kolageninių baltymų kiekio priklausomybė nuo apdoravimo būdo

Analizuojant gautus tyrimo rezultatus matyti, kad papildomai apdorojant odą fermentiniais preparatais, beveik visais atvejais iš odos bandinių pašalinta daugiau kolageninių baltymų nei tiesiog įprasto neutralizavimo metu. Todėl galima teigti, kad fermentiniai preparatai veikia kolageną. Stipriausias poveikis gautas atliekant fermentinį apdorojimą po neutralizavimo ir veikiant odą 5 % Zime SB Extra Conc. FP 3 valandas. Lyginant pašalinto kolageno kiekį apdorojant pagal kontrolinį variantą su apdorojimu dedant 5 % Zime SB, matyti, kad pastaruoju atveju poveikis kolagenui buvo beveik 17 kartų stipresnis nei kontrolinio apdoravimo atveju.

Silpniausias poveikis kolagenui nustatytas fermentinį apdorojimą atliekant po neutralizavimo naudojant 1 % ir 5 % Mystozyme ABL new preparatą ir odos bandinį veikiant 1 valandą. Rezultatų

skirtumas naudojant 1 % ar 5 % Mystozyme ABL new buvo neženklus – 0,002 g/kg chrominto pusgamini. Iš to galima spręsti, kad šis fermentinis preparatas odos kolageną veikia silpnai ir kolageninių baltymų randama netgi mažiau nei atliekant įprastą neutralizavimą. Tačiau siekiant tiksliai įvertinti fermento poveikį odos kolageniui, turėtume susumuoti kolageninių baltymų kiekį randamą kontrolinio apdorojimo metu su po neutralizavimo vykdomo fermentinio apdorojimo metu rastais pašalintų kolageninių baltymų kiekiais. Tai reiškia, kad fermentiniai preparatai visais atvejais jų dedant po neutralizavimo taip pat veikia šio pusgamini kolageną.

Rezultatai rodo, kad svarbi ir apdorojimo trukmė – iš rezultatų galima matyti, kad kai fermentinis apdorojimas nepriklausomai nuo panaudotų fermentinių preparatų vykdomas po neutralizavimo ir trunka 3 valandas, randama daugiau pašalintų kolageninių baltymų nei apdorojant 1 val.

3.2.4 Fermentinio apdorojimo įtaka fizikinėms ir mechaninėms chrominto pusgamini savybėms

3.2.4.1 Stiprio savybės

Apdorojimo fermentais poveikis buvo vertintas nustatant apdoroto FP chrominto pusgamini stiprio savybes: t.y. įprastai neutralizuoto ir neutralizuoto kartu dedant 5 % (chrominto pusgamini masės) FP Zime SB Extra Conc. Bandiniai prieš analizę buvo dehidratuoti acetone struktūrai užfiksuoti kaip aprašyta metodinėje dalyje. Rezultatai pateikti 3.3.A lentelėje.

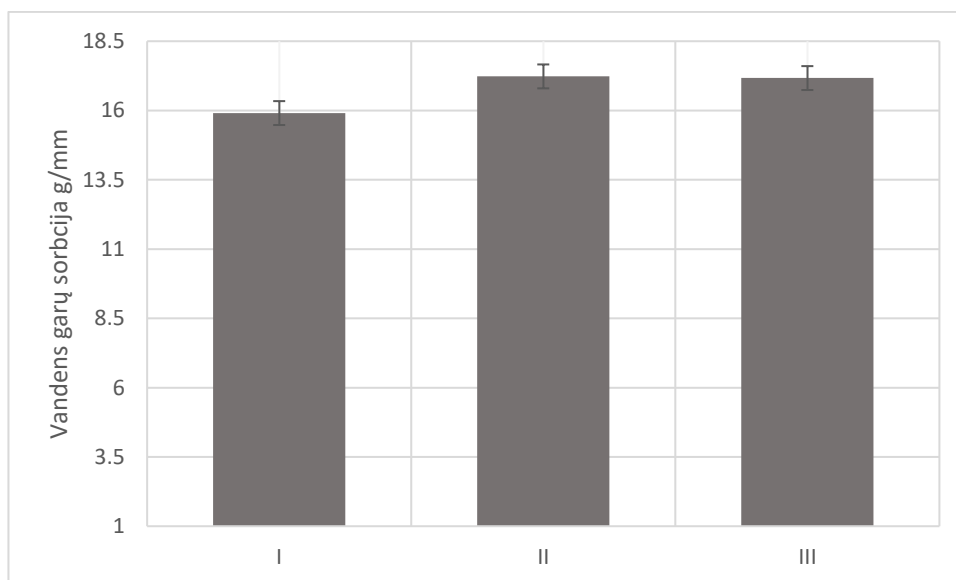
3.4. A lentelė. Chrominto pusgamini fizikinių ir mechaninių savybių priklausomybė nuo apdorojimo būdo

Bandinio pdiravimo būdas	Rodiklis		
	Santykinė ištisa prie 10 N apkrovimo, %	Santykinė ištisa trūkio metu %	Tempiamasis stipris N/mm ²
Įprastas neutralizavimas (kontrolinis)	47	48	24,8
Neutralizavimas dedant Zime SB Extra Conc. 5%	54	55	20,5

Gauti rezultatai rodo, kad toks fermentinis apdorojimas, deja, turėjo neigiamos įtakos pusgamini stiprio savybėms, t. y. ištisa ženkliai padidėjo, o stipris tempiant sumažėjo. Taigi nepaisant ankščiau aptartų teigiamų pokyčių, tokių kaip aukštesnė suvirimo temperatūra, stiprio sumažėjimas ir ištisos sumažėjimas, reiškia ženklų pusgamini kokybės pablogėjimą.

3.2.4.2 Vandens garų sorbcija

Vykstant apdorojimas keičiasi erdvės apdorojamoje odoje, kurios turi įtakos įvairioms odos higieninėms savybėms, tokioms kaip vandens garų sorbcijai ar vandens garų pralaidumui. Šių tyrimų metu nustatėme chrominto pusgamini vandens garų sorbcijos priklausomybę nuo pusgamini apdorojimo būdo rezultatai pateikti 3.6.B paveiksle.



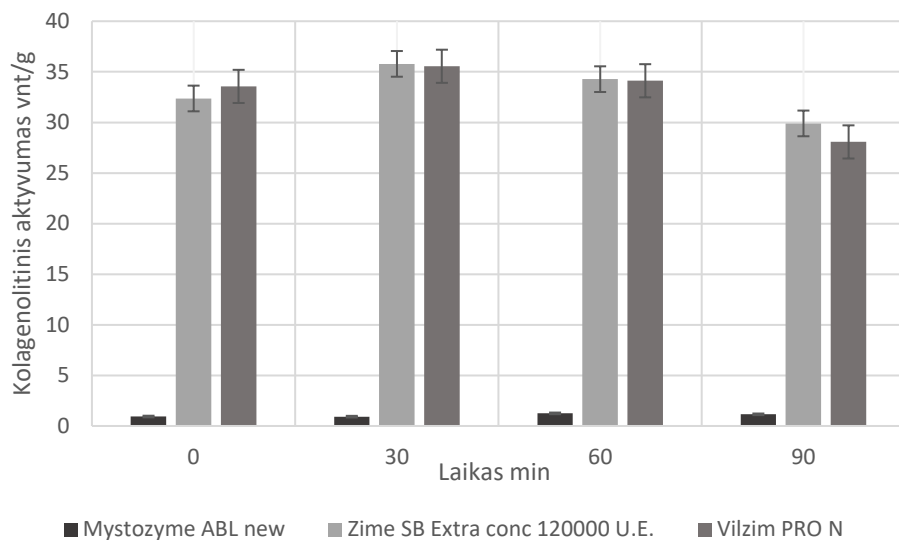
3.6 B pav. Vandens sorbcijos chromintu pusgaminio priklausomybė nuo jo apdorojimo būdo. I – įprastai neutralizuotas; II – neutralizuotas kartu dedant FP Zime SB Extra Conc. 5%; III – neutralizuotas ir papildomai 1,5 val. apdorotas dedant FP Zime SB Extra Conc. 5%

Šio nustatymo metu gauti rezultatai parodė, kad apdorojimas fermentais praktiškai neturėjo jokios įtakos šiam rodikliui.

3.2.5 Kolagenolitinio fermentinių preparatų aktyvumo kitimo chrominto pusgaminio neutralizavimo metu tyrimai

Paprastai bet kokio apdorojimo metu fermentų aktyvumas mažėja, todėl tikslinga žinoti kaip tas aktyvumas kinta, tam kad būtų galima parinkti optimalią proceso trukmę, t.y. procesą nutraukti, jei fermento aktyvumas ženkliai sumažėja ir energijos sąnaudos procesui vykdyti viršija apdorojimo fermentu teikiamą efektą.

Dėl šios priežasties buvo nustatomas fermentų aktyvumo kitimas apdorojimo metu, kai FP dedama į neutralizavimo tirpalą ir abu procesai: neutralizavimas ir veikimas fermentais vyksta vienu metu. Norint tiksliau įvertinti kolagenolitinio fermentinių preparatų aktyvumo kitimą, eksperimentas atliktas taip, proceso metu buvo paimama tirpalo ir buvo nustatomas jame esančių fermentų aktyvumas. Eksperimentas atliktas dedant 5 % (nuo chrominto pusgaminio masės) FP Mystozyme ABL new arba Zime SB Extra Conc., arba VilzimPRO N į neutralizavimo tirpalą. Pirmą tirpalo porciją paimta iškart sumaišius fermentinį preparatą su neutralizavimo tirpalu, antroji – vykstant neutralizavimui po pusvalandžio, trečioji po valandos ir ketvirtoji – po 1,5 valandos. Gauti tyrimo rezultatai pateikti 3.7 paveiksle.



3.7 pav. Fermentinių preparatų aktyvumo priklausomybė nuo neutralizavimo trukmės

Iš rezultatų matyti, kad naudotų fermentinių preparatų aktyvumas yra pakankamai stabilus proceso metu ir po 1,5 val jis sumažėja neženkliai. Tai reiškia, kad procese nėra medžiagų ir nesusidaro produktų, kurie stabdytų fermento veikimą ir mažintų jų aktyvumą. Antra vertus, akivaizdus skirtumas tarp Mystozyme ABL new preparato ir kitų dviejų preparatų kolagenolitinį aktyvumą neutralizavimo tirpale. Beje šis skirtumas visiškai atitinka minėtų fermentinių preparatų aktyvumą skirtumus, gautus nustatant jų kolagenolitinį aktyvumą.

Remiantis gautais rezultatais galime daryti išvadą, kad neutralizacijos laikas turi įtakos kolagenolitiniam fermentų preparatų aktyvumui ir pagal pašalintų baltymų kiekį galima spręsti, jog naudotos VilzimPRO N ir c koncentracijos buvo pasirinktos per didelės.

3.3 Fermentinio apdorojimo įtaka odos pusgaminių po šlapios apdailos savybėms

Apdorojimui fermentiniais preparatais įvertinti, chromintam pusgaminio po minėtų apdorojimų buvo atlikti šlapios apdailos procesai, t. y. jis buvo dažomas, riebinamas, plaunamas ir džiovinamas pagal šio procesų metodikas, pateiktas metodinėje dalyje. Atliekant procesą buvo stebimas jų vyksmas ir pusgaminių pokyčiai. Išdžiovinus pusgaminį jam buvo nustatomos cheminės, fizikinės bei mechaninės savybės ir vertinamas poveikio fermentiniais preparatai efektas.

3.3.1 Dažų įsiskverbimas ir pasiskirstymas odos pusgaminyje

Odos pramonėje vienas labai svarbus rodiklis vertinant odos kokybę yra jos spalva bei tolygumas. Paprastai prieš šlapios apdailos procesus oda būna žalsvai mėlynos spalvos dėl trivalenčio chromo junginių (iš čia ir pavadinimas „wet blue“), jai vėliau yra suteikiama norima spalva. Dažų įsiskverbimui bei pasiskirstymui įtakos turi, pusgaminių dažymui paruošimas, t. y. iki dažymo procesuose naudotos medžagos vienaip ar kitaip veikia odos struktūrą. Taip pat labai svarbu kaip giliai dažikliai įsiskverbia į odą, nes naudojant ir dėvint odinius gaminius gali atsirasti mikro įplyšimų ir matyti nenudažyti odos sluoksniai. Siekiant, kad taip nebūtų, dažikliai turi būti įsiskverbę kuo giliau į dermą.

Dažymas buvo atliekamas skirtingai neutralizavimo metu ar po jo veikties odos bandiniams. Vienu atveju odos bandiniai fermentiniais preparatais buvo apdorojami neutralizavimo metu, kitu atveju buvo atliekamas 1,5 valandos trukmės papildomas fermentinis apdorojimas po neutralizavimo: abiem atvejais dėta 5% FP Zime SB Extra Conc. Šių bandinių nudažymas buvo lyginamas su įprastai neutralizuotu ir dažytu odos bandiniu.

Po dažymo buvo įvertinta dažų skverbtis į odą. Pusgaminis buvo perpjautas ir optinio mikroskopo su skale pagalba matuotas pradažytų sluoksnių storis (sumuotas išviršinio ir apatinio pradažytų sluoksnių storis). Rezultatai pateikti 3.5 lentelėje.

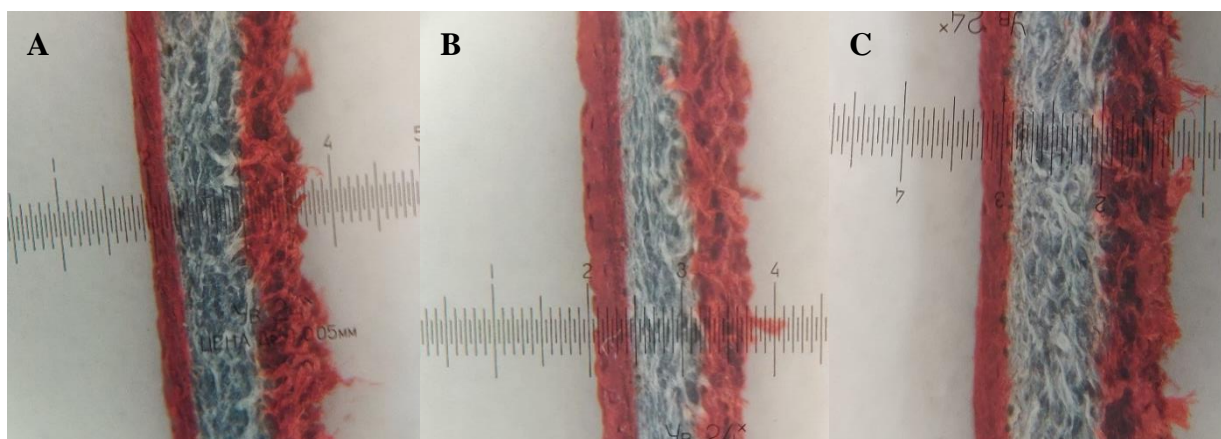
3.4 lentelė. Dažų skverbties priklausomybė nuo pusgaminio paruošimo dažymui būdo

Procesas prieš dažymą	Dažiklio įsiskverbimo gylis, %
Įprastas neutralizavimas (kontrolinis)	51,2
Neutralizavimas dedant Zime SB Extra Conc. 5%	51,7
Neutralizavimas ir papildomas apdorojimas 1,5 val. dedant FP Zime SB Extra Conc. 5%	58,8

Iš gautų rezultatų (3.4 lentelė) matyti, kad fermentinis apdorojimas turi įtakos dažų skverbčiai, t. y. ji padidėja, kai neutralizuojama kartu su fermentiniu apdorojimu – šiek tiek (beveik artima kontroliniam bandiniui), o apdorojant po neutralizavimo – ženkliai.

Beje, fermentinio apdorojimo efektas, kai tai pagerina skverbtį jau pastebėtas kitų autorių [44], teigiama, kad dedant fermentų į pikeliavimo procesą, tai taip pat turi teigiamos įtakos dažiklio skverbčiai.

3.8 paveiksle pateikti įvairiai apdorotų ir dažytų bandinių pjūvių nuotraukos.



3.8 pav. Dažyto chrominto pusgaminio skerspjūvio nuotraukos. A – kontrolinis dažytos odos bandinys; B – neutralizavimo metu dėta 5% FP Zime SB Extra Conc ; C – atliktas papildomas fermentinis apdorojimas po neutralizavimo dedant 5% FP Zime SB Extra Conc

Taip pat bandiniams buvo atlikta spalvų spektroskopijos analizė, kurios rezultatai pateikti 3.6 lentelėje. Pasak Tarptautinės apšvietimo komisijos [59], bet kokia spalva gali būti apibūdinama trimis spalvos charakteristikomis: h – spalvos tonu, C – spalvos grynumu ir L – spalvos šviesumu.

3.5 lentelė. Dažinių spalvos įvertinimas

Procesas prieš dažymą	Rodiklis	Vertės NBS vnt.
Įprastas neutralizavimas (kontrolinis)	L	43,89
	C	29,26
	h	25,11
Neutralizavimas dedant Zime SB Extra Conc. 5%	L	43,95
	C	29,22
	h	25,66
Neutralizavimas ir papildomas apdorojimas 1,5 val. dedant FP Zime SB Extra Conc. 5%	L	44,37
	C	30,57
	h	25,64

Iš analizės rezultatų matoma, kad visi spalvos kokybę apibūdinantys rodikliai yra labai artimi, taigi šiuo požiūriu, apdorojimas fermentai šiems rodikliams o tuo pačiu ir spalvos kokybei pastebimos įtakos neturėjo.

3.3.2 Fizikinių ir mechaninių odos savybių nustatymas

Odos pailgėjimas ir atsparumas tempiant yra du labai svarbūs odos kokybiniai parametrai. Pailgėjimas tiesiogiai susijęs su odos kokybe, tai nurodo kiek gali išsitempti ir prailgėti kai oda yra veikiamą tempimo jėgos, tarkim, dėvint avalynę, todėl šis rodiklis yra vienas iš svarbesnių vertinant odos kokybę. Atsparumas tempiant taip pat labai svarbi odos savybė, lemianti gaminio iš odos elgesį, jį dėvint.

Fermentinio apdorojimo įtakai nustatyti tirti bandiniai po šlapios apdailos, kurie šiems procesams buvo apdoroti skirtingai. Vienas bandinys neutralizuotas įprastai, o kitas apdorotas FP Zime SB Extra Conc jo dedant į neutralizavimo tirpalą. Bandinių stiprio savybės pateiktos 3.7 lentelėje.

3.6 lentelė Pusgaminio po šlapios apdailos stiprio savybių priklausomybė nuo chrominto pusgaminio apdorojimo būdo

Bandinio pdirbimo būdas	Rodiklis		
	Santykinė ištįsa prie 10 N apkrovimo, %	Santykinė ištįsa trūkio metu %	Tempiamasis stipris N/mm ²
Įprastas neutralizavimas (kontrolinis)	51	54	22,36
Neutralizavimas dedant Zime SB Extra Conc. 5%	51	53	22,82

Gauti rezultatai rodo, kad atlikus šlapios apdailos procesus skirtumai tarp fizikinių ir mechaninių savybių praktiškai išnyksta (lyginant su rezultatais, gautai chromintam pusgaminiaiui – 3.2 A lentelė),

t. y. jei iškart po chrominimo fermentais apdorotas pusgaminiis buvo ženkliai silpnesnis tempiant ir labiau tšsus, tai šlapios apdailos procesai suvienodina šias savybes ir neigiama apdoravimo fermentais įtaka panaikinama.

Iš pateiktų rezultatų matoma, kad pirmoje bandinių serijoje (I – II) FP apdorotas bandinys buvo mažiau atsparus tempimui nei kontrolinis bandinys. To priežastis gali būti ta, jog fermentas neutralizacijos metu stipriau veikė odos kolageną. Zime SB preparatas turi didelę kolagenolitinę aktyvumą, tai nustatyta buvo ankstesniuose tyrimuose.

Analizuojant antra bandinių seriją (III – IV) matoma, kad atsparumas tempimui kontrolinio bandinio ir apdoroto FP beveik susilygina, tai gali reikšti, kad po neutralizacijos vykdomos operacijos pagerina fizikines odos savybes.

3.3.3 Pusgaminio cheminės savybės

Pusgaminiai po įriebinimo buvo nustatyti drėgnis ir dichlormetane tirpių medžiagų kiekis. Tiriamasis pusgaminiis neutralizavimo metu buvo FP Zime SB Extra Conc. jo dedant 5 % nuo chrominto pusgaminio masės šio, preparato. Kontrolinis bandinys buvo neutralizuojamas įprastai, nededant FP. Kiti apdoravimo procesai buvo vienodi tiek kontroliniam, tiek tiriamajam pusgaminiumi. Minėtų rodiklių vertės pateiktos 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė Drėgnis ir dichlormetane tirpių medžiagų kiekis pusgaminyje po šlapios apdailos

Neutralizavimo metu naudotas FP % plikės masei	Drėgnis, %	Dichlormetane tirpių medžiagų kiekis, %
Kontrolinis be FP	12,9±0,4	3,8±0,4
Zime SB Extra Conc. 5%	12,9±0,4	3,7±0,4

Eksperimento metu gauti rezultatai rodo, kad abu rodikliai abiem bandiniams visiškai nesiskyrė. Galima teigti, kad apdoravimo būdas neturėjo įtakos prijungtų odos derma riebinančių medžiagų kiekiui.

3.4 Odos bandinių infraraudonoji spektroskopinė analizė

Norint tiksliau įvertinti galimus fermentinio apdoravimo padarytus struktūros pokyčius buvo atlikta infraraudonoji (IR) spektroskopinė analizė. Analizė atlikta siekiant įvertinti skirtingų apdoravimo būdų prieš šlapios apdailos procesus įtaką galimiems pokyčiams.

Paveiksle 3.9 pateiktas kontrolinio bandinio IR spektras, kai neutralizacija atlikta įprastiniu metodu nenaudojant fermentinių priedų. Spektras, kai neutralizacijos metu buvo dėta FP Zime SB Extra Conc. 5 %, pateiktas 3.10 paveiksle. 3.11 paveiksle yra pateiktas spektras bandinio, kuriam buvo atliktas papildomas fermentinis apdoravimas, naudojant FP Zime SB Extra Conc. (5%) po neutralizacijos.

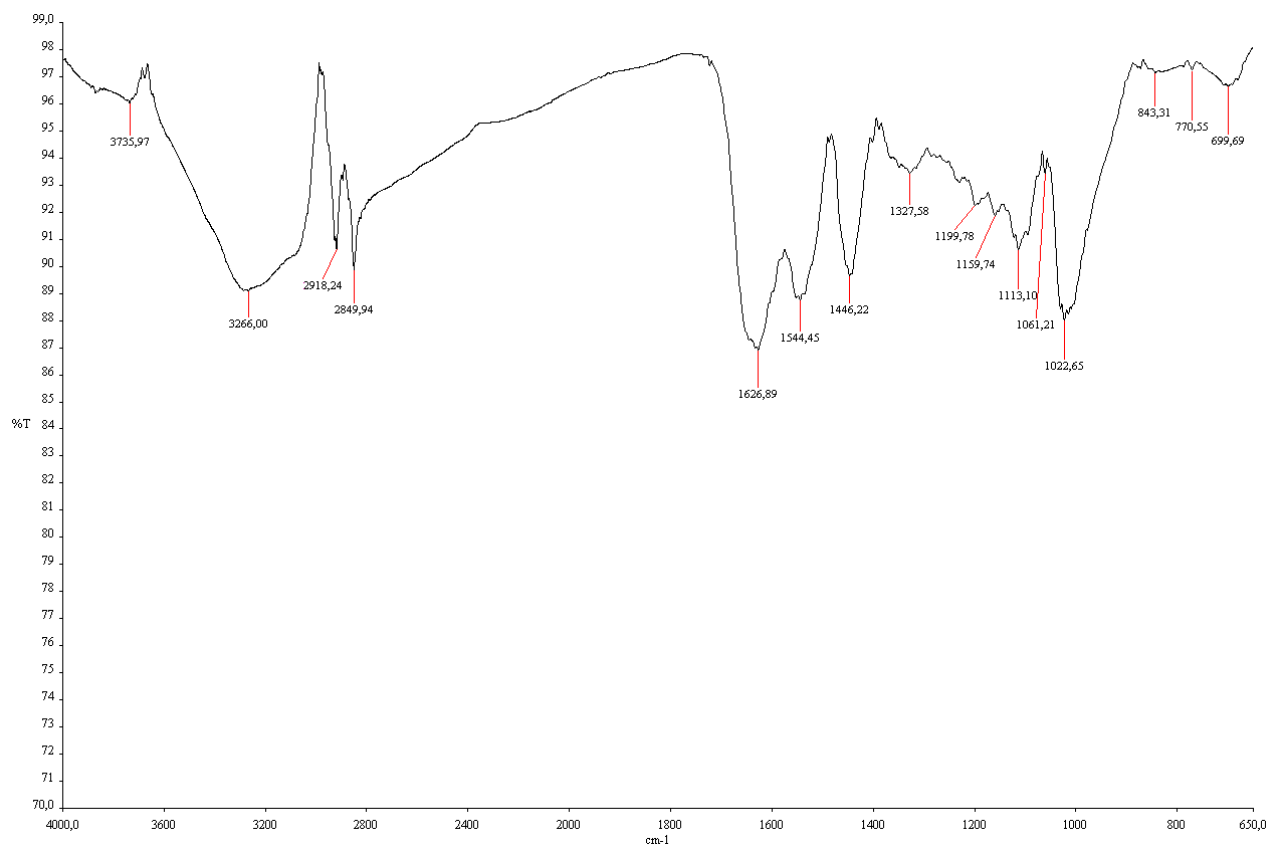
Spektrų palyginimui pasirinktos visiems spektrams būdingos smailės. Apibendrinti rezultatai pateikti 3.8 lentelėje. Svyravimai aptinkami intervale nuo 4000 iki 3000 yra būdingi vandeniliniams ryšiams,

tokioms grupėms kaip O-H, N-H. Visuose tirtuose bandiniuose šiame intervale tiek smailių padėtis, tiek jų intensyvumas nustatytas panašus, tai indikuoja, kad vandenilinių ryšių bandiniuose kiekis yra panašus. C-H ir C-N funkcinių grupių svyravimai nustatyti 3000–2300 cm⁻¹ intervale. Pirminius amidus indentifikuojančios smailės priskiriamos intervalui 1650–1550 cm⁻¹. Antrinių amidų – 1550–1450 cm⁻¹ ir tretinių amidų – 1451–1350 cm⁻¹.

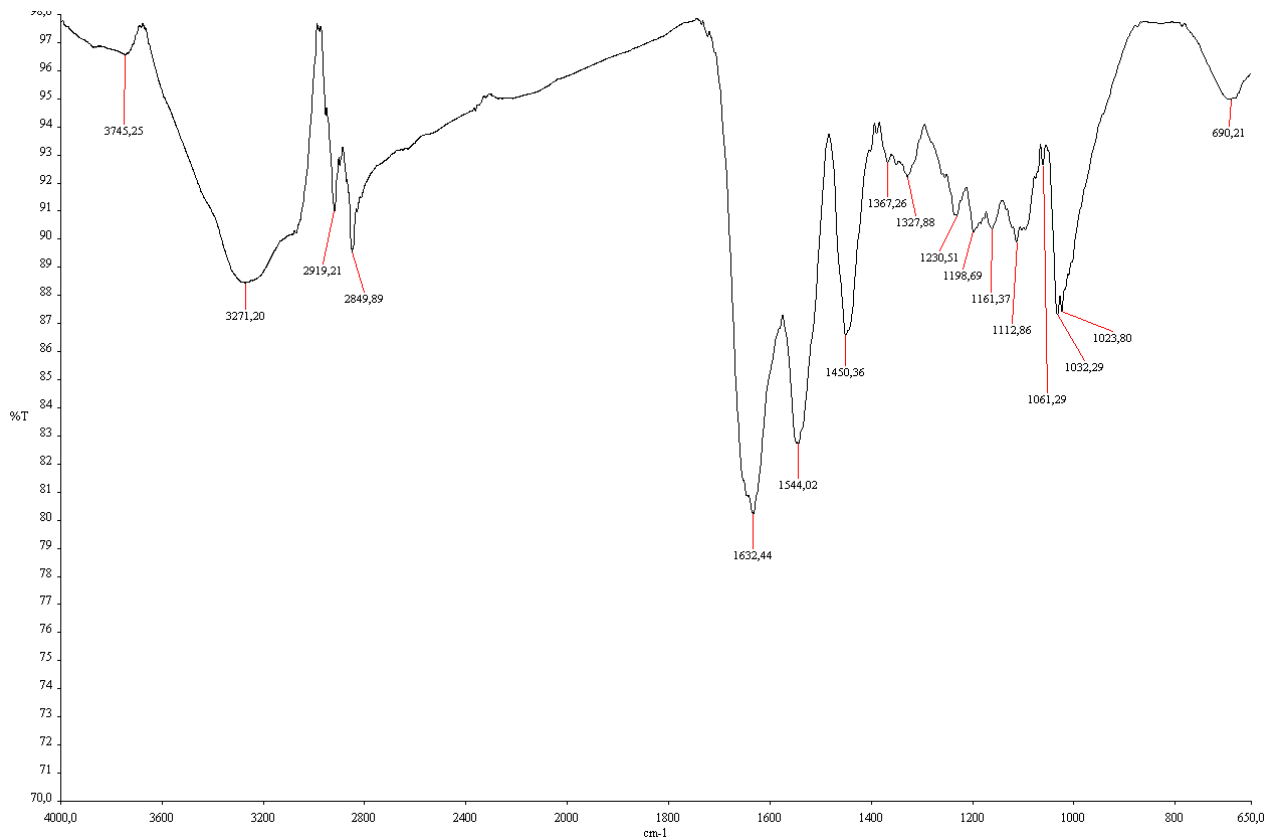
3.7 lentelė. IR spektroskopijos analizė po dažymo ir riebinimo procesų

Funkcinė grupė / ryšys, kuriam priskiriamas svyravimo intervalas	Smailės intervalas, cm ⁻¹		Smailės maksimumo pozicija cm ⁻¹		
	Nuo	Iki	Odų apdorojimo būdas		
			Kontrolinis	FP neutralizacijos metu	FP po neutralizacijos
N-H; O-H	4000	3000	3266,00	3271,20	3274,69
C-H; C-N	3000	2300	2918,24; 2849,94	2919,21; 2849,89	2920,01; 2852,48
Pirminiai amidai	1650	1550	1626,89	1632,44	1630,81
Antriniai amidai	1550	1450	1544,45	1544,02	1541,16
Tretiniai amidai	1451	1350	1446,22	1450,36	1449,36
NO ₂	1500	1300	1327,58	1367,26	1367,22

Iš gautų analizės duomenų matyti, kad visi gauti bandinių spektrai yra panašūs. Tai leidžia teigti, kad atlikti apdorėjimai nesukelia pženklesnių pokyčių odos baltymų supermolekulinėje struktūroje, todėl gauti spektrai yra beveik identiški.



3.9 pav. Dažyto pusgaminio, kontrolinis be FP, IR spektras



3.10 pav. Dažyto pusgaminių, kurių neutralizuojant naudotas Zime SB Extra Conc FP, IR spektras

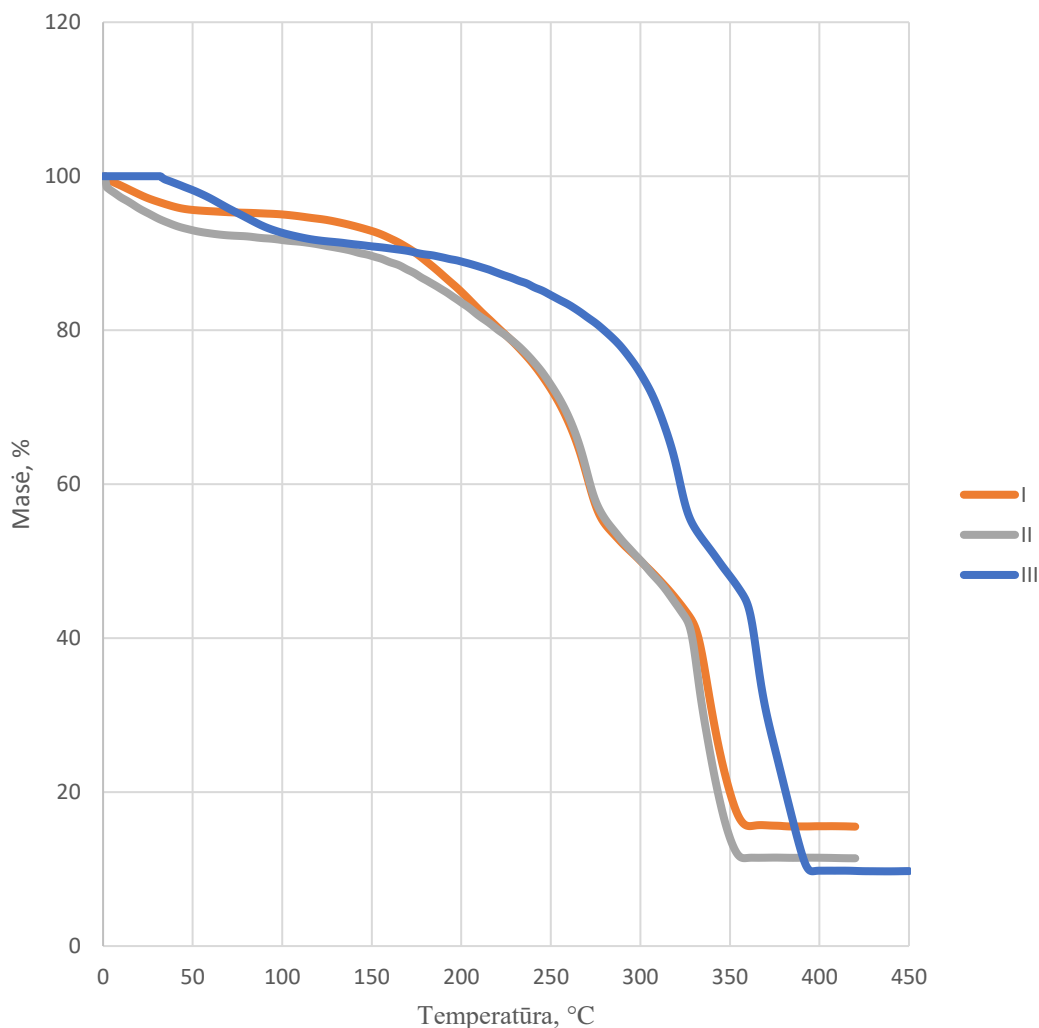


3.11 pav. Dažyto pusgaminių, kuris po neutralizacijos buvo papildomai apdorotas Zime SB Extra Conc. FP, IR spektras

3.5 Odos bandinių termogravimetrinė analizė

Bandiniams, kuriems buvo užrašyti spektrai buvo atlikta ir termogravimetrinė analizė. Atliekant termogravimetrinę analizę buvo nustatytas dažyto pusgaminių masės elgesys keliant aplinkos temperatūrą. Nuosekliai keliant temperatūrą buvo stebima, kaip keičiasi bandinių masė.

Analizės rezultatai pateikti 3.12 paveiksle.



3.12 pav. Odos bandinių masės pokyčio priklausomybė nuo temperatūros. I – neutralizuotas kartu dedant FP Zime SB Extra Conc. 5%; II – neutralizuotas ir papildomai 1,5 val. apdorotas dedant FP Zime SB Extra Conc. 5% III – įprastai neutralizuotas

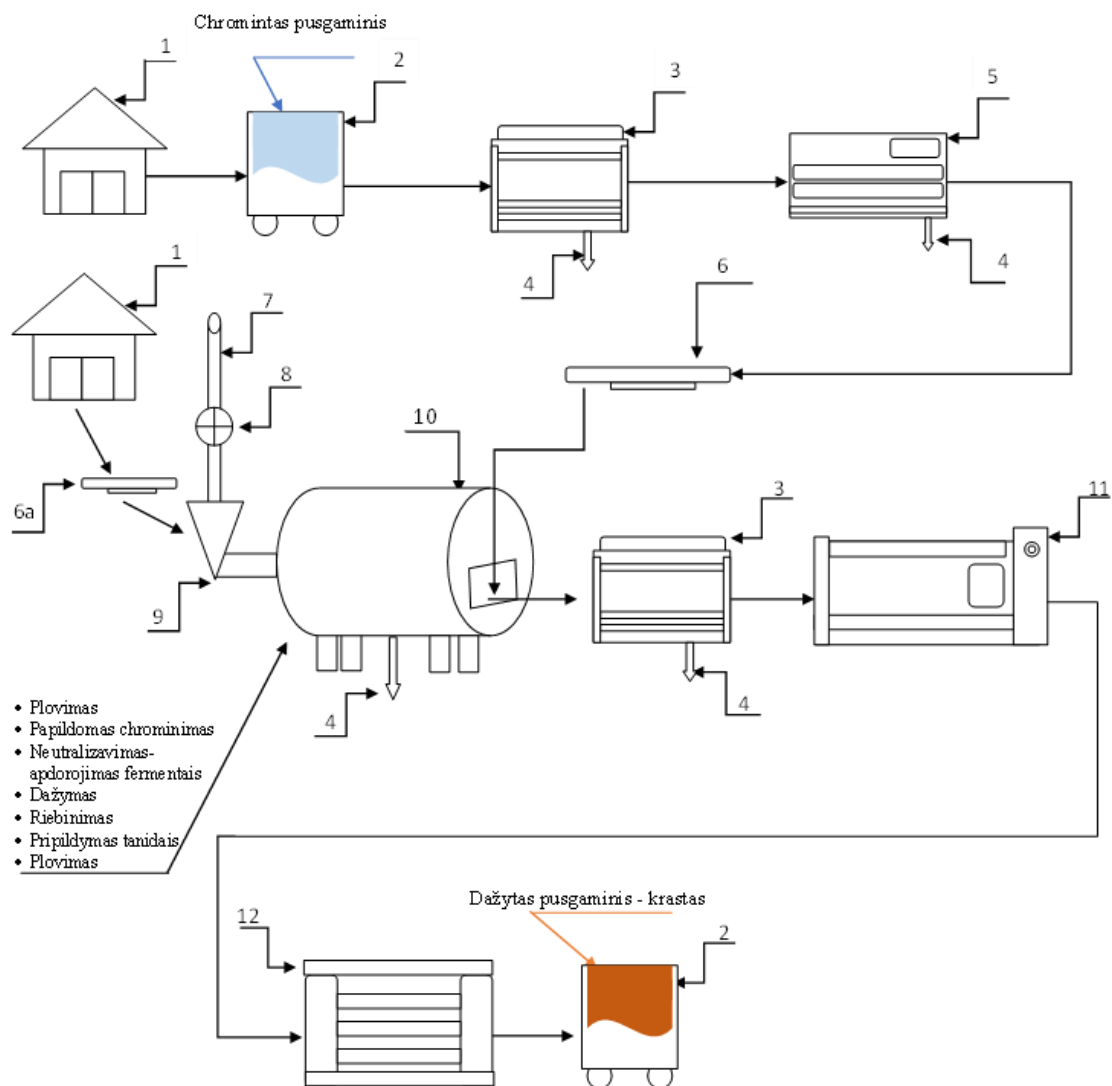
Kaip matyti iš 3.12 paveiksle pateiktų termogravimetrinių kreivių, I ir II bandinio masės pokytis keičiant temperatūrą visos analizės metu išlieka labai panašus, pasiekus maždaug 200 °C matomas staigus masės sumažėjimas, pasiekus 350 °C odos masė buvo maždaug I -15,6 %, II – 11,4 %, kai, tuo tarpu, III (kontrolinio) bandinio masė dar buvo apie 45 % pradinės. Tai rodo, kad atliktas apdorojimas fermentais turėjo ženklios įtakos bandinio destrukcijos temperatūrai, apdoroti fermentais bandiniai buvo ženkliai mažiau atsparūs aukštos temperatūros poveikiui.

4. Rekomendacijų dalis

Rekomenduoja naudoti fermentinius preparatus Zime SB Extra Conc. Mystozyme ABL new ir Vilzim PRO N neutralizavimo metu esant 40–42 °C temperatūrai.

Nevykdyti papildomo fermentinio apdorojimo, dėl per didelių kaštų ir per mažo pasiekiamo efekto.

Norint naudoti fermentinius preparatus neutralizavimo metu, reikia įvertinti atskirai kiekvieno norimo naudoti fermento duodamą efektą odos savybių pokyčiui ir įvertinti ar gaunamas savybių pagerėjimas vertas papildomų kaštų fermentui įsigyti ir procesui kontroliuoti



4.1 pav. Odos apdorojimo technologinė schema:

1 - sandelis, perdirbamam chromintam pusgaminiui, pagamintam krastui, cheminėms medžiagoms;
2 - vežimėlis; 3 - drėgmės nuspaudimo mašina; 4 - atliekos; 5 - drožimo mašina; 6 - svarstyklės pusgaminiui; 6a - svarstyklės cheminėms medžiagoms; 7 - vandentiekis; 8 - vandens kiekio reguliatorius; 9 - piltuvas reagentams; 10 - būgnas; 11 - lyginimo mašina; 12 - vakuuminė džiovykla.

Išvados

1. Fermentinių preparatų aktyvumas priklauso nuo terpės pH ir temperatūros ir tirtiems fermentiniams preparatams optimalių temperatūrų ir pH vertės buvo labai skirtingos: Zime SB Extra Conc. ir Zime SB Conc. aktyviausi buvo kai pH buvo ~7 pH. Fermentinių preparatų Vilzim PRO N ir Mystozyme 2000 LC didžiausias aktyvumas buvo prie pH 11–12. Rūgštinėje aplinkoje didžiausiu aktyvumu pasižymėjo Mystozyme ABL new fermentinis preparatas.
2. Nustatyta, kad dedant fermentinius priedus neutralizavimo metu ir naudojant didesnes koncentracijas suvirimo temperatūra pakilo 2 °C. Vykdamt papildomą fermentinį apdorojimą po neutralizavimo 1,5 val su Mystozyme ABL new preparatu suvirimo temperatūra padidėjo 4 °C, bet apdorojant 3 valandas temperatūra pakilo tik 2 °C, fermento koncentracija įtakos neturėjo. Papildomai apdorojant su Zime SB Extra Conc. 1,5 val suvirimo temperatūra pakilo tik 1 °C, o kai veikiama buvo 3 val – 3 °C. Vertinant fizikinių ir mechaninių savybių priklausomybę nustatyta, kad fermentinis apdorojimas turėjo neigiamos įtakos chrominto pusgaminio stiprio savybėms, stipris tempiant sumažėjo 4,3 N / mm², lyginant su kontroliniu bandiniu, kurio neutralizavimas vykdytas taikant įprastinį metodą.
3. Dedant 5% koncentracijos FP neutralizavimo metu, apdorojimo tirpaluose randama 2 kartus daugiau kolageninių baltymų nei jų nenaudojant, o atliekant papildomą fermentinį apdorojimą po neutralizavimo kolageninių baltymų yra pašalinama dar daugiau nei apdorojant FP neutralizavimo metu. Naudojant Zime SB Extra Conc. preparatą papildomai apdorojant 3 valandas kolageninių baltymų pašalinama net 10 kartų daugiau nei nenaudojant FP.
4. Įriebinto ir dažyto pusgaminio, kuris buvo papildomai apdorojamas fermentiniu preparatu dažų įsiskverbimas buvo pranašesnis nei nenaudojant priedų ar juos dedant neutralizavimo metu. Apdorojimas fermentais neutralizavimo metu neturėjo įtakos prijungtų riebinančių medžiagų kiekiui.
5. Naudojant fermentinius priedus neutralizavimo metu, po šlapios apdailos procesų pagerėjo odos termostabilumo savybės, suvirimo temperatūra pakilo 2 °C tiek naudojant fermentinius priedus neutralizavime, tiek papildomai apdorojant 1,5 val. Fizikinės ir mechaninės savybės po šlapios apdailos procesų taip pat pagerėjo, šie procesai eliminavo fermentų neigiamą įtaką ir atsparumas tempimui padidėjo 2,32 N / mm².
6. Remiantis infraraudonosios spektroskopijos analizės rezultatais, galima teigti, kad fermentinis apdorojimas nei vienu būdu neturėjo įtakos kolageno supermolekulinei struktūrai – gauti spektrai buvo beveik identiški. Antra vertus, termogravimetrinė analizė parodė ženklų terminio atsparumo aukštais temperatūrai sumažėjimą.

Literatūros sarašas

1. Y. KHAMBHATY, "Applications of enzymes in leather processing," *Environmental Chemistry Letters* vol. 18, pp. 747–769, 2020, doi: 10.1007/s10311-020-00971-5.
2. R. B. CHOUDHARY, A. K. JANA, and M. K. JHA, "Enzyme technology applications in leather processing," *IJCT Vol.11(5) [September 2004]*, vol. 11, pp. 659–671, 2004, Available: <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/9527>.
3. N. H. NICOL, "Anatomy and physiology of the skin.," *Dermatol. Nurs.*, vol. 17, no. 1, p. 62, 2005, doi: 10.4324/9780203450505_chapter_1.
4. J. E. LAI-CHEONG and J. A. MCGRATH, "Structure and function of skin, hair and nails," *Med. (United Kingdom)*, vol. 49, no. 6, pp. 337–342, 2005 Jun. 20, doi: 10.1016/j.mpmed.2021.03.001.
5. K. L. CAMPBELL and C. A. LICHTENSTEIGER, "Structure and Function of The Skin," *Small Anim. Dermatology Secrets*, pp. 1–9, 2003, doi: 10.1016/B978-.
6. L. M. MIKESH, L. R. ARAMADHAKA, C. MOSKALUK, P. ZIGRINO, C. MAUCH, and J. W. FOX, "Proteomic anatomy of human skin," *J. Proteomics*, vol. 84, pp. 190–200, 2013, doi: 10.1016/j.jprot.2013.03.019.
7. R. P. J. B. WELLER, J. A. A. HUNTER, J. A. SAVIN, and M. V. DAHL, "The Function and Structure of the Skin," *Clin. Dermatology*, pp. 10–33, 2009, doi: 10.1002/9781444300086.ch2.
8. S. HASHMI and M. PETER MARINKOVICH, "Molecular organization of the basement membrane zone," *Clinics in Dermatology*, vol. 29, pp. 398-411, 2011, doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.009.
9. F. M. WATT and H. FUJIWARA, "Cell-Extracellular Matrix Interactions in Normal and Diseased Skin," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 4, p. a005124, Apr. 2011, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A005124.
10. P. FRATZL, "Collagen: Structure and mechanics," *Collagen Struct. Mech.*, pp. 1–506, 2008, doi: 10.1007/978-0-387-73906-9.
11. M. VAN DER REST AND R. GARRONE, "Collagen family of proteins," *The FASEB Journal*, pp. 2814-2823, vol. 5, no. 13., 1991.
12. S. RICARD-BLUM, "The Collagen Family," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–19, 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004978.
13. M. G. PATINO, M. E. NEIDERS, S. ANDREANA, B. NOBLE, and R. E. COHEN, "Collagen : An Overview," pp. 280–285, doi: 10.1097/01.ID.0000019547.50849.3B.
14. P. BORNSTEIN, "The biosynthesis of collagen.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 43, no. August 1973, pp. 567–603, 1974, doi: 10.1146/annurev.bi.43.070174.003031.

15. E. VUORIO and B. DE CROMBRUGGHE, “The family of collagen genes,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 59, pp. 837–872, 1990, doi: 10.1146/annurev.bi.59.070190.004201.
16. D. J. HULMES, T. J. WESS, D. J. PROCKOP, and P. FRATZL, “Radial packing, order, and disorder in collagen fibrils,” *Biophys. J.*, vol. 68, no. 5, pp. 1661–1670, 1995, doi: 10.1016/S0006-3495(95)80391-7.
17. K. H. STENZEL, T. MIYATA, and A. L. RUBIN, “Collagen as a biomaterial,” *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, vol. 3, pp. 231–253, 1974, doi: 10.1146/ann.
18. S. ZEKRI, “Synthesis and characterization of interfaces between naturally derived and synthetic nanostructures for biomedical applications,” *ProQuest Dissertations and Theses.*, 2007 ISBN: 9780549356189.
19. G. C. WOOD, “Study of the kinetics of this reconstitution (Gross,” *Biochem. J.*, vol. 84, pp. 429-435., 1962. [žiūrėta 2023-04-22].
20. J. M. CAVES, E. CHAIKOF, A. YOGANATHAN, M. ALLEN, M. LEVENSTON, and L. MCINTIRE, “Architecturally defined scaffolds from synthetic collagen and elastin analogues for the fabrication of bioengineered tissues,” *Mechanical Engineering*, 2008.
21. K.PANDURANGA RAO, Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 7(7), 623–645, doi: 10.1163/156856295x00526.
22. R. TIMPL, “Antibodies to collagens and procollagens,” *Methods Enzymol.*, vol. 82, no. C, pp. 472–498, Jan. 1982, doi: 10.1016/0076-6879(82)82079-X.
23. J. A. KIRRANE, W. VAN, and B. ROBERTSON, “The Antigenicity of Native and Tyrosylated Neutral-Salt-Soluble Rat Collagen,” *Immunology*, vol. 14, p. 139, 1968.
24. M. J. HASAN, P. HAQUE, and M. M. RAHMAN, “Protease enzyme based cleaner leather processing: A review,” *J. Clean. Prod.*, vol. 365, no. December 2021, p. 132826, 2022, doi: 10.1016/j.jclepro.2022.132826.
25. P. SARAVANAN, T. SHINY RENITHA, M. K. GOWTHAMAN, and N. R. KAMINI, “Understanding the chemical free enzyme based cleaner unhairing process in leather manufacturing,” *J. Clean. Prod.*, vol. 79, pp. 258–264, 2014, doi: 10.1016/j.jclepro.2014.05.022.
26. J. MA, X. HOU, D. GAO, B. LV, and J. ZHANG, “Greener approach to efficient leather soaking process: Role of enzymes and their synergistic effect,” *J. Clean. Prod.*, vol. 78, pp. 226–232, 2014, doi: 10.1016/j.jclepro.2014.04.058.
27. R. ARAVINDHAN, S. SARAVANABHAVAN, P. THANIKAIVELAN, J. R. RAO, and B. U. NAIR, “A chemo-enzymatic pathway leads towards zero discharge tanning,” *J. Clean. Prod.*, vol. 15, no. 13–14, pp. 1217–1227, 2007, doi: 10.1016/j.jclepro.2006.07.010.
28. A. AFSAR and F. CETINKAYA, “Studies on the degreasing of skin by using enzyme in liming process,” *Indian J. Chem. Technol.*, vol. 15, no. 5, pp. 507-510, ISSN: 0971457X.

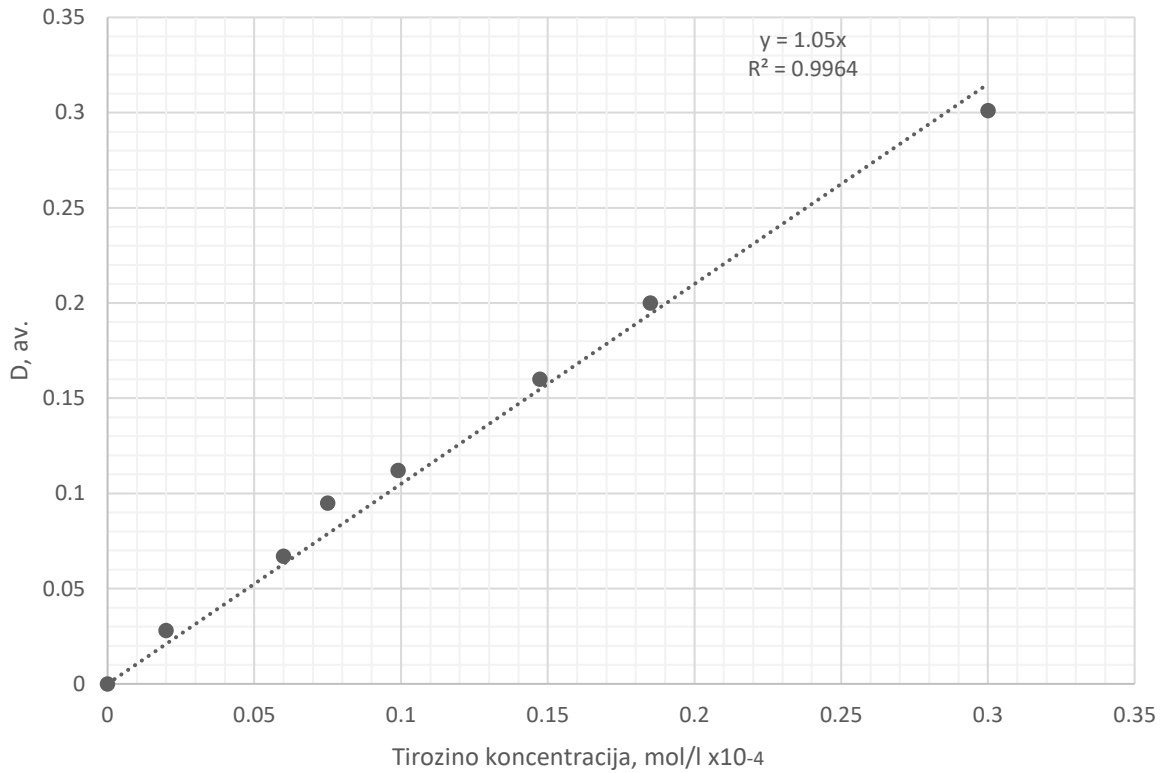
29. P. THANIKAIVELAN, J. R. RAO, B. U. NAIR, and T. RAMASAMI, "Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing," *Trends Bio*, vol. 22, no. 4, pp. 181-188, doi: 10.1016/J.TIBTECH.2004.02.008.
30. V. SIVAKUMAR, "Towards environmental protection and process safety in leather processing – A comprehensive analysis and review," *Process Safety and Environmental Protection*, vol. 163, pp. 703-726, doi: 10.1016/J.PSEP.2022.05.062.
31. H. OGINO, T. OTSUBO, and H. ISHIKAWA, "Screening, purification, and characterization of a leather-degrading protease," *Biochem. Eng. J.*, vol. 38, no. 2, pp. 234-240, doi: 10.1016/J.BEJ.2007.07.008.
32. P. KUMAR Assistant Professor, S. Sharma Associate Professor, P. Kumar, and S. Sharma, "Impact Factor: 5.2 IJAR," vol. 2, no. 6, pp. 337–341, 2016, Accessed: May 11, 2023. [Online]. Prieiga: www.allresearchjournal.com.
33. S. EGUSA, T. KITAOKA, K. IGARASHI, M. SAMEJIMA, M. GOTO, and H. WARIISHI, "Preparation and enzymatic behavior of surfactant-enveloped enzymes for glycosynthesis in nonaqueous aprotic media," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 67, no. 3–4, pp. 225–230, Dec. 2010, doi: 10.1016/J.MOLCATB.2010.08.010.
34. V. MURALIDHARAN, S. PALANIVEL, and M. BALARAMAN, "Turning problem into possibility: A comprehensive review on leather solid waste intra-valorization attempts for leather processing", *Journal of Cleaner Production*, vol.367, 2022, doi: 10.1016/J.JCLEPRO.2022.133021.
35. P. THANIKAIVELAN, J. R. RAO, B. U. NAIR, and T. RAMASAMI, "Recent Trends in Leather Making: Processes, Problems, and Pathways," <https://doi.org/10.1080/10643380590521436>, vol. 35, no. 1, pp. 37–79, 2007, doi: 10.1080/10643380590521436.
36. D. W. NAZER, R. M. AL-SA'ED, and M. A. SIEBEL, "Reducing the environmental impact of the unhairing-liming process in the leather tanning industry," *J. Clean. Prod.*, vol. 14, no. 1, pp. 65–74, 2006, doi: 10.1016/J.JCLEPRO.2005.04.002.
37. C. LIU, X. CHEN, Y. ZENG, and B. SHI, "Effect of the surface charge of the acid protease on leather bating performance," *Process Biochem.*, vol. 121, pp. 330–338, Oct. 2022, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2022.07.023.
38. A. GANESH KUMAR, S. SWARNALATHA, B. SAIRAM, and G. SEKARAN, "Production of alkaline protease by *Pseudomonas aeruginosa* using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries", vol. 99, no. 6, pp. 1939-1944, 2008, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2007.03.025.
39. Y. SONG, S. WU, Q. YANG, H. LIU, Y. ZENG, and B. SHI, "Factors affecting mass transfer of protease in pelt during enzymatic bating process," *Journal of Leather Science and Engineering*, vol. 1, no1, pp. 1-10, 2019, doi: 10.1186/S42825-019-0007-7/FIGURES/9.

40. K. BELEŠKA, J. ŠIRVAITYTĖ, V. VALEIKA, and V. VALEIKIENĖ, “Bating of pelts after delimiting with peracetic acid,” *Proc. Est. Acad. Sci. Chem.*, vol. 55, no. 2, pp. 93, 2006, doi: 10.3176/chem.2006.2.06.
41. A. M. THAYER, “Enzymes at work,” *Chem. Eng. News*, vol. 84, no. 33, pp. 15–25, 2006, doi: 10.1021/cen-v084n033.p015.
42. X. ZHANG, M. GAO, S. A. CHATTHA, Y. ZHU, B. PENG, and Y. YE, “Application of acidic protease in the pickling to simplify the pelt bating process,” *J. Leather Sci. Eng.*, vol. 3, no. 1, 2021, doi: 10.1186/s42825-021-00068-x.
43. L. JIA, J. MA, D. GAO, B. LYU, and J. ZHANG, “Application of an amphoteric polymer for leather pickling to obtain a less total dissolved solids residual process“, vol. 139, pp. 788-795, 2016, doi: 10.1016/j.jclepro.2016.08.097.
44. R. Biškauskaitė, V. Valeikienė, and V. VALEIKA, “Enzymes for Leather Processing: Effect on Pickling and Chroming,” *Mater. 2021*, Vol. 14, Page 1480, vol. 14, no. 6, p. 1480, Mar. 2021, doi: 10.3390/MA14061480.
45. X. ZHANG, X. ZHONG, M. GAO, B. PENG, and C. ZHANG, “Enzymatic Bating Technology for Wet Blue: II. The Basic Properties and Application Effectiveness of Typical Acidic Proteases,” *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, vol. 115, no. 12, pp. 444–453, Dec. 2020, doi: 10.34314/JALCA.V115I12.4202.
46. X. ZHANG, S. A. CHATTHA, J. SONG, C. ZHANG, and B. PENG, “An integrated pickling-bating technology for reducing ammonia-nitrogen and chloride pollution in leather manufacturing,” *J. Clean. Prod.*, vol. 375, p. 134070, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.JCLEPRO.2022.134070.
47. SENTHILVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; MANDAL, A. B. „Application of enzymes for dehairing of skins: cleaner leather processing. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 2012, 14(5), 889-897. ISSN 1618-954X.
48. F. R. DE SOUZA and M. GUTTERRES, “Application of enzymes in leather processing: A comparison between chemical and coenzymatic processes,” *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 29, no. 3, pp. 473–481, 2012, doi: 10.1590/S0104-66322012000300004.
49. GOST 20264.2-88. Enzyme preparations. Methods for determination of proteolytic activity [interaktyvus]. [žiūrėta 2023-04-25]. Prieiga: <http://docs.cntd.ru/document/1200023426>.
50. ZAIDES, A., MIKHAILOV, A. and PUSHENKO O., Modiphitsirovaniy method opredeleniya oksiprolina. *Biokhimiya*. No. 1, 5 (1964). (In Russian).
51. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION [ISO 3380:2015]. *Leather. Physical and mechanical tests. Determination of shrinkage temperature up to 100 °C*.
52. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST EN ISO 5398-1:2018]. Oda. *Cheminis chromo oksido kiekio nustatymas. 1 dalis. Kiekybinis įvertinimas titravimo būdu (ISO 5398-1:2018) = Leather - Chemical determination of chromic oxide content - Part 1: 53*

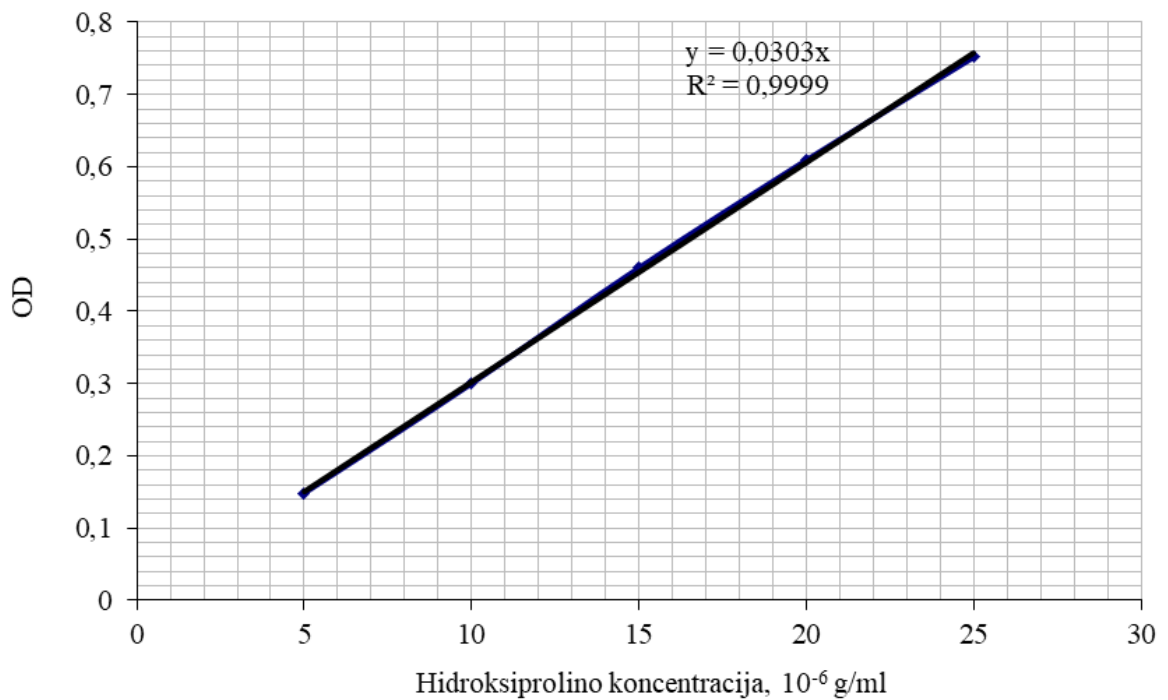
Quantification by titration: Europos standartas EN ISO 5398-1:2 turi Lietuvos standarto statusą. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2018.

53. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS [LST EN ISO 3376:2020]. Oda. *Fizikiniai ir mechaniniai bandymai. Tempimo stiprio ir procentinės ištiesos nustatymas (ISO 3376:2020)= Leather - Physical and mechanical tests - Determination of tensile strength and percentage extension: Europos standartas EN ISO 3376:2020 2020 turi Lietuvos standarto statusą.* Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2020.
54. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS [LST EN ISO 4045:2018]. Oda. *Cheminiai tyrimai. pH nustatymas (ISO 4045:2018) Europos standartas EN ISO 4045:2018 turi Lietuvos standarto statusą.* Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2018.
55. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS [LST EN ISO 14268:2023]. Oda. *Fizikiniai ir mechaniniai bandymai. Pralaidumo vandens garams nustatymas (ISO 14268:2023)= Leather - Physical and mechanical tests – Irrigation techniques – Meters for irrigation water: Europos standartas EN ISO 14268:2023 2023 turi Lietuvos standarto statusą.* Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2023.
56. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS [LST EN ISO 4684:2006]. Oda. *Cheminiai tyrimai. Lakiųjų medžiagų nustatymas (ISO 4684:2006) Europos standartas EN ISO 4684:2006 turi Lietuvos standarto statusą.* Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2006.
57. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS [LST EN ISO 4048:2018]. Oda. *Cheminiai bandymai. Dichlormetane tirpios medžiagos ir laisvųjų riebalų rūgščių kiekio nustatymas (ISO 4048:2018) turi Lietuvos standarto statusą.* Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2018.
58. LIU, Ji-da and Chang BIAN. Thermogravimetric Analysis of Arson Evidence. *Procedia Engineering* [interaktyvus]. 2018, vol. 211, p. 456–462 [žiūrėta 2019 m. balandžio 20 d.]. ISSN 1877-7058. Prieiga per: doi: 10.1016/J.PROENG.2017.12.036.
59. “The CIELAB color space diagram. The CIELAB, or CIE L* a* b*, color... | Download Scientific Diagram.” https://www.researchgate.net/figure/The-CIELAB-color-space-diagram-The-CIELAB-or-CIE-L-a-b-color-system-represents_fig1_338303610 (žiūrėta 2023-04-29).

Priedai



1 pav. Gradavimo tiesė tirozino ekvivalentui



2 pav. Gradavimo tiesė hidroksiprolino ekvivalentui