

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA TEXTILNÍ



Irena Horská

**Enzymatické biotechnologie pro úpravu vláken ovčí vlny.
Struktura vlákna a nové histochemické poznatky.**

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Název disertační práce: **ENZYMATICKÉ BIOTECHNOLOGIE PRO
ÚPRAVU VLÁKEN OVČÍ VLNY.
STRUKTURA VLÁKNA A NOVÉ
HISTOCHEMICKÉ POZNATKY.**

Autor: **Irena Horská**

Obor doktorského studia: textilní technika

Forma studia: kombinovaná

Školící pracoviště: KTC TU v Liberci

Školitel: Doc. Ing. Miroslav Prášil, CSc.

Školitel specialista: -----

Liberec 2006

1. Předmět práce, přehled současného stavu řešené problematiky

V současné globální ekonomice a průmyslu je v technologické předúpravě vlny používáno především tzv. chlorování [1, 2, 3].

Základní chemikálií je chlornan sodný (NaClO). Pomocí této agresivní látky jsou u vláken nativní vlny "zaobleny" marginální struktury, tzv. šupiny primárního vlněného vlákna. Výsledkem této operace je zvýšení afinity vláken k barvivům a k tisku, dále pak dosažení nesrážlivé úpravy vlny [10]. Vzpomenuté chlorovací procesy, včetně všech svých technologických variant, velmi vážně ohrožují a zatěžují životní prostředí svými odpadními rezidui.

Z výše i následně uvedených faktů plyne, že k zušlechtění vlny je možno využít bakteriální proteolytické enzymy a to **formou limitované, tedy celkově nedestruktivní, proteolýzy**.

Celý uvedený systém je po metabolicko-enzymatické linii velmi málo popsán. Je však evidentní, že parciální enzymatické reakce tohoto systému by bylo možné s velkou výhodou průmyslově využít v rámci biotechnologických, tj. plně ekologických zušlechťovacích procesů úpravy vlny či jiných živočišných proteinových vláken.

Výzkum využití enzymů k ekologicky únosnému zušlechtění vlny probíhá teprve od počátku devadesátých let minulého století. Odborná literatura, v tomto směru, uvádí řadu zajímavých výsledků [8 - 16].

Citované práce však často nerespektují biologickou podstatu enzymů i celého problému.

V poslední době se objevuje řada odborných odkazů o variabilitě keratinových makromolekul ovčích vlněných vláken. Jsou popisovány rozdíly v sumárním složení těchto izotypů i v jejich molekulárních konformacích (v základě alfa, beta a gama kreatin) [41].

O existenci jiných pojivových proteinů ovčího vlněného vlákna však literatura zcela mlčí. Jak v této práci bude uvedeno dále, přítomnost těchto pojivových proteinů významně modifikuje fyzikálně chemické vlastnosti vlny.

Jak již několikrát bylo zmíněno, v posledních přibližně 15-ti letech se rozvíjí pokusy využít v zušlechťovacích procesech vlny enzymy. Prací na toto téma jsou desítky. Publikované studie však nelze vzájemně a kriticky hodnotit, neboť použitými aktivními činidly nejsou exaktně klasifikované enzymy dle mezinárodního EC systému, ale komerčně vyráběné a patentově chráněné enzymatické směsi o neznámém složení. Naprostá většina publikovaných enzymatických technologií je doplněna o preenzymatickou oxidaci pomocí peroxidu vodíku. Smysl toho kroku není opět nikde vysvětlen. Tato stručně uvedená polemika má upozornit na vědecky neúnosnou heterogenitu dostupných informací v této oblasti [17, 18, 19].

2. Cíl práce

Cílem disertační práce je řešení problémů na několika úrovních.

1. Z řady již publikovaných prací (viz. výše) je evidentní, že k průmyslovému zpracování (zušlechtění) vlny je možno využít proteolytické enzymy formou limitované, tedy celkově nedestruktivní, proteolýzy. Je tomu tak proto, neboť ovčí vlákno je primárně proteinovou strukturou složenou převážně z několika forem keratinu a dále z extrakeratinozních proteinových komponent. Enzymatická keratinová proteolýza je popsána velmi obecně, exaktní biochemický proces není znám. Jediným metodickým přístupem je proto testování rostlinných, živočišných a bakteriálních proteáz za kritických podmínek, následná analýza reakčních štěpů a morfološko-histochemická detekce mikroskopických změn vlákna. To vše v komparaci se změnami textilních vlastností vláken a tkanin.
2. K výběru vhodných, ekonomicky i ekologicky únosných enzymatických přístupů je nutné věnovat pozornost i vlastní ultrastruktúře a histochemii ovčího vlákna. Zejména je nutné jednoznačně prokázat existenci či neexistenci jiných pojivových proteinových

struktur, než je kreatin, které mohou významně ovlivnit užité vlastnosti vlněného vlákna.

3. Součástí práce je i izolace mikroorganismů surového ovčího rouna a popis jejich základních vlastností s ohledem na možnou produkci průmyslově použitelných keratino a elastolytických proteáz. Konečně se předložená disertační práce dotkne i možných hormonálních účinků (prekurzory eikosanoidů) ovčího rouna na metabolismus lidské pokožky (granulační a epitelizační procesy v hojení ran). Tento aspekt je řešen ve spolupráci s LDN Krajské nemocnice Liberec.
4. Posledním výstupem této rozsáhlé studie je vyhodnocení enzymaticky zpracované vlněné tkaniny, která byla hodnocena systémem KES-FB navrženým prof. Kawabatou. Tímto systémem byl vyhodnocen objektivní omak upravené tkaniny, která byla porovnávána se standardně používanou úpravou vlny.

Jak již bylo řečeno, práce byla řešena na několika úrovních. Proto pro větší přehlednost celé práce byla každá kapitola členěna na úvod, experimentální část, výsledky z experimentální části a závěr.

3. Použité metody

Pro enzymologické experimenty byly použity vzorky vlny ze středně hrubého plemene ovce, vzniklého zkřížením ovce Merino s hrubosrstým plemenem ovce německé. Rouno bylo stříháno před zimou, k experimentům byly použity vzorky z celého těla (kromě končetin). Zjištěná jemnost vláken činila průměrně 22,2 dtex.

Příprava materiálu – odstranění lanolinu

Z odebrané ovčí vlny byl nejdříve odstraněn lanolin a jiné nečistoty. K tomuto byl použit enzym lipáza o koncentraci 2mg/1ml prací lázně. Teplota prací lázně byla 30 °C a byla po celou dobu udržována v termostatu. Délka pracího procesu byla 10 minut za současné cirkulace lázně.

Vypraná vlna byla opláchnuta v destilované vodě a sušena v termostatu opět při teplotě 30 °C.

3.1. Enzymatická hydrolýza

Pro experimenty byly navažovány vzorky vypraných vlněných vláken o hmotnosti 3g (při standardní laboratorní teplotě a vlhkosti). Vzorky byly inkubovány v roztoku pufru s příslušným enzymem (koncentrace enzymu byla 1mg/1 ml pufru) v termostatu při teplotě 33 °C za současné cirkulace lázně. Objem enzymatického roztoku na 3g vlny činil 50 ml.

Po 60-ti, 90-ti a 120-ti minutách inkubace byly odebírány vzorky vláken pro následné měření pevnosti a tažnosti.

3.2. Stanovení hmotnostních úbytků

Dalším, velmi důležitým faktorem, který byl sledován, byl hmotnostní úbytek vlněných vláken po enzymatické hydrolýze.

Za standardních laboratorních podmínek (vlhkost a teplota) byly naváženy 3g vypraných vlněných vláken. Vlákna byla podrobena příslušné enzymatické hydrolýze. Po 90-ti minutách byla vlákna opláchnuta v příslušném roztoku pufru, potom v destilované vodě a usušena v termostatu při teplotě 30°C. Usušená vlákna byla zvážena a byl stanoven hmotnostní úbytek. Hmotnostní úbytky enzymaticky upravených vláken byly porovnány s chlorovanými vlákny (současný standard) a s neupravenými vlákny.

3.3. Měření pevnosti a tažnosti vláken

Odebrané vzorky (po 60,90 a 120-ti minutách) byly opláchnuty v pufru a v destilované vodě, dále sušeny v termostatu za výše uvedených podmínek.

Usušené vzorky byly trhány na přístrojích Vibrodyn 400 a Vibroskop 400 od firmy Lenzig na KTM FT TUL podle ČSN 80 0200.

Nejdříve byla zjištěna jemnost vláken, potom jejich pevnosti a tažnosti. Získané hodnoty byly zpracovány a jsou uvedeny ve výsledcích.

3.4. Obrazová analýza pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu

Na KTM FT TUL byly zhotoveny snímky enzymaticky upravených vláken vlny pomocí elektronového rastrovacího mikroskopu. Snímky byly hodnoceny a porovnávány opět se standardem, kterým jsou chlorovaná vlněná vlákna.

3.5. Kombinace enzymů

Na základě výsledků z měření pevnosti a tažnosti vláken, na základě hmotnostních úbytků a výsledků obrazové analýzy (elektronový rastrovací mikroskop), dále na základě znalosti o účinku studovaných enzymů bylo stanoveno několik možností kombinace jednotlivých enzymů. Zkoumány byly kombinace dvou a tří enzymů vzájemně. Podmínky enzymatické hydrolýzy zůstaly stejné, jako v experimentech s jednotlivými enzymy. U takto upravených vláken byla měřena opět pevnost a pružnost vláken, hmotnostní úbytky a studovány byly i změny ve struktuře vláken pomocí obrazové analýzy.

3.6. Bakteriologie

1 gram čisté neprané surové ovčí vlny byl intenzivně promícháván 10 min. ve 4 ml fyziologického roztoku. Vzniklá směs byla přefiltrována přes sterilní filtr Whatman (červený pruh). Na filtru se zachytily kromě vlněných vláken i mechanické nečistoty z vlny.

Do čistého filtrátu přešla uvolněná mikroflóra. Neboť bylo možné očekávat, že tato mikroflóra bude tvořena hlavně nepatogenními gram negativními bakteriemi, byla k jejich totální kultivaci zvolena univerzální bakteriologická půda Mekong (poskytnuta Krajskou nemocnicí Liberec). Na povrch této kultivační půdy bylo rozetřeno 50 μ l filtrátu standardní bakteriologickou metodou. Půda byla kultivovaná 24 hodin v termostatu při teplotě 33 °C.

3.7. Morfologie

K průkazu existence **elastinu** v nativních ovčích vlněných vlákech byly použity histologické řezy vlněných smotků. Malé vlněné smotky o průměru cca 5 mm byly vysušeny, zality po prosycení parafinem do paraplastových bločků. Paraplastové bločky byly krájeny na rotačním mikrotomu na řezy o síle 0,5 mikronu. Vzniklé řezy byly přeneseny na podložní mikroskopická skla. Po odparafinování byly na řezech vlněných vláken prováděny histologické a histochemické testy.

3.8. Měření celkového omaku systémem KES-FB

Systém KES – FB navržený profesorem Kawabatou je nejpoužívanějším zařízením pro objektivní hodnocení omaku textilií [40].

Umožňuje objektivně odhadnout celkové pocity většiny lidí při přímém kontaktu s textilií. KES má schopnost nejen předpovídat odezvu smyslů člověka, ale také poskytuje možnost pochopení toho, jak je rozdílná struktura vlákna, příze, tkaniny a nakonec přispívá k vnímání jemnosti tkanin.

KES se skládá ze čtyř přístrojů FB 1 - 4 a testuje patnáct základních charakteristických vlastností plošných textilií s rozdělením do šesti skupin: tahové, smykové, ohybové, kompresní, povrchové konstrukční.

Princip tohoto systému spočívá v naměření mechanických vlastností, které odpovídají základním deformacím textilie při manipulaci s nimi. Všechna měření jsou prováděna ve směru osnovních a útkových nití textilie

Každé měření probíhá takovým zatížením, které odpovídá malé deformaci, podobně jako „ohmatání“ u subjektivního hodnocení omaku.

Vlastní automatizovaný měřicí systém je složen ze 4 přístrojů:

KES – FB 1 – pro měření tahu a smyku

KES - FB 2 – pro měření ohybu

KES - FB 3 – pro měření tlaku

KES - FB 4 – pro měření povrchových vlastností

4. Přehled dosažených výsledků

4.1. Výsledky hmotnostních úbytků

Výsledky hmotnostních úbytků vlny po enzymatické hydrolýze jsou zobrazeny v následující tabulce. Je zde uvedeno pH pufru, ve kterém enzymatická hydrolýza probíhala. Jak již bylo uvedeno, tyto hmotnostní úbytky byly stanoveny po 90 minutách enzymatické hydrolýzy

Název enzymu nebo zdroje enzymu	pH	Aktivátor	Úbytek hmotnosti v %
NaClO	4, 0	-	7,02
Aspergillus saitoi	4, 5	-	9, 11
Esteráza	7, 2	-	6, 64
Bromelain	7, 2	-	3, 34
Trypsin	7, 2	CaCl ₂	4, 49
Chymotrypsin	7, 2	-	8, 80
Bacillus polymyxa	7, 2	-	8,79
Streptomyces griseus	7, 2	-	8, 85
Proteáza z pankreatu	7, 2	-	5, 67
Aspergillus oryzae	7, 2	-	7, 23
Collagenáza	7, 2	-	6, 67
Elastáza	7, 2	-	4,65
Tritirachium album	7, 2	-	8,56

Pozn. U názvů bakterií v tabulce se jedná o použití proteázy produkované danou bakterií.

Tab.- č. 1: Hmotnostní úbytky po enzymatické hydrolýze

4.2. Hodnocení hmotnostních úbytků po enzymatické digesci

Přijatelný hmotnostní úbytek pro vlněná vlákna je 7 – 9% [2, 3]. Nad tuto hodnotu se prudce k horšímu mění pevnost a tažnost vláken.

Na vlněném substrátu bylo testováno 12 enzymů, nejdříve samostatně, následně v kombinacích a byly porovnávány se standardem, tj. úpravou chlornanem sodným (NaClO), čili se současnou úpravárenskou technologií.

Hmotnostní úbytek po hydrolyze proteázou z *Aspergillus saitoi* byl po 90-ti minutách největší- 9,11%. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo s použitím dalších bakteriálních proteáz. *Bacillus polymyxa* – 8,79%, *Streptomyces griseus* – 8,85%, *Tritirachium album* – 8,56% a u živočišné proteázy chymotrypsin je hmotnostní úbytek 8,8%.

Naopak nejnižších hmotnostních úbytků bylo dosaženo při použití rostlinné proteázy bromelainu – 3,34% a živočišné proteázy trypsinu – 4,49%. U enzymu elastázy byl hmotnostní úbytek – 4,65%.

4.3. Výsledky pevnosti a tažnosti enzymaticky upravených vláken

Průměrné hodnoty pevnosti a tažnosti jsou uvedeny v následující tabulce. Čas, který je uveden u každé položky, znázorňuje celkovou dobu inkubace.

Výsledné hodnoty jsou pro přehlednost vyneseny do níže uvedených grafů.

Vzorek	Tažnost %	Pevnost(CN/te x)
Neupravená vlna	40,2	14,86
NaClO 60 min	34,2	14,12
NaClO 90 min	34,9	14,06
NaClO 120 min	31,2	13,94
<i>Aspergillus saitoi</i> 60 min	40,2	15,97
<i>Aspergillus saitoi</i> 90 min	37,7	16,2
<i>Aspergillus saitoi</i> 120 min	47,7	18,29
Esteráza 60 min	42,4	17,23
Esteráza 90 min	43,1	17,03
Esteráza 120 min	41,7	16,03
Bromelain 60 min	34	14,93
Bromelain 90 min	41,5	15,97
Bromelain 120 min	45,3	16,19
Trypsin 60 min	38,4	16,47
Trypsin 90 min	37,5	16,42
Trypsin 120 min	37,5	16,86
Chymotrypsin 60 min	41	15,81
Chymotrypsin 90 min	40,2	16,92
Chymotrypsin 120 min	34,4	15,55
<i>Bacillus polymyxa</i> 60 min	39,9	16,52
<i>Bacillus polymyxa</i> 90 min	39,7	16,22
<i>Bacillus polymyxa</i> 120 min	33,9	14,62
<i>Streptomyces griseus</i> 60 min	33,2	14,04
<i>Streptomyces griseus</i> 90 min	35	15,3
<i>Streptomyces griseus</i> 120 min	37,7	15,82
Proteáza z pankreatu 60 min	35,7	15,57
Proteáza z pankreatu 90 min	35,7	15,98
Proteáza z pankreatu 120 min	37,2	15,86

Aspergillus oryzae 60 min	26	14,14
Aspergillus oryzae 90 min	32,4	14,58
Aspergillus oryzae 120 min	38,6	16,13
Colagenáza 60 min	31,4	14,25
Colagenáza 90 min	34,4	14,95
Colagenáza 120 min	36,2	14,85
Elastáza 60 min	33,8	14,75
Elastáza 90 min	35,3	15,36
Elastáza 120 min	40,8	15,87
Tritirachium album 60 min	27,4	13,69
Tritirachium album 90 min	28,3	14,25
Tritirachium album 120 min	31,7	14,6

Tab. č. 2: Hodnoty tažnosti a pevnosti testovaných vláken

V disertační práci jsou výše uvedené hodnoty tažnosti a pevnosti vláken vyhodnoceny graficky.

Výsledky **tažnosti** vlněných vláken při kombinacích enzymů (digesce 90 minut)

- a) bromelain + elastáza – 44,1%
- b) bromelain + esteráza + Aspergillus saitoi – 46,1%
- c) chymotrypsin + Bacillus polymyxa – 40,7%

Výsledky **pevnosti** vláken při kombinacích enzymů (digesce 90 minut)

- a) bromelain + elastáza – 17,4 cN/tex
- b) bromelain + esteráza + Aspergillus saitoi – 16,3 cN/tex**
- c) chymotrypsin + Bacillus polymyxa – 17,2 cN/tex

Literatura uvádí [3, 25], že optimální hodnota tažnosti (za sucha) vlněných vláken se má pohybovat mezi 20 – 35%. Pevnost (za sucha) by se měla pohybovat mezi 9 – 18 cN/tex.

Náš standardně upravený vlněný vzorek (pomocí NaClO) po 90 –ti minutách měl tyto hodnoty: tažnost – 34,9% a pevnost – 14,06 cN/tex.

Obecně se v technologické praxi předpokládá, že dojde-li ke ztrátě hmotnosti materiálu, musí této ztrátě odpovídat nižší hodnoty pevnosti a tažnosti. U provedených pokusů se tento předpoklad nepotvrdil, ale nastal jev opačný (viz tabulka č. 2). Příčina tohoto jevu není doposud známá a je proto předurčena k dalšímu výzkumu.

Lze pouze předpokládat, dle známých teoretických poznatků, že heterolyticky štěpené vazby mezi jednotlivými aminokyselinami se částečně přeformovaly do jiných vazeb a v prostoru zaujímaly jinou konfiguraci. Tou hlavní příčinou zvýšení pevnosti a tažnosti vláken vůči standardu je však pravděpodobně přeskupení intra a intermolekulárních vazeb, které úzce souvisí se změnou sekvencí aminokyselin v jednotlivých řetězcích.

Druhou možností vysvětlení tohoto jevu je přítomnost elastinových a eventuálně dalších vláken, které se nacházejí ve vnitřní struktuře vlněného vlákna.

Pro hodnocení výsledků je z tabulky č. 2 rozhodující údaj, který odpovídá enzymatické inkubaci 90 minut (pro porovnání se standardem).

Výrazně nižších hodnot u tažnosti bylo dosaženo u proteázy z Tritirachium album 28,3%. U ostatních použitých enzymů jsou buď hodnoty srovnatelné se standardem, ale většinou ho převyšují.

U pevnosti vláken byla u všech použitých enzymů hodnota pevnosti vláken vyšší, než u standardu. Nejvyšší pevnosti bylo dosaženo u esterázy 17,03 cN/tex, dále u chymotrypsinu 16,92 cN/tex.

4.4. Kombinace enzymů

U kombinace enzymů (viz tabulka č. 3) byla tažnost vláken poměrně vysoká. Nejvyšší hodnoty tj. 46,1% bylo dosaženo u použití trojkombinace enzymů, u kombinace bromelain + elastáza je tažnost 44,1% a chymotrypsin + *Bacillus polymyxa* 40,7%.

Při hodnocení pevnosti vláken u obou dvoj kombinací enzymů je hodnota velice podobná (pohybuje se kolem 17 cN/tex). U troj kombinace se hodnota pevnosti asi o 1 cN/tex snížila v porovnání dvoj kombinace.

Kombinace enzymu	pH	Aktivátor	Organické rozpouštědlo	Úbytek hmotnosti (celkový) v [%]
bromelain + elastáza	7,2(PO ₄ ³⁻)	-	DMF (0,5 ml)	8,18
<i>bromelain + esterasa + Aspergillus saitoi</i>	7,2(PO ₄ ³⁻) pro první dva enzymy pak pH = 4,5 (CH ₃ COO ⁻)	-	DMF (0,5ml)	9,07
α -chymotrypsin + <i>Bacillus polymyxa</i>	7,2(PO ₄ ³⁻)	-	DMF (0,5ml)	6,23

Tab. č.3: Výsledky hmotnostních úbytků při použití kombinace enzymů po 90-ti minutové digesci

Experimenty prokázaly, že vybraná **kombinace** tří enzymů vede zbytečně k velkému hmotnostnímu úbytku (bromelain + esteráza + *Aspergillus saitoi* – 9,67%). Kombinace bromelain + elastáza poskytla hmotnostní úbytek 8,18% a kombinace chymotrypsinu a proteázy z *Bacillus polymyxa* poskytla hmotnostní úbytek 6,23%.

Hmotnostní úbytek při použití posledně uváděných enzymů je přibližně o 2% nižší. K tomuto snížení dochází pravděpodobně na základě soutěže použitých enzymů o substrát. Dochází tak ke steoreotaktickému vzájemnému vytěšňování enzymů [39].

Jde o efekty, které současná teoretická enzymologie registruje, v technologické praxi však tyto efekty nejsou dosud popsány .

4.5. Bakteriologické výsledky ukázaly, že základní a pro nativní ovčí rouno velmi charakteristické bakterie, dokáží plně svou energetickou a proliferační spotřebu krýt štěpením ovčí vlny.

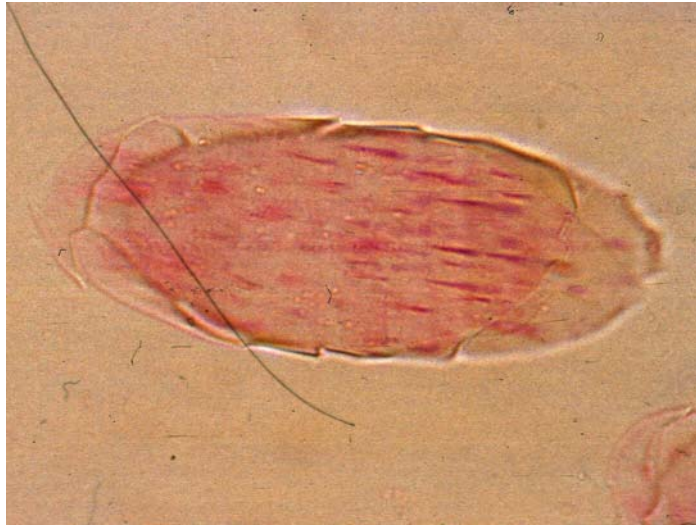
Bylo jednoznačně prokázáno, že všechny testované bakterie produkují příslušné keratolytické, elastolytické a pravděpodobně i jiné proteolytické enzymy.

Pigmenty druhu *Pseudomonas* a *Serratia* mají dále významné antibiotické účinky. Nelze proto odmítnout teorii, že tyto bakterie vytvářejí obranný systém citlivé ovčí pokožky proti bakteriálním infekcím.

Závěrem je třeba konstatovat nutnost pokračování tohoto bakteriologického studia, neboť příslušná selektivní mikroflóra ovčího rouna je schopna plně a pochopitelně zdarma produkovat veškeré specifické proteázy, které jsou nutné k zušlechťovacím biotechnologickým postupům při zpracování ovčí vlny.

4.6. Morfologické výsledky

Zásadní výsledky přinesla **elastinová pozitivita** při použití **orceinové metody** na polopříčných řezech.

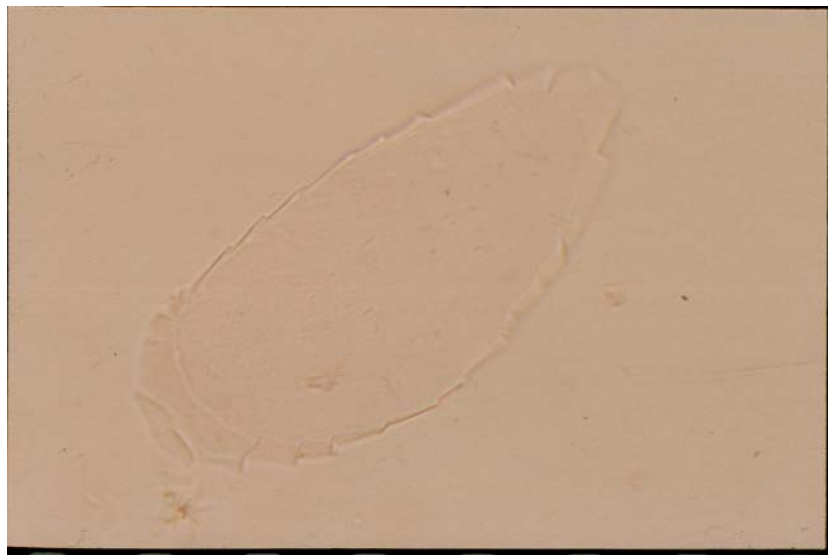


Obr. č. 1 – průkaz elastinu orceinem.

Barevná, červeno-oranžová depozita, mají charakter kratších fragmentárních fibril a postupují vcelku homogenně zastiženou plochou řezu vlákna. Lze těžko identifikovat tyto struktury s konvenčně popisovanými strukturami vlněného vlákna. Lze pouze diskutovat vztah těchto struktur k tzv. mikrofibrilám.

Orceinová metoda je v rámci klasických histologických metod vysoce citlivá pro detekci elastinu [27].

Na řezech exponovaných specifickou elastázou pozitivita těchto elastinových struktur naprosto chybí.



Obr. č. 2 – řez exponovaný elastázou, elastin negativní.

Za neoddiskutovatelné specifické metody jsou v současné době považovány metody imunohistochemické, které jsou založeny na neopakovatelné individuální antigenicitě prokazovaných proteinových struktur. Na rozdíl od orceinového barvení byl v tomto případě imunohistochemický průkaz elastinu **zcela negativní**.

Tento výsledek byl očekáván a velmi náročný imunohistochemický postup byl zvolen spíše z důvodů „alibistických“. Negativita průkazu je dána pochopitelně odlišnou anigenicitou elastinu lidského, proti kterému jsme měli protilátku a elastinu ovčího, proti kterému dosud monoklonální protilátka neexistuje.

4.7. Hodnocení celkového omaku měřeného systémem KES-FB

Celkový omak (THV) je vyjádřen škálou hodnot od 0 do 5, přičemž první hodnota znamená, že omak textilie je nevyhovující, druhá hodnota znamená naopak omak textilie výborný. Po proměření všech výše okomentovaných hodnot, program vybral jako nejvhodnější kategorii pro praktické použití textilie dámskou zimní šatovku.

Vzorek 0 – 1 (pouze vypraná vlna) – **2,38**

Vzorek 0 – 2 (standard – chlorovaná vlněná textilie) – **2,56**

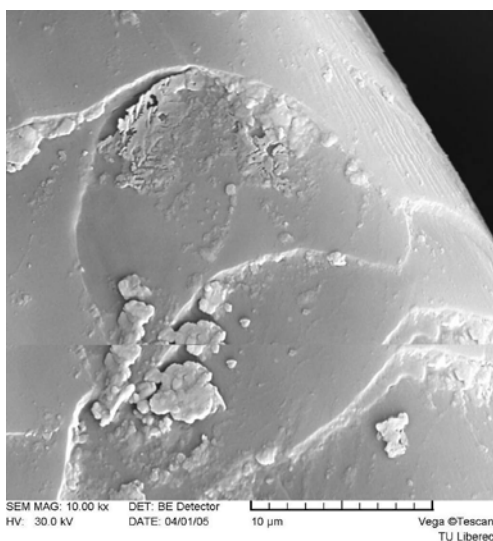
Vzorek 0 – 3 (postupná kombinace enzymů bromelain a esteráza) – **2,75**

Vzorek 0 – 4 (postupná kombinace enzymů elastáza a bromelain) – **2,93**

Z těchto výsledků hodnocení celkového omaku jednoznačně plyne, že vlněné textilie enzymaticky uprané, dosahují lepších výsledků, než standard.

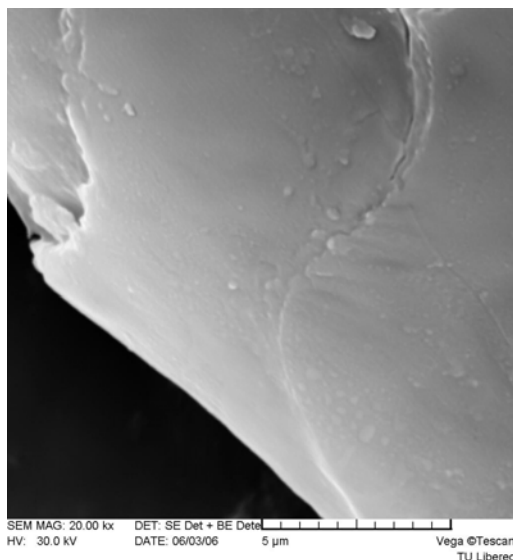
Enzymatická úprava pomocí enzymů elastáza a bromelain vykazuje jednoznačně nejlepší výsledek, neboť hodnota celkového omaku se blíží 3, což je možné hodnotit jako omak velice dobrý.

4.8. Hodnocení snímků z elektronového rastrovacího mikroskopu



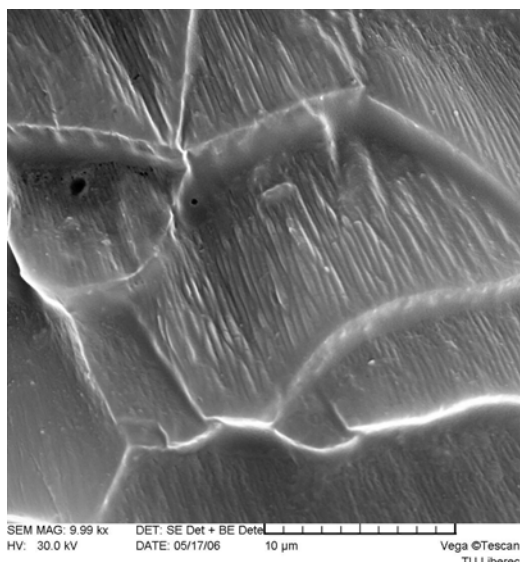
Obr. 3 - **Bromelain**

Snímek demonstruje šetrnou digesti šupin. Šupiny jsou zaoblené, povrch vlákna je téměř hladký. Jde o jiný typ digestce, která je velmi neselektivní. Dochází k univerzálnímu vyhlazování šupin. Morfologicky lze tento typ digestce popsat jako vytváření struktur formy „rozteklého vosku“.



Obr. 4 - **Elastáza**

Snímek demonstruje selektivní schopnost elastázy vytvářet silný efekt tzv. „rozteklého vosku“. Jde o morfologický odraz šetrného povrchového odštěpení určitých komponent v rozsahu celé šupiny.



Obr.5 - Kolagenáza 120 minut

Tento snímek demonstruje selektivní, proteolytický efekt kolagenázy. Nápadné marginální, provazcům podobné, struktury jednotlivých šupin jsou uchovány. Z plochy šupin jsou odštěpeny komponenty dosud neznámého složení a funkce. Jsou tak odhaleny rezistentní vnitřní „žebra“ (lamely), které vytváří vnitřní stroma šupin.

5. Zhodnocení výsledků a nových poznatků

Předložená práce reprezentuje výsledky základního výzkumu mnoha let. Základním úkolem bylo testování řady enzymů pro jejich biotechnologické využití v ekologicky únosných úprav ovčí vlny.

V práci tak musela být řešena řada aspektů.

- 1) Samotná struktura a složení ovčího vlněného vlákna.
- 2) Mikrobiální kolonizace fyziologického, nativního ovčího rouna.
- 3) Účinek proteolytických a esterolytických enzymů na ovčí vlákno.
- 4) Ultrastrukturální změny, které enzymatická digesce vyvolává.
- 5) Technické zhodnocení výsledného omaku enzymaticky upravené vlněné tkaniny.
 - A) Mikrobiologické studie ukázaly existenci poměrně stabilního spektra gram-negativních bakterií, které kultivují nativní ovčí rouno zdravých ovcí. Testy ukázaly, že tyto mikroorganismy jsou schopny produkovat enzymy, které štěpí ovčí vlákno.
 - B) Histologické studium tenkých řezů ovčího vlákna prokázaly existenci proteinu, který má charakter elastinu. Po digesci řezu vlákna elastázou pozitivita elastinu (orceinová reakce) mizí. Jde o průkaz struktur, které dosud nejsou v odborné literatuře dokumentovány.
 - C) Rastrovací elektronová mikroskopie ovčích vláken, podrobených hydrolýze příslušnými enzymy a jejich kombinacemi, ukázala existenci nových struktur povrchových šupin ovčích vláken. Tyto struktury (fotograficky dokumentovány) nejsou dosud v jiné odborné literatuře popsány.
 - D) Efekt „taveného vosku“ (tj. intenzivní modifikace povrchu ovčího vlákna) je způsobena hlavně enzymy bromelainem, elastázou a proteázou z *Aspergillus saitoi*. Efekt „žebrování“ (obnažování vnitřních lamel šupin) byl pozorován

u digesce vlněných vláken trypsinem a především kolagenázou. Morfologicky poskytuje nejlepší výsledky kombinace enzymy bromelainem a elastázou.

E) Nejnižších hmotnostních úbytků bylo dosaženo použitím bromelainu (3,34%), trypsinu (4,49%) a elastázy (4,65%). Nejvyšší hmotnostní úbytek byl zaznamenán po digesce proteázou z *Aspergillus saitoi* (9,11%). Obecně lze konstatovat, že u proteáz bakteriálního původu by bylo proto vhodné snížit dobu inkubace z 90 minut na 60 minut.

F) Hodnoty pevnosti vláken byly nevyšší u esterázy (17,03cN/tex) a u chymotrypsinu (16,92cN/tex). Hodnoty tažnosti u enzymaticky upravených vlněných vláken byly srovnatelné a vyšší, než u standardu (chlorovaná vlna). Z těchto údajů je možné doporučit jako enzymatickou úpravu kombinaci enzymů bromelain a elastáza, kde:

Hmotnostní úbytek byl : 8,18%

Tažnost vláken byla: 44,1%

Pevnost vláken byla: 17,4 cN/tex

Tyto hodnoty jsou technologicky velmi dobré, u pevnosti a tažnosti vláken přesahují technologické požadavky.

G) Měření a výsledky celkového omaku enzymaticky upravené vlněné textilie
Jednoznačně vyplývá, že vlněná tkanina upravená enzymaticky dosahuje lepších výsledků, než standard. Výsledný omak je hodnocen stupnicí od 0 do 5, přičemž hodnota 0 znamená omak nevyhovující, hodnota 5 omak výborný.

Výsledky jsou následující:

Chlorovaná vlněná textilie : 2,56

Enzymaticky upravená vlněná textilie (bromelain a esteráza) : 2,75

Enzymaticky upravená vlněná textilie (elastáza a bromelain) : 2,93

Pro enzymatickou úpravu vlněné tkaniny tak lze doporučit kombinaci enzymů elastázy a bromelainu, kde výsledný omak textilie je hodnocen jako velice dobrý, neboť výsledná hodnota se blíží 3.

6. Práce autora se vztahem ke studované problematice

1. Horská,I., Horský,J.: Enzymatická heterogenita endotelu kapilár. In: *Sborník vědeckých prací ústavů ČAV*. Ročník 5. Liběchov, Fyziologický ústav ČAV, 2002, s. 48-51.
2. Horská,I., Horský,J.: Histochemické metody odstraňování tkáňového melaninu. In: *Sborník vědeckých prací ústavů ČAV*. Ročník 5. Liběchov, Fyziologický ústav ČAV, 2002, s. 89-94.
3. Horská,I., Horský,J.: Možnosti enzym-biotechnologických postupů při zušlechťování ovčí vlny. *Strutex 9*, Liberec, 2002, s. 389-391
4. Horská,I., Moravcová,K., Wiener,J: Enzymatic Modification of Polymers. *Strutex 10*, Liberec, 2003, s.293-300.
5. Horská,I., Horský,J.: Možnosti enzym-histochemické detekce aktivit virově specifických proteáz. In:*Sborník vědeckých prací Virologického ústavu SAV*. Ročník 25. Bratislava, 2003, s.425-432.
6. Horská,I., Wiener,J., Krutská,Š.: Degradation of Textile Fibre by Enzymes. 4th Central European Conference 2005, Fibre-Grade polymers, chemical fibres and special textiles, 7-9 September 2005, Liberec, Book of abstracts, p. 43, ISBN 80-7083-967-8.

7. Horská,I., Benaglia,G.: Enzymatic Aspects of Wool Fibre Finishing. 4th Central European Conference 2005, Fibre-Grade polymers, chemical fibres and special textiles, 7-9 September 2005, Liberec, Book of abstracts, p. 45, ISBN 80-7083-967-8.
8. Horská,I., Wiener,J.: Projekt Magistrátu města Liberec : Enzymatická technologie pro likvidaci textilních odpadů. Liberec, 2005.
9. Horská,I., Benaglia,G.: Could Enzymes be the new Way of Wool Fibre Finishing? 12thinternational conference Strutex, Liberec, 2005, s.245-248.
10. Horská,I., Horský,J.: Léčebné deriváty konopného oleje. In:*Sborník gerontologické společnosti v Praze*. Ročník 45. Ostrava, 2005, s.198-203.
11. Horská, I., Horský, J., Mikuláščík, J.: A New Resultes of the Structures of the Sheep Fleece Fibers (a histochemistry study). *Sborník Strutexu 2006*. (In press).

7. Literatura

1. Felix, V.: Chemická technologie textilní. 1. vyd. Praha: Průmyslové nakladatelství, 1952. s.715 .
2. Glafey, H., Krüger, D., Ulrich, G.: Technologie der wolle. Berlin: Verlag von Jullius Springer, 1938. p.243 .
3. Hladík, V. a kol.: Textilní vlákna. Praha: SNTL, 1970. 299 s.
4. Novoradovskaja, T.C., Sadova, C.F.: Chimija i chimičeskaja tehnologija šersti. Moskva: Izdatel'stvo tehničeskoj literatury, 1986. p.10 – 20.
5. Bullivants, S. et al.: Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy. Berlin Heidelberg, New York: Springer – Verlag, 1973. p. 304. ISBN 3-540-06049-9.
6. Abbas, K.A., Lichtman, H.A.: Cellular and Molecular Immunology. USA: Elsevirer Science, 2003. p. 562. ISBN 0-7216-0008-5.
7. Merle, R.: Paris ma bonne ville libriirie. Paris: Plon, 1980. p. 438.
8. Abdel – Gawad, K.M.: Mycological and Some Phisiological Studies of Keratinophilic and Moulds Associated With Sheeo Wool. Egypt: Botany department Faculty of Science, Assit University, 1997.
9. Allen, R., Budowle, B.: Protein Staining and Identification Techniques, Molecular Laboratory Methods. New Zealand: Eaton Publishing, 1999. p. 139. ISBN 1-881299-08-2.
10. Burrel, D., Mac Diarmid, J.: Characterisation of Isolated of Pseudomonas aeruginosa from Sheep. *Appl Environ Microbial*, New Zaeland , 1984. pp. 345 – 350.
11. Dagan, J., Jovanicic, P., Bertran, E., Petrovic, Z., Navarro, A., Erra, P: Autex, Conference Juli 2002. pp. 299 – 305.
12. Kokrmaz, A., Öktem, T.: Aplication of Protease Enzyme on Wool. Ege University Bornova – Izmir Turkey, 2003. pp. 234 – 239.
13. London, C.J., Griffith, I.P.: Characterization of Pseudomonas Isolated from Diseased Fleece. *Appl Environ Microbiol*, May 1984. pp. 993 – 997.
14. Plowman, J.E., Bryson, W.G., Jordan, T.W.: Aplication of Proteomics for Determining Protein Markers Wool Quality Traits. *Electroforesis*, May 2002. pp. 1899 – 1906.
15. Sidelnik, N.: Enzymatic Biotechnology to Impove Quali of Woolen Woven Fabrics. Institute of Natural Fibre. Poland, 2002.
16. Sidelnik, N.: Use of Biological Agents as Wool Carbonising. Institute of Natural Fibre. Poland, 2003.
17. Riva, A., Cegarra,J. Prieto, R.: The Role of au Enzyme in Reducing Wool Ahrinkage. *JSPC* , vol. 109, June 1993.pp. 311 – 317.

18. Xiao – Wei, J., Wen – Jun, G., Yong – Quan, L., Ting – Jing, G.: A Biological Treatment Techniques for Wool Textile. *Biology and Technology*, vol. 48, September 2005. pp. 665 – 680. ISBN 1516-8913.
19. Cortez, J., Phillip, L.R., Griffin, M.: Application of Transglutaminase in the Modification of Wool Textile. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 34, 2004. pp. 64 – 72.
20. Ferenčík, M., Škárka, B.: *Biochémiá*. 1. vyd. Bratislava: Slovak Academic Press s.r.o., 2000. s.678 . ISBN 80-88908-58-2.
21. Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 1.vyd. Praha: Academia, 1996. s.476 .ISBN 80-200-0438-6.
22. Šilhánová, L.: *Mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Academia, 2002. s.187 . ISBN 80-200-0768-7.
23. Wolf, J.: *Histologie*. 1. vyd. Praha: SZN, 1968.s. 645
24. Kolář, Z.: *Molekulární patologie*. 1.vyd. Olomouc: Epava, 2003, s.567. ISBN 80-86297-15-2.
25. Militký, J.: *Textilní vlákna –klasická a speciální*. Liberec: TUL, 2002. ISBN 80-7083-644-X.
26. Kryštůfek, J., Wiener, J.: *Teorie a technologie barvení*. Skripta FT KTC (In press).
27. Kiernan, J.A.: *Histological and Histochemical Methods*. Oxford: Pergamon Press, 1981. p.344. ISBN 0-08-024935-3.
28. Kalous, V., Pavlíček, Z.: *Biofyzikální chemie*. Praha: SNTL, 1980. s.349 .
29. Vodrážka, Z., Rauch, P., káš, J.: *Enzymologie*. Praha: VŠCHT, 1998. s.171 . ISBN 80-7080-330-4.
30. Moss, G.P.: *Enzyme nomenclature*, by:
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/23/18.html>
31. Knight, C., Dando, G. And Barret, A.J.: *Biochem.J.*, 1995. pp.308 – 309.
32. Barret, A.J.: *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press, 1994. p. 244.
33. Barret, A.J.: *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press, 1995. p. 248.
34. Sayle, R.A. and Milner – White, E.J.: *Trend Biochem.* 1995. p. 374.
35. Rucklidge, G.J. and Milne, G.: *Anal. Biochem.*, vol. 185, 1990. p. 265.
36. Lojda, Z.: *Acta Histochem.*, vol. 98, 1996. p. 215.
37. Voett, D., Voett, J.G.: *Biochemistry*. New York, Chichester: John Wiley and Sons. 1990. p. 1227. ISBN 0-471-61769-5.
38. Gleick, J.: *Chaos*. Brno: Ando Publishing. 1996. s. 340. ISBN 80-86047-04-0.
39. Kotyk, A., Horák, J.: *Enzymatická kinetika*. Praha: Academia, 1977. s. 268.
40. Kawabata, S.: *The Standardization and Analysis og hand Evaluation*. Osaka: Science and Technology Center, 1980.
41. Steinert, P.M. and Marekov, L.L.: *J. Biol. Chem.*, 1995. p. 270.
42. Beynon, R., Bond, J.: *Proteolytic Enzymes*. Oxford: University press, 2001. p. 340. ISBN 0-19-963662-1.
43. Elliot, W.H., Elliot, D.C.: *Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford: University press, 2001. p. 586. ISBN 0-19-870045-8.

8. Souhrn

Předložená mezioborová práce řeší základní otázky enzymatických biotechnologických postupů, které jsou vhodné pro efektivní a ekologické zušlechtění ovčí vlny. Práce přináší řadu nových poznatků o mikrobiologii, histochemii a ultrastruktuře ovčího vlákna. Je jasně dokumentována výhoda enzymatických úprav před chemicko-anorganickými postupy, které se v současnosti stále používají. Byl vypracován enzymatický postup zušlechtění ovčí vlny , dále byl vytipován nejvhodnější enzymatický systém bromelain – elastáza, který přináší ve

všech sledovaných parametrech nejlepší výsledky. Veškeré výsledky jsou detailně diskutovány.

The Summary

This interdisciplinary work solves the basic problems of enzymatic biotechnological procedures which are appropriate for effective and ecological finishing of sheep wool. The work brings new pieces of knowledge about microbiology, histochemistry and wool fibre's ultrastructure. The advantage of enzymatic modification to chemical-anorganic procedures which are still used at present is clearly documented. The enzymatic procedure of wool's finishing has been elaborated then the most appropriate enzymatic system bromelain – elastase has been chosen as the one which brings the best results in all observed parameters. All the results are discussed in details.

Résumé

Le travail interdisciplinaire proposé ci-dessus résout les questions de base des procédures enzymatique bitechnologiques aptes à bonifier la laine de mouton de façon efficace. Ce travail porte un suite de nouvelles connaissances sur la microbiologie, histochimique et sur l'ultrastructure de la fibre de mouton. La préférence des préparations enzymatiques aux procédures chimioinorganiques actuellement employées en permanence est explicitée. Nous avons élaboré la procédure enzymatique de la bonification de la laine de mouton, ensuite nous avons choisi le système bromelain – elastase le plus susceptible de rapporter les meilleurs résultats dans tous les paramètres suivis. Tous le résultats sont discutés en détail.

Vydala Textilní fakulta, Technické univerzity v Liberci
jako interní publikaci pod pořadovým číslem 6/2006
v počtu 20 výtisků