Przegląd metod ekstrakcji kolagenu z odpadów skórzanych

Methods of collagen extraction from leather wastes – a review

Marta Łaczkowska[a*], Dorota Gendaszewska[a], Edyta Grzesiak[b], Magdalena Lasoń-Rydel[c]
[a] Zakład Biotechnologii i Ochrony Środowiska, [b] Zakład Spektroskopii Optycznej, [c] Laboratorium Badań Środowiska, Instytut Przemysłu Skórzanego w Łodzi, ul. Zgierska 73, 91-462 Łódź, *e-mail: m.laczkowska@ips.lodz.pl

Streszczenie

Odpady pochodzące z przemysłu skórzanego stanowią istotne źródło dobrej jakości kolagenu i hydrolizatów kolagenowych, które mają wiele zastosowań w różnych gałęziach przemysłu. Dlatego naukowcy od wielu lat starają się opracować najlepszą metodę ekstrakcji kolagenu, która będzie charakteryzować się dobrą wydajnością i jakością otrzymanego produktu. Niniejsza praca stanowi przegląd najpopularniejszych metod ekstrakcji kolagenu z odpadów skórzanych: metody wysalania, metody kwasowej i alkalicznej oraz metody enzymatycznej.

Summary

Leather industry wastes can be a source of good quality of collagen and its hydrolysate which may find a various practical applications in a raw of industry branches. Therefore scientists for many years trying to develop the best extraction method, which will characterized in good efficiency and quality of product. This publication is a review of the most popular methods of collagen extraction from leather wastes: salting out method, alkaline and acid method and enzyme method.

Słowa kluczowe: hydrolizat kolagenu, metody ekstrakcji, odpady skórzane.
Key words: collagen hydrolysate, methods of extraction, leather wastes.

1. Wprowadzenie

Przemysł skórzany odgrywa szczególną rolę w dzisiejszej globalnej gospodarce. Surowe skóry i obrzynki powstające z przetwórstwa mięsnego trafiają jako surowy materiał do przemysłu skórzanego. W procesie obróbki, skóry są odpowiednio przycinane, co generuje ogromne ilości odpadów stałych [1]. Na każdą tonę surowca produkowane jest aż 50 kg materiałów odpadowych. Rocznie na świecie przetwarzanych jest około 6,5 mln ton skór surowych [2]. W procesie tym generowane jest około 325 tysięcy ton odpadów rocznie. Odpady te, ze względu na swoją szkodliwość, powinny być poddane odpowiedniej obróbce. Stanowi to pewien problem, gdyż garbarnie nie dysponują technologiami unieszkodliwiania czy całkowitego wykorzystania tego rodzaju odpadów. Odpowiednie zagospodarowanie i/lub przekształcanie tych odpadów jest wymagane zgodnie z ideą zrównoważonego rozwoju i wzrostu gospodarczego. Jednakże najważniejszym aspektem jest ochrona przed uwolnieniem się odpadów do środowiska naturalnego. W niektórych krajach (Chiny, Hiszpania) odpady skórzane są wykorzystywane jako surowiec do produkcji klejów, żelatyny, kolagenu, pasz czy nawozów [3].

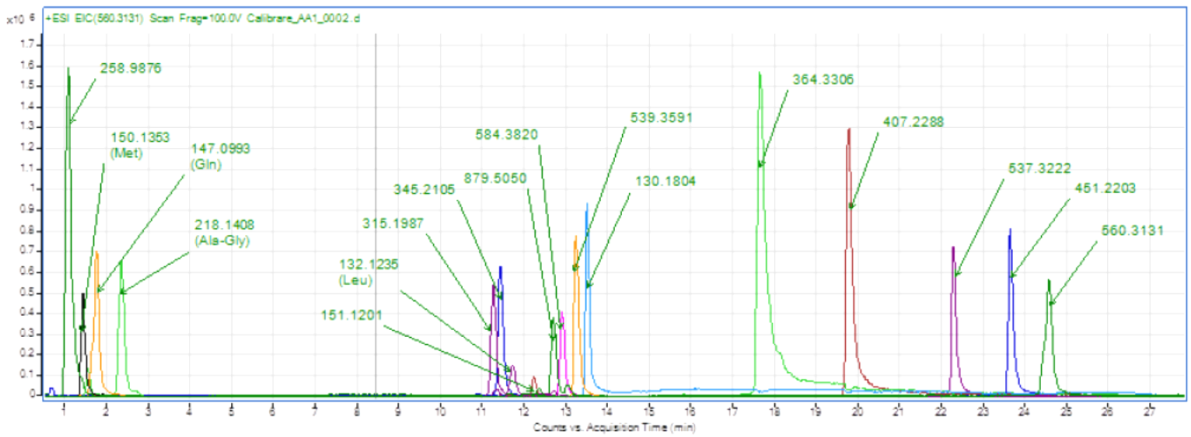
Kolagen jest biopolimerem, będącym składnikiem skóry, kości, chrząstki, ścięgien czy więzadeł zwierząt. Jest to niezwykle ważne białko, które występuje w tkance łącznej i często posiada strukturę sieciową lub włóknistą. W zależności od struktury włókien wyróżnia się nawet 29 typów kolagenu, w tym trzy podstawowe: typ I, typ II oraz typ III. W skórach zwierzęcych typ I jest dominującym typem kolagenu. Wspólnym motywem strukturalnym wszystkich rodzajów jest potrójna helisa złożona z trzech równoległych łańcuchów polipeptydowych zbudowanych z glicyny, proliny i hydroksyproliny (GlyProHyp). Powstanie tej helisy jest możliwe dzięki występowaniu wiązań sieciujących [3]. W białku kolagenowym całkowita zawartość glicyny (20%), proliny i hydroksyproliny (25%) oraz kwasu glutaminowego (11%) nie przekracza 50% [4]. Kolagen poddany łagodnej obróbce cieplnej w warunkach kwasowych lub zasadowych tworzy żelatynę. Z uwagi na swoje właściwości i powszechność występowania, kolagen jest produktem wysoce pożądanym na rynku. Znane są już jego liczne zastosowania m.in. przy produkcji kosmetyków, farmaceutyków, biomateriałów czy pasz i żywności [4, 5]. Poza tym, kolagen jest powszechnie akceptowany jako biomateriał, posiadający wiele unikatowych właściwości, jak np. dużą wytrzymałość

na rozciąganie, niską antygenowość, dobrą biokompatybilność. Kolagen posiada również zdolność do indukowania krzepnięcia płytek krwi czy skuteczność w gojeniu ran [3].
Przy tak licznych zastosowaniach kolagenu istotne jest, aby w sposób jak najbardziej wydajny i efektywny wyizolować go z odpadów skórzanych. Wiele raportów opisuje metody ekstrakcji kolagenu ze skór [3, 4, 5, 6]. Jednakże najpopularniejszą metodą ekstrakcji jest rozpuszczanie kolagenu za pomocą kwasu octowego [3, 5]. Inne powszechnie stosowane metody, które można znaleźć w literaturze, to: metoda wysalania, metoda zasadowa i metoda enzymatyczna [4]. Celem niniejszej pracy jest charakterystyka powszechnie stosowanych metod ekstrakcji kolagenu.

2. Metody ekstrakcji kolagenu

Metoda wysalania
Wysalanie jest stosowane głównie do ekstrakcji rozpuszczalnego białka kolagenowego z tkanek zwierząt. W metodzie tej stosowane są neutralne roztwory soli jak NaCl, Tris-HCl, fosforany czy cytryniany. Stężenie soli jest kluczowym parametrem reakcji. Nawet małe zmiany w stężeniu odczynnika mogą znacznie zmienić wynik procesu. Udowodniono, że wraz ze wzrostem stężenia soli w przedziale od 20 do 500 mM, w zależności od zastosowanej soli, następuje proces destabilizacji struktury cząsteczki kolagenu. Jest to ogromna niedogodność, przez co stosowanie wysalania jest ograniczone [4, 7].

Metoda alkaliczna
Metoda alkaliczna jest powszechnie stosowana w przetwórstwie odpadów skórzanych. Wynika to z tego, że procedura ekstrakcji nie jest skomplikowana i pozwala na częściowe usunięcie chromu ze skór. Chrom w połączeniu z grupą karboksylową kolagenu, po dodaniu substancji alkalicznej (m.in. wapna, wodorotlenku sodu, węglanu sodu czy tlenku magnezu) łączy się z grupą hydroksylową, dzięki czemu powstaje osad w postaci $Cr(OH)_3$ oraz uwalniany jest kolagen. Metoda ta ma także pewne wady, takie jak stosunkowo wysokie zawartości popiołu (10-13%) czy zniszczone struktury aminokwasów w końcowym produkcie. Między innymi z tego powodu uzyskany produkt nie nadaje się do celów spożywczych czy medycznych. Rozwiązaniem jest zastosowanie innego sposobu frakcjonowania. Odpady początkowo są poddane łagodnej obróbce (niska temperatura, niskie stężenia zasad, krótki czas ekstrakcji) celem wydobycia łatwo rozpuszczalnego kolagenu. Dopiero po tym procesie warunki są wzmacniane, czyli zwiększane jest stężenie zasad i podwyższana jest temperatura. Dzięki temu uzyskuje się kolagen trudno rozpuszczalny. Otrzymany produkt końcowy charakteryzuje się niską zawartością popiołu (mniej niż 2%) i wysoką zawartością kolagenu (43%) [4].
Gaidau i wsp. (2009) wykorzystali metodę alkaliczną do ekstrakcji kolagenu z odpadów skórzanych. Proces ekstrakcji prowadzony był przez 6,5 godziny w reaktorze okresowym, przy temperaturze wynoszącej 79-80°C, w środowisku zasadowym i przy ciśnieniu atmosferycznym. Ostatnie dwa parametry okazały się kluczem do uzyskania najlepszej jakości hydrolizatu. Optymalizacja procesu została przeprowadzona przy zastosowaniu symulacji matematycznych. Najlepsze warunki procesu osiągnięto przy temperaturze 79,4°C i czasie 6,4 godziny. Dzięki temu otrzymano wolne od chromu hydrolizaty peptydowe, będące mieszaniną wolnych aminokwasów, tj. glicyny, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, seryny, histydyny, tyrozyny i proliny oraz ich soli. Taki produkt można stosować do różnych celów. Autorzy artykułu wykorzystali go do produkcji bionawozów [8]. Analiza GC/MS pokazała, że hydrolizat kolagenu otrzymany tą metodą zawiera metioninę, glutaminę, alaninę, glicynę i leucynę (Rys. 1) [9].

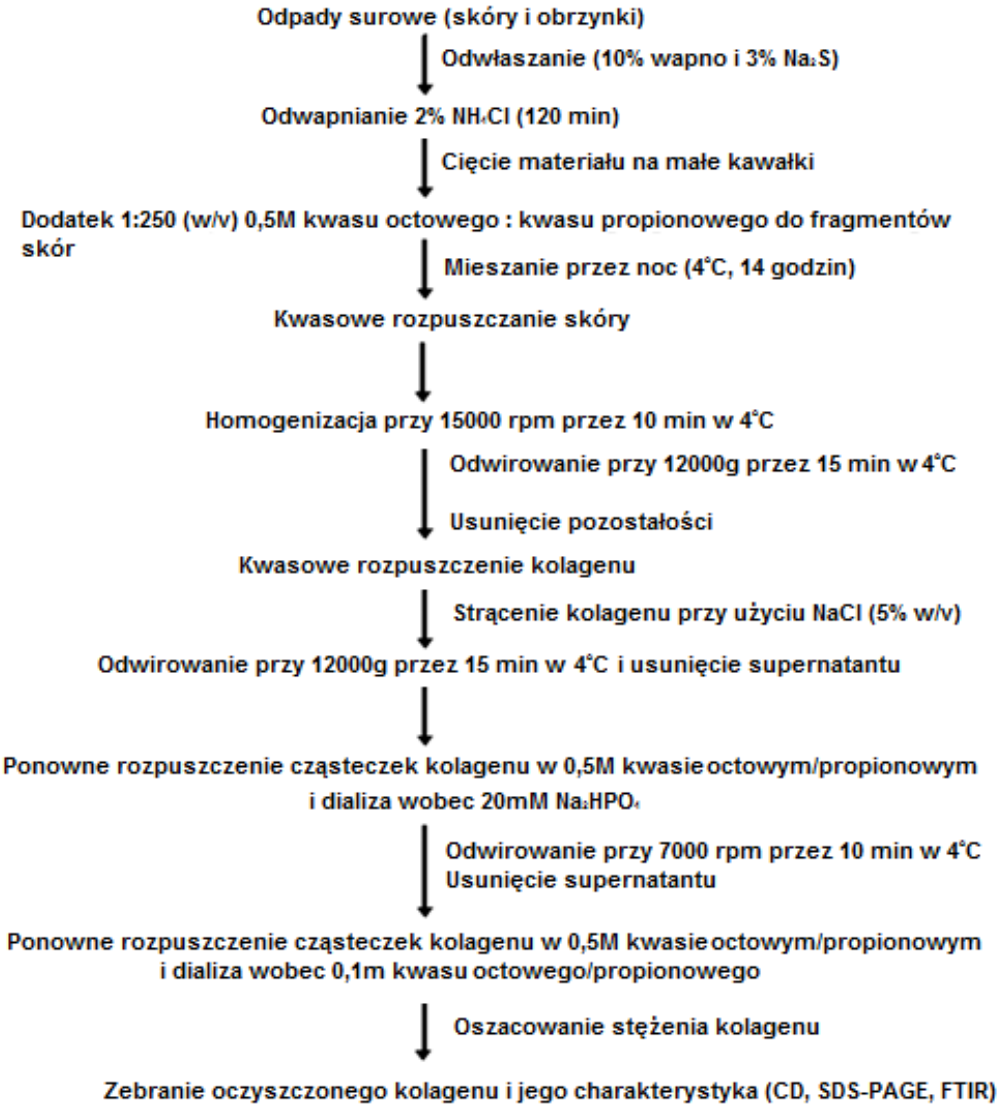


Rysunek 1. Chromatogram GC/MS aminokwasów zawartych w hydrolizacie kolagenowym (ekstrakcja metodą alkaliczną) [9].

Zhang i wsp. (2006) również zastosowali metodę alkaliczną do produkcji hydrolizatów kolagenowych, jednakże parametry procesu były nieco inne. Do wapnowanych odpadów bydlęcych dodawano (3-4)% wapna i 0,5% NaOH. Po dwóch tygodniach skóry były przemywane, a ich pH było neutralizowane za pomocą 1,5% HCl. Żelatyna była pięciokrotnie ekstrahowana w temperaturze od 70°C do 90°C w odstępach 5°C. Hydrolizat kolagenu otrzymano w wyniku hydrolizy żelatyny przy użyciu 0,02% (w/v) trypsyny (1:250) w temperaturze 40°C przez 4 godziny. Celem pracy było otrzymanie specjalnych membran. W tym celu ekstrakt został wysuszony za pomocą suszarki rozpyłowej, a następnie był przechowywany w eksykatorze w temperaturze 30°C. Jednakże praktyka pokazała, że hydrolizaty kolagenu są zbyt kruche do produkcji membran [10].

Metoda kwasowa

W kolejnej metodzie – kwasowej, celem rozszerzenia i rozpuszczenia włókien kolagenowych, stosowane są różnego rodzaju kwasy. Badania wykazały, że najlepsze efekty można osiągnąć używając kwasu cytrynowego, kwasu octowego i wreszcie kwasu solnego. Ekstrakcja za pomocą kwasów również pozwala na usunięcie chromu ze skór. Ciągle jednak istnieje problem oddzielenia rozpuszczonego chromu od białka kolagenowego.



Rysunek 2. Przykład procedury ekstrahowania kolagenu metodą kwasową z surowych obrzynków skór kozich [6].

Massilamani i wsp. (2016) opisali w swojej pracy kwasową ekstrakcję kolagenu z surowych obrzynek. W badaniach tych porównano zdolności do rozpuszczania kolagenu dwóch kwasów: kwasu propionowego i kwasu octowego. Poszczególne etapy tego procesu przedstawiono na rysunku 2. Otrzymany kolagen został zhydrolizowany za pomocą 6N HCl w czasie 16 godzin w temperaturze 105°C. Ilość wyekstrahowanego kolagenu została określona poprzez oznaczenie zawartości hydroksyproliny (Hyp) w końcowym produkcie. Aminokwas ten występuje tylko w strukturze kolagenu, którego zawartość jest dokładnie 7,4 razy większa niż Hyp. Dlatego wynik analizy nie jest zafałszowany obecnością innych białek w próbce. Surowy materiał zawierał 21,5% w/w kolagenu. Wydajność ekstrakcji kwasem octowym i ekstrakcji kwasem propionowym wynosiła odpowiednio 85% i 93%. Udowodniono, że stosując kwas propionowy uzyskuje się wyższą wydajność procesową niż przy zastosowaniu kwasu octowego [3].

Bardzo podobną metodykę zastosował zespół badawczy z Meksyku, który wyekstrahował kolagen ze ścięgien ogona i skóry od bydła, przy zastosowaniu kwasu octowego. Naprzemienne wytracanie i odwirowywanie kolagenu rozpuszczonego w kwasie octowym pozwoliło na uzyskanie produktu zawierającego od 2,1 do 2,6 mg kolagenu na 1 ml próbki [11].

Metoda enzymatyczna

Metoda enzymatyczna ma znacznie więcej zalet w porównaniu z wcześniej opisanymi metodami. Charakteryzuje się lepszą selektywnością reakcji, jest mniej destrukcyjna dla struktury kolagenowej, struktura potrójnej helisy jest lepiej zachowana, a otrzymany produkt ma wysoką czystość i stabilne właściwości fizyczne i chemiczne. Poza tym, stosowane urządzenia nie ulegają korozji oraz niskie jest zużycie energii w trakcie procesu. Metoda enzymatyczna posiada jednak kilka wad, m.in. hydroliza nie jest dostatecznie kompletna oraz długi jest czas reakcji hydrolizy. Najczęściej stosowanymi enzymami w tej metodzie są pepsyna, papaina, trypsyna oraz enzymy odpowiedzialne za usuwanie chromu, tj. proteazy neutralne i proteazy alkaliczne. Zastosowanie tych enzymów gwarantuje działanie jedynie na regiony niehelikalne łańcuchów polipeptydowych, co gwarantuje stabilność strukturalną i biologiczną aktywność wyekstrahowanego kolagenu [4].

Simeonova i Dalev w 1996 opublikowali pracę przedstawiającą badania nad ekstrakcją kolagenu z zastosowaniem proteinazy alkalicznej pochodzącej od bakterii *Bacillus subtilis*. Proces rozpoczęto od przemywania odpadów w celu usunięcia soli nieorganicznych. Następnie oddzielono tłuszcze. W kolejnym kroku przeprowadzono ekstrakcję kolagenu w roztworze z gorącą wodą i ekstrakcję białka z nierozpuszczonych pozostałości z zastosowaniem enzymu. Dzięki temu uzyskano trzy frakcje: frakcję tłuszczową (łój bydła), hydrolizat kolagenowy i koncentrat białka na pasze. W ten sposób udało się wyekstrahować nawet do 95% białka zawartego w odpadach pochodzenia zwierzęcego [12].

W późniejszym czasie różne zespoły badawcze dopracowywały metodę enzymatyczną, aby uzyskać jak najlepszy efekty. W tabeli 1 zestawiono parametry procesowe ekstrakcji kolagenu dla dwóch rodzajów odpadów: odpadów skórzanych oraz odpadów skórzanych zawierających chrom.

Tabela 1. Porównanie parametrów procesowych ekstrakcji kolagenu z odpadów skórzanych [13, 14].

Warunki hydrolizy	Rodzaj odpadów	
	Odpady skórzane	Odpady skórzane z chromem
Czas procesu	8-10 godzin	40 minut
Rodzaj enzymu	Neutralna proteaza	Neutralna proteaza i alkaliczna proteaza
Dawka enzymu	2,0 g na kg surowego materiału	0,16% enzymu
Temperatura procesu	40ºC	65ºC
Wyjściowe pH	5	9,5
Wydajność reakcji	23,05%	62,2%

Enzymy do ekstrakcji reakcji mogą być pozyskiwane z różnych źródeł. Shanthi i wsp. (2013) wykorzystali mikroorganizmy proteolityczne z gatunku *Alcaligenes faecalis*, które wyizolowano z gleby w garbarni. Bakterie z tego gatunku charakteryzują się wysoką odpornością na obecny w próbkach chrom. Co więcej, wykazują one silne zdolności proteolityczne i posiadają zdolność do degradowania nawet 90% odpadów chromowych w czasie 120 godzin. Hydrolizat produkowany tą metodą zawiera 12% popiołu i 80% białka oraz peptydów, gdzie najmniejsze są wielkości rzędu 3-30kDa [15].

Modyfikacje metod ekstrakcji

W celu uzyskania najwyższej jakości ekstraktu i wysokiej wydajności procesu, przy zachowaniu optymalnych warunków analitycznych i ekonomicznych, korzystne jest czasem łączenie niektórych omówionych metod. Przyczynia się to

również do zwiększenia czystości produktu końcowego i zmniejszenia ilości wytwarzanych odpadów.
W pracy Fernandez-Hervas i wsp. (2007) do ekstrakcji kolagenu z owczej skóry użyto trypsyny i 0,5 molowego roztworu kwasu octowego. Wydajność procesu wynosiła 5,8% w odniesieniu do suchej skóry [16]. Jian i wsp. (2008) wykorzystali ultradźwięki w celu przyspieszenia hydrolizy enzymatycznej niegarbowanych stałych odpadów skórzanych. Stwierdzono, że ultradźwięki wspierają proces dyfuzji enzymu przez pory skóry i niszczą strukturę kolagenu. W tych badaniach użyto proteazę wyizolowaną z bakterii *Bacillus subtilis* i alkaliczną proteazę z *Bacillus licheniformis*. Hydrolizę przeprowadzono w następujący sposób: roztwór enzymu dodano w ilości 1,59 g/l do 250 g odpadów skórzanych, a następnie próbki inkubowano z dodatkiem buforu (czteroboranu sodu) w temperaturze 40±2°C w pH 9,5 i przy prędkości 100 obrotów na minutę. Proces prowadzono z/bez ultradźwięków (40 kHz, 0,64 W/cm^2). Udowodniono, że ultradźwięki poprawiają ostateczny stosunek konwersji (zdefiniowane jako stężenie rozpuszczalnego białka/początkowe stężenie substratu) od 57,6% do 84,1%. Zawartość glicyny, proliny i hydroksyproliny wzrasta znacznie po tym procesie, podczas gdy ilość innych aminokwasów nieznacznie maleje. Oznacza to, że proteaza w opisanych warunkach, niszczy regiony helikalne tych trzech aminokwasów. Dlatego ultradźwięki mogą przyspieszyć enzymatyczną hydrolizę niegarbowanych stałych odpadów skórzanych i dzięki temu można uzyskać lepszą ekstrakcję kolagenu [17].

3. Podsumowanie

Podsumowując, odpady skórzane zawierają bardzo dużą ilość cennego białka, które może mieć wiele zastosowań. W tabeli 2 zebrano i omówiono najczęściej stosowane metody ekstrakcji kolagenu z tkanek zwierzęcych.

Tabela 2. Porównanie metod ekstrakcji kolagenu [5].

Mechanizm	Odczynniki	Zalety	Wady	Lit.
METODA WYSALANIA				
Białka kolagenowe posiadają właściwości rozpuszczalnych soli i ulegają wysalaniu.	– Roztwór NaCl, – Tris-HCl, – fosforan lub cytrynian.	– Metoda dobra dla wytrącania kolagenu typu I.	– Metoda niestabilna. – Stosowanie tej metody jest ograniczone.	[5]
METODA ALKALICZNA				
Hydroliza (powstają duże ilości zhydrolizowanych białek kolagenowych).	– Wapno, – wodorotlenek sodu, – węglan sodu, – tlenek magnezu.	– Proste techniki. – Metoda łatwa do kontrolowania. – Przebiegające reakcje są łagodne. – Szybko przebiega hydroliza.	– Zanieczyszczenie wody, gleby i powietrza. – Zużywane są ogromne ilości wody. – Długi process. – Reakcje korodujące sprzęt.	[1-3] [9]
METODA KWASOWA				
Kwas w niskim stężeniu może zniszczyć wiązania między cząsteczkami, dzięki czemu uwalniane i rozpuszczane są włókna kolagenowe.	– Kwas octowy, – kwas cytrynowy – kwas chlorowodorowy.	– Frakcja białka kolagenowego jest wysoka. – Hydroliza przebiega bardzo szybko.	– Reakcje silnie korodujące sprzęt. – Powstają zanieczyszczenia. – Aminokwasy łatwo ulegają zniszczeniu.	[4][6] [8]
METODA ENZYMATYCZNA				
Enzymy atakują łańcuchy nie będące fragmentami helisy w białku, a następnie tną kolagen na mniejsze fragmenty w części N - końcowej.	– Pepsyna, – papaina, – trypsyna.	– Lepsza selektywność reakcji. – Mniejsze zniszczenia w białku kolagenowym. – Wysoka czystość i stabilność produktu. – Przebiegające reakcje są łagodne dla sprzętu.	– Niekompletna hydroliza. – Czas reakcji jest długi. – Wymagany proces usuwania chromu. – Złożoność i wysoki koszt procesu.	[4] [9] [10] [12]

Najczęściej stosowana spośród wymienionych metod, metoda kwasowa, charakteryzuje się wyższą wydajnością reakcji w porównaniu z metodą alkaliczną i enzymatyczną. Zarówno hydroliza kwasowa, jak i alkaliczna przebiega bardzo szybko, jednakże w obu przypadkach aminokwasy mogą ulec zniszczeniu. Poza tym, proces oczyszczenia końcowego produktu jest drogi i skomplikowany. Metody te są również bardzo agresywne dla sprzętu oraz generują spore ilości odpadów zawierających chrom. Dobrym rozwiązaniem wydaje się być zastosowanie enzymów do ekstrakcji kolagenu, gdyż enzymy nie niszczą struktury kolagenu, mają lepsza selektywność reakcji oraz nie wpływają na korozję sprzętu. Coraz częściej również łączy się wyżej wspomniane metody celem uzyskania najwyższej wydajności reakcji, przy jak najmniejszych kosztach.
Ponieważ białka kolagenu znajdują wiele zastosowań (jako suplementy diety, kosmetyki, materiały biomedyczne, pasze dla zwierząt) można stwierdzić, że potencjał rozwoju rynku ekstrakcji białka kolagenu z odpadów pochodzenia zwierzęcego jest ogromny.

Praca ta została wykonana w ramach projektu "COLL_LEG_SEED" otrzymanego w ramach programu "ERA-Net RUS Plus - INNOVATION".

4. Literatura

1. V. John Sundar, A. Gnanamani, C. Muralidharan, N.K. Chandrababu, A.B. Mandal: . Recovery and utilization of proteinous wastes of leather making. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2011, 10 151-163.
2. FAO: World Statistical Compendium for Raw Hides and Skins, Leather and Leather Footwear. 2013, 1993-2012.
3. D. Masilamani, B. Madhan, G. Shanmugam, S. Palanivel, B. Narayan: Extraction of collagen from raw trimming wastes of tannery: a waste to wealth approach. Journal of Cleaner Production. 2016, 113 338-344.
4. H. Yang, Z. Shu: The extraction of collagen protein from pigskin. Journal of chemical and pharmaceutical research. 2014, 6(2) 683-687.
5. M.A. Martínez-Ortiz, A.D. Hernández-Fuentes, D.J. Pimentel-González, R.G. Campos-Montiel, A. Vargas-Torres, G. Aguirre-Álvarez: Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: partial characterization. Journal of food. 2015, 13 (2) 253-258.
6. X.H. Qiang, H.Y. Feng, H. Zhang, Y.Y. Dong: Collagen extracted from chrome shavings using alkali and enzyme. China leather. 2011, 40 (1) 5-8.
7. R. Komsa-Penkova, R. Koynova, G. Kostov, B.G. Tenchov: Thermal stability of calf skin collagen type I in salt solutions. Biochimica et biophysica acta. 1996, 1297 (2)171-81.
8. C. Gaidău, M. Ghiga, E. Stepan, D. Taloi, L. Filipescu: Additives and advanced biomaterials obtained from leather industry by-products. Revista de chimie (Bucuresti). 2009, 60(5) 501-507.
9. C. Gaidau, D.G. Epure, M. Niculescu, E. Stepan, E. Radu, M. Gidea: Application of collagen hydrolysate in cereal seed treatment. XXXIII IULTCS Congress November 24th – 27th, 2015 Novo Hamburgo/Brazil.
10. Z. Zhang, G. Li, B.I. Shi: Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. Journal of the society of leather technologists and chemists. 2006, 90(1) 23.
11. K.K. Gómez, M.L. Del Prado, M.C. Piña, M.C. García de León: Extraction and characterization of collagen from different biological tissues. Medical physics. 2012, 1494, 149-151.
12. L.S. Simeonova, P.G. Dalev: Utilization of a leather industry waste. Waste management. 1996, 16(8), 765-769.
13. F. Zhang, H.Y. Shi, P. Zhang: A new process for preparation of gelatin with enzyme. Journal of Beijing university of chemical technology. 2003, 30(1) 9-12.
14. X.J. Chen, J. Cao, M. Wei: Hydrolysis of dechromed shavings with alkalic protease. China leather. 2004, 33(1) 42-46.
15. C. Shanthi,P. Banerjee, N.C. Babu, G. Rajakumar: Recovery and characterization of protein hydrolysate from chrome shaving by microbial degradation. Journal of the american leather chemists association. 2013, 108(6) 231-239.
16. F. Fernandez Hervas, P.Celma, I. Punti, J. Cisa, J.Cot, A.Marsal, A.Manich: The enzyme activity of trypsin on sheepskin trimmings in a two-step collagen extraction process. The journal of the american leather chemists association. 2007, 102(1) 1-9.
17. S.Jian, T.Wenyi, C. Wuyong: Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste. Journal of cleaner production, 2008, 16(5) 591-597.