

COMPLEMENTARY METHODS FOR RECOVERY AND VALORISATION OF PROTEINS FROM CHROME LEATHER WASTES

METODE COMPLEMENTARE DE RECUPERARE ȘI VALORIZARE A PROTEINELOR DIN DEȘEURILE DE PIELE CROMATĂ

Mihaela-Doina NICULESCU^{1*}, Jan Sedliacik², Carmen GAIDAU¹, Peter Jurkovic³, Jan Matyasovsky³

¹ INCOTP – Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu St, sector 3, Bucharest, Romania, email: icpi@icpi.ro

² Technical University, Faculty of Wood Sciences and Technology, Masaryka 24, 960 53, Zvolen, Slovakia, janos@vsld.tuzvo.sk

³ VIPO s.a., Partizanske, Gen. Svobodu 1069/4, 958 01 Partizanske, Slovakia, vipo@vipo.sk

COMPLEMENTARY METHODS FOR RECOVERY AND VALORISATION OF PROTEINS FROM CHROME LEATHER WASTES

ABSTRACT. Current research highlights the possibility of extracting the protein component from chrome leather wastes from the leather industry, using different techniques, and its valorisation in various agricultural and industrial applications. Experiments have shown that, depending on the method of separating proteins from chromium compounds, the protein component is suitable for an application or another. Alkaline-enzymatic hydrolysis of chrome leather wastes offers the possibility of obtaining a collagen hydrolysate which can be used as additive in the composition of foliar fertilizers, with the role of plant growth stimulation and protection, while dechroming using a new chromium extraction process in acid environment, without its oxidation into hexavalent chromium, leads to obtaining more concentrated hydrolysates, which, used in the composition of adhesives for the wood industry, lead to reduction of formaldehyde emissions.

KEY WORDS: collagen, fertilizers, adhesives

METODE COMPLEMENTARE DE RECUPERARE ȘI VALORIZARE A PROTEINELOR DIN DEȘEURILE DE PIELE CROMATĂ

REZUMAT. Cercetările de față pun în evidență posibilitatea extragerii componentei proteice din deșeurile de piele cromată din industria de pielărie, prin diferite tehnici și valorificarea acesteia în diverse aplicații agricole și industriale. Experimentările au evidențiat faptul că, în funcție de metoda de separare a proteinelor de compuși cu crom, componenta proteică este aptă pentru o aplicație sau alta. Hidroliza alcalino-enzimatică a deșeurilor de piele cromată oferă posibilitatea obținerii unui hidrolizat de colagen ce poate fi folosit ca aditiv în compoziția fertilizanților foliai, cu rol de stimulare și protecție a plantelor, în timp ce decromarea printr-un nou procedeu de extragere a cromului în mediu acid, fără oxidarea acestuia la crom hexavalent, conduce la obținerea unor hidrolizate mai concentrate care, prin folosirea în compoziția adezivilor pentru industria lemnului, conduc la reducerea emisiilor de formaldehidă.

CUVINTE CHEIE: colagen, fertilizanți, adezivi

DES MÉTHODES COMPLÉMENTAIRES POUR LA RÉCUPÉRATION ET LA VALORISATION DES PROTÉINES DE DÉCHETS DE CUIR CHROMÉ

RÉSUMÉ. La recherche actuelle met en évidence la possibilité d'extraire le composant protéique des déchets de cuir chromé de l'industrie du cuir, en utilisant des techniques différentes, et son valorisation dans diverses applications agricoles et industrielles. Les expériences ont montré que, selon le procédé de séparation de protéines des composés de chrome, le composant protéique peut être utilisé pour une application ou pour une autre. L'hydrolyse alcalino-enzymatique des déchets de cuir chromé offre la possibilité d'obtenir un hydrolysat de collagène qui peut être utilisé comme additif dans la composition d'engrais foliaire, avec le rôle de protection et de stimulation de la croissance des plantes, tandis que le nouveau procédé de dechromage basé sur l'extraction du chrome en milieu acide, sans son oxydation en chrome hexavalent, conduit à l'obtention des hydrolysats plus concentrées, qui, utilisés dans la composition d'adhésifs pour l'industrie du bois, conduisent à une réduction des émissions de formaldéhyde.

MOTS CLÉS: collagène, engrais, adhésifs

INTRODUCTION

Chrome leather wastes resulting from natural leather processing can be grouped into two different categories: a) chromium-containing finished leather wastes; b) chromium-tanned leather, wet blue.

The impact of the two types of chrome leather wastes on the environment is significantly different. While leather wastes in category a) do not have a potentially toxic impact on the environment, knowing

INTRODUCERE

Deșeurile de piele cromată rezultate din procesul de prelucrare a pieilor naturale pot fi grupate în două categorii distincte: a) deșeuri de piele finită, cu conținut de crom; b) deșeuri de piele tăbăcătită cu crom, wet blue.

Impactul celor două tipuri de deșeuri de piele cromată asupra mediului este în mod semnificativ diferit. În timp ce deșeurile de piele din categoria a) nu au un impact cu potențial toxic pentru mediu, fiind

*Correspondence to: Mihaela-Doina NICULESCU, INCOTP – Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu St, sector 3, Bucharest, Romania, email: icpi@icpi.ro

that wet and dry finishing operations, carried out under best available techniques (BAT) conditions, contribute to the prevention of hexavalent chromium formation [1-4], leather wastes in category b) are likely to induce negative effects on the environment and on human health [5, 6], under currently practiced uncontrolled storage conditions. For these reasons, research presented in this paper focused on extracting proteins from unfinished chrome leather.

Numerous studies of protein extraction from leather have reported hydrolysis as the most effective process for solubilization of collagenous proteins. Unlike raw or limed hide wastes, whose dissolution does not cause too many difficulties, in the case of tanned wastes, there are difficulties related to their detanning.

By combining the effect of chemical agents with the effect of temperature and period of execution of processes, different stages of collagen hydrolysis are obtained, characterized by average molecular weight of hydrolysates. The degree of polydispersity of collagen hydrolysates is very high because the polypeptide chain scission occurs in weak connection areas. Neither the chemical nature of the bonds in the collagen structure, nor their large number allow their selective destruction, which makes the hydrolysis process a statistical one.

If acid hydrolysis can lead to complete solubilization of chrome leather waste and getting a single hydrolytic fraction, which requires further processing to separate chromium from protein, alkaline and enzymatic hydrolyses result in a heterogeneous system consisting of two distinct hydrolytic fractions. One of the fractions is liquid and contains protein, the other fraction is solid and mainly contains chromium precipitate.

Using enzymatic hydrolysis for disaggregation of chromium containing leather waste is an option that stands out through the advantages offered by the use of proteolytic enzymes and by the moderate reaction conditions: temperature not too high, up to 70°C, pH between 7 and 10, atmospheric pressure and a lower salt content in collagen hydrolysates [7].

During the hydrolysis process occur both the breakage of bonds characteristic to proteins and the formation of new bonds: electrovalent, coordinative, covalent, etc., which will determine the level of internal

recunoscut faptul că operațiile de finisare umedă și uscată, desfășurate în condiții de bună practică (BAT), contribuie la prevenirea formării cromului hexavalent [1-4], deșeurile de piele din categoria b) sunt susceptibile de a induce efecte negative asupra mediului și sănătății umane [5, 6], în condițiile de depozitare necontrolată practiceate în mod curent. Din aceste considerente, cercetările prezентate în această lucrare au fost axate pe extragerea proteinelor din deșeuri de piele cromată, nefinisată.

Numeroase studii de extragere a proteinelor din piele au consacrat hidroliza ca fiind procedeul cel mai eficace pentru solubilizarea proteinelor colagenice. Spre deosebire de deșeurile de piei brute sau numai cenușărite, a căror dizolvare nu ridică prea multe dificultăți, în cazul deșeurilor tăbăcite, apar dificultăți legate de detanarea acestora.

Prin combinarea efectului agenților chimici cu efectul temperaturii și al duratei de desfășurare a proceselor se obțin diferite stadii de hidroliză a colagenului, caracterizate prin greutatea moleculară medie a hidrolizatelor. Gradul de polidispersie a hidrolizatelor de colagen este foarte mare, deoarece scindarea lanțurilor polipeptidice se produce în punctele slabe de legătură. Nici natura chimică a legăturilor din structura colagenului, nici numărul lor foarte mare nu permit o distrugere selectivă a lor, ceea ce face ca procesul de hidroliză să aibă un caracter statistic.

Dacă hidroliza acidă poate conduce la solubilizarea completă a deșeurilor de piele cromată și obținerea unei singure fracții hidrolitice, care necesită prelucrarea ulterioară pentru separarea cromului de proteine, hidrolizele alcaline și cele enzimatice au ca rezultat un sistem eterogen format din două fracții hidrolitice distincte. Una din fracții este lichidă și conține componenta proteică, cealaltă fracție este solidă și conține preponderent precipitatul cu crom.

Abordarea hidrolizei enzimatice pentru dezagregarea deșeurilor de piele cu conținut de crom reprezintă o opțiune ce se evidențiază prin avantajele pe care le oferă utilizarea enzimelor proteolitice, respectiv condițiile moderate de reacție: temperatura nu prea ridicată, până la 70°C, pH între 7 și 10, presiune atmosferică, precum și un conținut mai scăzut de săruri în hidrolizatele de colagen [7].

În timpul procesului de hidroliză are loc atât ruperea legăturilor caracteristice proteinelor, cât și formarea de noi legături: electrovalente, coordinative, covalente etc., care vor determina un nivel al energiei

energy of the products that contain them, much lower than that of reactants. In this case, various combinations of temperature and duration, at the same amount of hydrolysis agent concentration will not provide an energy of reaction capable of destroying the bonds formed at the oligopeptide level. Therefore, increasing temperature and duration of hydrolysis over a limit value will not cause significant increases in the protein hydrolysate rate.

Methods of chrome leather waste treatment by alkaline hydrolysis (U.S. Patent 4100154, U.S. Patent 4483829) or enzymatic hydrolysis (U.S. Patent 5094946) are known, employed for separation of proteins in order to be used as animal feed supplements, fertilizers or in cosmetic preparations [8-10]. Solutions based on alkaline-enzymatic hydrolysis, developed mainly to obtain collagen hydrolysates suitable for agricultural fertilizers, were also searched for [11, 12]. In recent years research in this direction [13-16] indicates that hydrolysis must be addressed in a complex way, in several stages, with different mechanisms of development, initiated by different chemical agents, which complement each other. The fact that relatively dilute protein fractions can be obtained through hydrolysis limits this protein recovery method to a determinate number of applications. However, hydrolysis offers the advantage of obtaining hydrolysates containing amino acids, which recommends them as protein additives for agricultural fertilizers.

Other new methods of dechroming leather waste without Cr³⁺ oxidation to Cr⁶⁺ [17] enable the formation of collagen gels, with industrial applications, for example, in the production of adhesives for wood.

The most frequently used polycondensation adhesives in the wood industry are the ureo-formaldehyde (UF) and phenol-formaldehyde (PF) adhesives, produced in Europe in approximately 4.8 million tons/year UF and 1 million tons/year PF. The release of harmful formaldehyde is an open problem; therefore, bone glues are still used to reduce the negative impact of generated formaldehyde to some extent, but the quality of these glues is poor, due to their low water resistance. The fact that this property can be improved only with formalin or para-formaldehyde, and possibly with additions of Al³⁺ or Cr³⁺, gets us into a vicious circle. Breaking this vicious

interne a produselor care le conțin, mult mai scăzut decât al reactanților. În această situație, diversele combinații între temperatură și durată, la aceeași valoare a concentrației agentului de hidroliză, nu vor furniza o energie de reacție capabilă să distrugă legăturile formate la nivelul oligopeptidelor. Prin urmare, mărirea temperaturii și a duratei de hidroliză peste o valoare limită nu va determina creșteri semnificative ale randamentului în hidrolizate proteice.

Se cunosc procedee de tratare a deșeurilor de piele cromată prin hidroliză alcalină (US Patent 4100154, US Patent 4483829) sau hidroliză enzimatică (US Patent 5094946), pentru separarea proteinelor în vederea folosirii lor ca suplimente nutritive în alimentația animalelor, ca îngrijășăminte sau în preparatele cosmetice [8-10]. De asemenea, s-au căutat și soluții bazate pe hidrolize alcalino-enzimatiche elaborate în principal pentru obținerea de hidrolizate de colagen apte pentru realizarea de fertilizanți agricoli [11, 12]. Din cercetările ultimilor ani în această direcție [13-16] reiese evident faptul că hidroliza trebuie abordată în mod complex, în mai multe trepte, cu mecanisme diferite de desfășurare, inițiate de agenți chimici diferiți, care să se completeze reciproc. Faptul că prin hidroliză se pot obține fracții proteice relativ diluate limitează folosirea acestei metode de recuperare a proteinelor la un număr restrâns de aplicații. Totuși, hidroliza oferă avantajul obținerii unor hidrolizate cu conținut de aminoacizi, ceea ce le recomandă ca aditivi proteici pentru fertilizanți agricoli.

Alte metode noi de decromare a deșeurilor de piele cromată fără oxidarea Cr³⁺ la Cr⁶⁺ [17] permit obținerea unor geluri de colagen cu aplicații industriale, de exemplu, în producția de adezivi pentru lemn.

Cei mai utilizați adezivi policondensați în industria lemnului sunt cei ureo-formaldehidici (UF) și fenol-formaldehidici (PF), producția lor în Europa fiind de aproximativ 4,8 milioane tone/an UF, respectiv 1 milion tone/an PF. Eliberarea de formaldehidă dăunătoare este o problemă deschisă, motiv pentru care se mai folosesc încă cleiuri de oase care să reducă într-o oarecare măsură impactul negativ al formaldehidei generate, însă calitatea acestor cleiuri este slabă, datorită rezistenței scăzute la apă. Faptul că îmbunătățirea acestei proprietăți se poate face doar cu formol sau para-formaldehidă și, eventual, cu adaosuri de Al³⁺ sau Cr³⁺, ne aruncă într-un cerc vicios. Spargerea acestui cerc vicios este posibilă datorita faptului că

circle is possible, because the free liquid formaldehyde that UP and FP adhesives contain can be related to reactive amino groups that the proteins contain; therefore collagen from leather waste could be a viable solution in modifying classical adhesives.

Using collagen to improve these shortcomings, in addition to the positive influence on the environment, may be an interesting option in economic terms as well. In addition, collagen has adhesive properties. Basically, the adhesive properties of proteins are supported by the fact that protein molecules disperse in solution, increasing the contact and adhesion area to other surfaces. Using appropriate techniques for protein modification could increase the dispersion tendency and consequently increase the binding strength. Also, protein dispersion might dislodge some of the deep hydrophobic amino acids outward to increase water resistance. The secondary structure of proteins dispersed in solution may be responsible for increasing the contact area and strength of adhesion to other surfaces such as wood materials, with which it interacts during the hardening process, achieving a strong binding [18]. Cellulose and lignin, the basic wood components, are able to chemically interact with proteins. Wood is hygroscopic due to the hydrophilic nature of cellulose, hemicellulose and lignin, the main components of cell walls. All polymers contain hydroxyl groups which bind moisture through hydrogen bridges. It is shown that proteins are able to bind to different forms of cellulose, crystalline and/or amorphous, as well as to the water-soluble derivatives [19].

This paper discusses aspects related to the advanced extraction of the protein component from chrome leather wastes resulting from the natural leather processing industry and the possibilities of valorising it in agriculture and the wood industry.

EXPERIMENTAL

Experimental Techniques

In order to obtain collagen hydrolysate for agricultural experiments were done with hydrolyses of chrome leather waste, at atmospheric pressure, under alkaline conditions (using lime) at temperatures between 70 and 98°C, with durations up to 6 hours,

formaldehyda liberă, în stare lichidă, pe care o conțin adezivii UP și FP, poate fi legată de grupările aminice reactive pe care le conțin proteinele, motiv pentru care, colagenul din deșeurile de piele ar putea fi o soluție viabilă în modificarea adezivilor clasici.

Folosirea colagenului pentru ameliorarea acestor neajunsuri, pe lângă influența pozitivă asupra mediului, poate fi interesantă și din punct de vedere economic. În plus, colagenul are proprietăți adezive. Principal, proprietățile de lipire ale proteinelor sunt susținute de faptul că molecule de proteină dispersate se împrăștie în soluție, mărgind zona de contact și de aderență pe alte suprafete. Folosirea unor tehnici adecvate de modificare a proteinelor ar putea crește tendința de împrăștiere și, prin urmare, creșterea puterii de lipire. De asemenea, împrăștierea proteinelor ar putea disloca o parte din aminoacizii hidrofobi din profunzime spre exterior pentru a crește rezistența la apă. Structura secundară a proteinelor dispersate în soluție poate fi răspunzătoare de creșterea zonei de contact și a forței de adeziune pe alte suprafete, cum ar fi materiale lemnoase, cu care interacționează în timpul procesului de întărire, realizând o lipire puternică [18]. Celuloza și lignina, componente de bază din lemn, sunt în măsură să interacționeze chimic cu proteine. Lemnul este hidroscopic, datorită caracterului hidrofil al materialelor celulozice, hemiceluloza și lignina, componente principale ale peretilor celulați. Toți polimerii conțin grupări hidroxil care leagă umiditate prin punți de hidrogen. Este demonstrat faptul că proteinele sunt capabile să se lege de diferite forme de celuloză, cristaline și/sau amorfă, precum și de derivați solubili în apă [19].

În lucrarea de față se discută aspecte legate de extragerea performantă a componentei proteice din deșeurile de piele cromată rezultate din industria prelucrării pieilor naturale și posibilitățile de valorificare ale acesteia în agricultură și industria lemnului.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

Tehnici experimentale

Pentru obținerea hidrolizatului de colagen pentru uz agricol, s-au experimentat hidrolize ale deșeurilor de piele cromată, la presiune atmosferică, în condiții alcaline (cu oxid de calciu), la temperaturi cuprinse între 70 și 98°C, cu dureate de până la 6 ore, cuplate cu

coupled with enzymatic hydrolysis at temperatures up to 70°C, with Oropon ON₂ and Alcalase 2.5 L, for 2-4 hours. The collagen hydrolysate for adhesive preparations was obtained by dechroming chrome leather waste, in three extraction baths, followed by hydrolysis with inorganic and organic acids, as well as lyotropic agents [17]. Collagen hydrolysate thus obtained, with a dry matter content of 45%, was used in proportions of 3%, 5% and 8% as additions to UF resins - Kronores CB 1100 from Kronochem Co.

Methods of Analysis

Chemical analysis techniques (gravimetry and volumetry for determination of: dry matter, total nitrogen, dermal substance and amino nitrogen) and instrumental techniques (potentiometry for determination of pH, AAS atomic absorption spectrometry for determination of traces of chromium, FT/IR ATR vibrational absorption spectrometry in film, in order to highlight the structure-properties-processing relationships in collagen hydrolysates, HPLC liquid chromatography for determination of amino acids) were used for characterization of collagen hydrolysates.

Free formaldehyde in plywood samples used in binding experiments was determined according to standard method EN 120 (perforator method), and formaldehyde emission from plywood was determined using standard method EN 717-1 (chamber method).

RESULTS AND DISCUSSIONS

Characterization of Collagen Hydrolysates

As expected, laboratory analysis of collagen hydrolysates from alkaline hydrolysis step showed that temperature plays an important role in both the amount of separated dermal substance, Figure 1, and the value of the average molecular weight of collagen hydrolysates, Figure 2.

Dermal substance content from collagen hydrolysate is an important parameter in the hydrolysis process, and Figure 1 highlights the fact that the highest value, 90.98% in dry matter, was recorded as a result of alkaline hydrolysis at the temperature of 80°C, for 6 hours.

hidrolize enzimaticice la temperaturi de până la 70°C, cu Oropon ON₂, și cu Alcalase 2,5 L, timp de 2-4 ore. Hidrolizatul de colagen pentru preparate adezive s-a obținut prin decromarea deșeurilor de piele cromată, în trei băi de extracție, urmată de hidrolize cu acizi anorganici, organici și agenți liotropici [17]. Hidrolizatul de colagen obținut în acest mod, cu un conținut de substanță uscată de 45%, s-a folosit în proporții de 3%, 5% și 8% ca adaos la rășini UF – Kronores CB 1100 de la Kronochem Co.

Metode de analiză

Pentru caracterizarea hidrolizatelor de colagen s-au folosit tehnici de analiză chimică (gravimetrie, volumetrie, pentru determinarea conținutului de: substanță uscată, azot total, substanță dermică și azot aminic) și instrumentală (potențiometrie, pentru determinarea pH-ului, spectrometrie de absorbție atomică AAS, pentru determinarea urmelor de crom, spectrometrie de absorbție vibrațională FT/IR ATR în film, pentru punerea în evidență a relației structură-proprietăți-procesare în hidrolizatele de colagen, cromatografie în lichid HPLC, pentru determinarea conținutului de aminoacizi).

Formaldehida liberă din probele de placaj folosite în experimentele de lipire a fost determinată conform metodei standard EN 120 (metoda perforator), iar emisia de formaldehidă din placaj s-a determinat prin metoda standard EN 717-1 (metoda de cameră).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Caracterizarea hidrolizatelor de colagen

Așa cum era de așteptat, analizele de laborator ale hidrolizatelor de colagen rezultate din etapa de hidroliză alcalină au arătat că temperatura joacă un rol foarte important, atât în cantitatea de substanță dermică separată, Figura 1, cât și în valoarea masei moleculare medie a hidrolizatelor de colagen, Figura 2.

Conținutul de substanță dermică din hidrolizatul colagenic reprezintă un parametru important al procesului de hidroliză, iar Figura 1 pune în evidență faptul că valoarea cea mai ridicată, respectiv 90,98% în substanță uscată, s-a înregistrat în urma hidrolizei alcaline la temperatura de 80°C, timp de 6 ore.

An equally important hydrolysis parameter is the average molecular weight of hydrolysates, whose value is found in a relation well defined by the ratio of total nitrogen and amino nitrogen, which shows the degree of conversion of total nitrogen into amino nitrogen and which decreases as the degree of hydrolysis increases.

In Figure 2 we can see that as the reaction temperature approaches the reflux temperature (98°C), molecular weights of collagen hydrolysates significantly decrease. However, a temperature so high, for a period of several hours, can have negative effects on the process efficiency, both in terms of energy consumption and efficiency of dermal substance separation from the chromium compounds, as it can be seen in Figure 1.

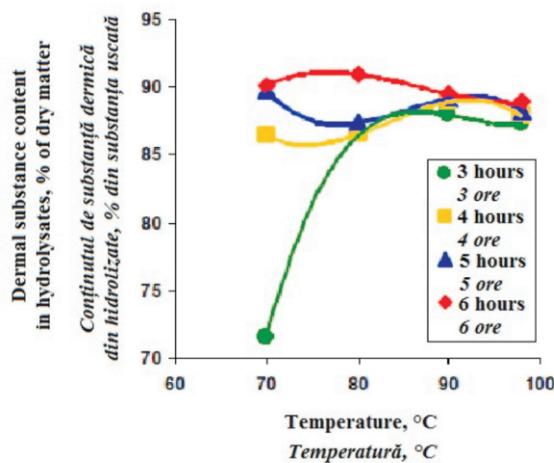


Figure 1. The influence of temperature on the dermal substance of hydrolysates
Figura 1. Influența temperaturii asupra conținutului de substanță dermică din hidrolizate

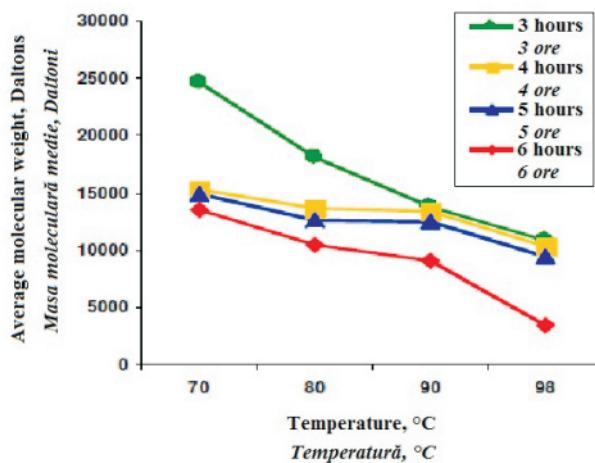


Figure 2. Variation of average molecular weight of collagen hydrolysates in relation to temperature
Figura 2. Variația masei moleculare medie a hidrolizatelor de colagen în raport cu temperatura

Un parametru la fel de important al hidrolizei îl reprezintă masa moleculară medie a hidrolizatelor, a cărei valoare se găsește într-o relație bine definită de raportul dintre azotul total și azotul aminic, care relevă gradul de transformare a azotului total în azot aminic și scade pe măsură ce gradul de hidroliză crește.

În Figura 2 se poate observa că, pe măsură ce temperatura de reacție se apropie de temperatura de reflux (98°C), masele moleculare ale hidrolizatelor de colagen scad semnificativ. Cu toate acestea, o temperatură atât de ridicată, pe o durată de câteva ore, poate marca negativ eficiența procesului, atât sub aspectul consumului energetic, cât și din punctul de vedere al eficacității separării substanței dermice de compușii cu crom, așa cum se poate vedea în Figura 1.

For process optimization, the solution of relaunching the hydrolytic process under milder conditions, but providing an enrichment in amino nitrogen of the hydrolysate, with an effect of reducing the molecular weight of collagen hydrolysate below the 10 000 Da value, is the most favourable solution.

Enzymatic hydrolysis brings significant improvements in terms of reducing molecular weights and thus in terms of amino acid content of collagen hydrolysates obtained by alkaline hydrolysis. These aspects are highlighted in Figures 3 and 4.

In Figure 3 it can be noted how the enzymatic hydrolysis helps polypeptide chains to split, leading to increased amino nitrogen content and thus reducing the average molecular weight.

Pentru optimizarea procesului, soluția relansării procesului hidrolitic în condiții mai blânde, dar care să asigure o îmbogățire a hidrolizatului în azot aminic, cu efect asupra reducerii masei moleculare a hidrolizatului de colagen, sub valoarea de 10 000 Da, este soluția cea mai favorabilă.

Hidroliza enzimatică aduce îmbunătățiri semnificative asupra reducerii maselor moleculare și implicit asupra conținutului de aminoacizi al hidrolizatelor de colagen obținute prin hidroliză alcalină. Aceste aspecte sunt puse în evidență în Figurile 3 și 4.

În Figura 3 se poate urmări modul în care hidroliza enzimatică ajuta la scindarea lanțurilor polipeptidice, determinând creșterea conținutului de azot aminic și implicit reducerea masei moleculare medii.

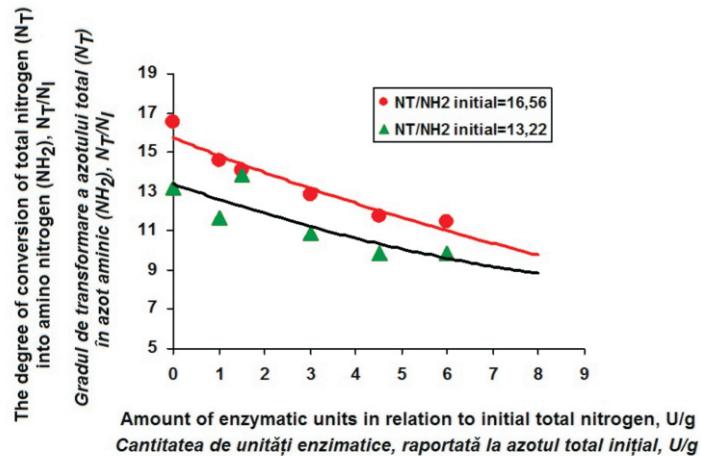


Figure 3. The influence of enzyme amount on the hydrolysis degree
Figura 3. Influența cantității de enzimă asupra gradului de hidroliză

An increase in enzyme concentration from 1 U/g to 6 U/g, in relation to the initial total nitrogen content (N_t) from the collagen hydrolysate increases the rate of polypeptide chains split and releases amino nitrogen (NH_2), which means the formation of protein units with lower molecular weights, also confirmed by IR spectra in Figure 4, which comparatively illustrate the spectral changes that occur in a collagen hydrolysate obtained from alkaline hydrolysis (N_t/NH_2 initial = 13.22), subsequently subjected to enzymatic hydrolysis to reduce molecular weight.

O creștere a concentrației enzimei de la 1 U/g la 6 U/g, în raport cu conținutul de azot total (N_t) inițial din hidrolizatul colagenic crește rata de scindare a lanțurilor polipeptidice și punerea în libertate de azot aminic (NH_2), ceea ce înseamnă formarea de unități proteice cu mase moleculare mai mici, aspect confirmat și de spectrele IR din Figura 4, unde sunt ilustrate comparativ modificările spectrale care apar într-un hidrolizat de colagen obținut din hidroliza alcalină (N_t/NH_2 inițial = 13.22), supus ulterior hidrolizei enzimaticice pentru reducerea masei moleculare.

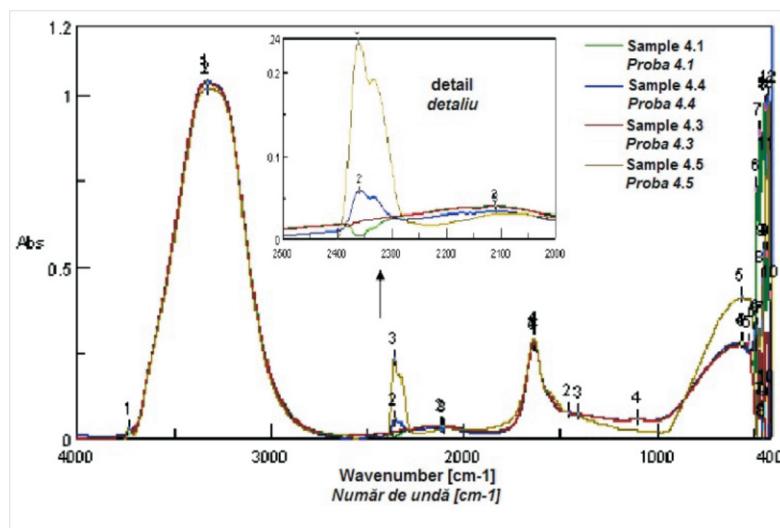


Figure 4. Spectral changes induced by enzymatic treatment of collagen extracts obtained through alkaline hydrolysis of chrome leather

Figura 4. Modificările spectrale induse de tratarea enzimatică a extractelor colagenice obținute prin hidroliza alcalină a pielii cromate

Although collagen hydrolysates were obtained from chrome leather wastes, it was found that they can be considered free of chromium, because atomic adsorption spectrometry revealed that they have a chromium content of 15 to 45 ppb (10^{-9}), situated within the upper limit of 50 $\mu\text{g/l}$ for drinkable water.

Amino acid content of alkaline hydrolysates, compared to that of alkaline-enzymatic hydrolysates, determined by HPLC chromatography, is presented in Table 1.

Deși hidrolizatele de colagen s-au obținut din deșeuri de piele cromată, s-a constatat că acestea pot fi considerate lipsite de crom, deoarece prin spectrometrie de adsorbție atomică s-a pus în evidență faptul că acestea au un conținut de crom de 15 până la 45 ppb (10^{-9}), încadrându-se în limita maximă, de 50 $\mu\text{g/l}$, admisă pentru apă potabilă.

Conținutul de aminoacizi al hidrolizatorilor alcalini, comparativ cu cel al hidrolizatorilor alcalino-enzimatici, determinat prin cromatografie HPLC, este prezentat în Tabelul 1.

Table 1: Amino acid content of collagen hydrolysates
 Tabelul 1: Conținutul de aminoacizi al hidrolizatelor de colagen

No. Nr. crt.	Amino acids Aminoacizi	Content, mg/100ml collagen hydrolysate, from: A – alkaline hydrolysis; AE – alkaline-enzymatic hydrolysis Conținut, mg/100ml hidrolizat de colagen, provenit din hidroliză: A – alcalină; AE – alcalino-enzimatică			
		A1	AE1	A2	AE2
1	Aspartic acid <i>Acid aspartic</i>	2,72	10,10	32,91	19,88
2	Glutamic acid <i>Acid glutamic</i>	6,35	11,17	24,53	16,54
3	Serine <i>Serină</i>	4,33	5,64	193,29	99,95
4	Histidine <i>Histidină</i>	2,95	20,17	38,41	29,66
5	Glycine <i>Glicină</i>	6,74	1,37	26,49	17,53
6	Threonine <i>Treonină</i>	-	15,12	-	-
7	Alanine <i>Alanină</i>	13,63	7,39	-	-
8	Tyrosine <i>Tirozină</i>	-	-	-	75,31
9	Valine <i>Valină</i>	-	7,45	-	53,56
10	Phenylalanine <i>Fenilalanină</i>	-	-	-	32,96
11	Isoleucine <i>Izoleucină</i>	-	1,24	-	49,14
12	Leucine <i>Leucină</i>	-	4,49	-	139,45
13	Proline <i>Prolină</i>	36,07	0,21	25,36	35,75
Total		72,79	84,35	340,99	569,73

Applications in Agriculture

It should be noted that enzymatic hydrolysis has an important contribution to enriching hydrolysates with amino acids, including essential amino acids (threonine, valine, phenylalanine, leucine, isoleucine). The presence of essential amino acid in collagen hydrolysates is important for applications in agriculture, as they are precursors of many bioactive substances which stimulate the metabolism of plants, their growth and development. In the metabolic

Aplicații în agricultură

Este de remarcat faptul că hidroliza enzimatică are un apport important în îmbogățirea hidrolizatelor cu aminoacizi, inclusiv cu aminoacizi esențiali (treonină, valină, fenilalanină, leucină, izoleucină). Prezența aminoacizilor esențiali în hidrolizatele de colagen este un aspect important pentru aplicațiile în domeniul agricol, aceștia fiind precursorii multor substanțe bioactive, stimulatoare ale metabolismului plantelor, ale creșterii și dezvoltării acestora. În procesul

process, amino acids are used by plants in the synthesis of their protein. Free amino acids penetrate plant cells, where they increase photosynthetic activity and chlorophyll synthesis, and their role is manifested especially under stress conditions.

The new concepts of obtaining and modelling properties of growth regulators and biofertilizers enable the induction of multiple biological effects to products by rendering nutrition more efficient and stimulating growth while eliminating fungi and other pathogens. Control of amino acid content in collagen hydrolysates by further hydrolysis enables the formulation of a wide range of foliar fertilizers with distinct roles in any period of vegetation, as well as the development of new classes of fertilizers for different types of crops.

In order to prepare collagen hydrolysates for their integration in various fertilizer formulas, they have been processed so as to bring their pH in a very slightly acidic range, because all hydrolysates obtained by alkaline and alkaline-enzymatic hydrolysis have alkaline pH.

In order to reduce the pH, two variants were developed, using hydrochloric acid and phosphoric acid respectively. The FTIR-ATR vibrational adsorption spectrometry, Figures 5 and 6, revealed that hydrolysates are very little affected in terms of structure by the pH reduction to the limit of 6.5 under these conditions, for both collagen hydrolysates obtained by alkaline-enzymatic hydrolysis, and collagen hydrolysate obtained by alkaline hydrolysis.

metabolic al plantelor, aminoacizii sunt utilizăți de acestea în sinteza proteinelor proprii. Aminoacizii liberi pătrund în celulele plantelor, unde intensifică activitatea fotosintetică și sinteza clorofilei, rolul lor manifestându-se în mod deosebit în condiții de stres.

Noile concepte de obținere și modelare a proprietăților biostimulatorilor și biofertilanților oferă posibilitatea de a induce produselor efecte biologice multiple prin eficientizarea nutriției cuplată cu stimularea creșterii și eliminarea fungilor și a altor agenți patogeni. Controlul conținutului de aminoacizi al hidrolizatelor de colagen, prin hidrolize suplimentare, asigură formularea unei game largi de sortimente de fertilanți foliați, cu roluri distincte în orice perioadă de vegetație, precum și formularea unor noi clase de fertilanți pentru diverse tipuri de culturi.

În vederea pregătirii hidrolizatelor de colagen pentru integrarea lor în diverse formule de fertilanți, acestea au fost prelucrate pentru aducerea pH-ului acestora într-un domeniu foarte ușor acid, deoarece toate hidrolizatele obținute prin hidroliza alcalină și alcalino-enzimatică au pH-ul în domeniul alcalin.

Pentru reducerea pH-ului s-au realizat două variante, cu acid clorhidric și respectiv, cu acid fosforic. Prin spectrometrie de adsorbție vibrațională FTIR-ATR, Figurile 5 și 6, s-a pus în evidență faptul că hidrolizatele sunt foarte puțin influențate din punct de vedere structural de reducerea pH-ului în aceste condiții, până la limita de 6,5, atât pentru hidrolizate de colagen obținute prin hidroliza alcalino-enzimatică, cât și pentru hidrolizate de colagen obținute prin hidroliza alcalină.

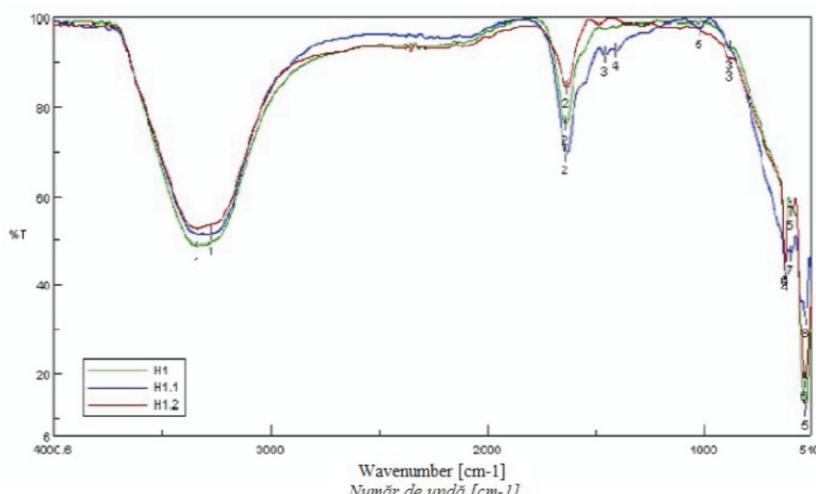


Figure 5. The influence of pH reduction on the structure of collagen hydrolysate obtained under alkaline-enzymatic conditions

Figura 5. Influența reducerii pH-ului asupra structurii hidrolizatului de colagen obținut în condiții alcalino-enzimaticice

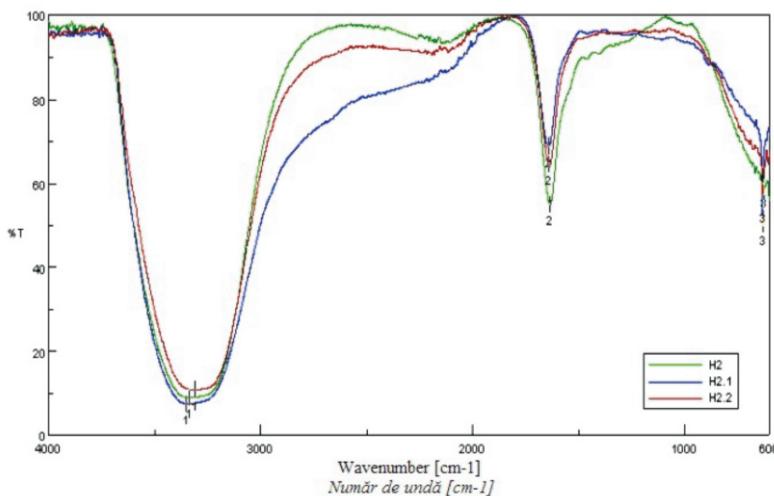


Figure 6. The influence of pH reduction on the structure of collagen hydrolysate obtained under alkaline conditions

Figura 6. Influența reducerii pH-ului asupra structurii hidrolizatului de colagen obținut în condiții alcaline

In conclusion, relaunching the hydrolytic process under enzymatic conditions, in collagen hydrolysates obtained under alkaline or alkaline-enzymatic conditions, and conditioning collagen hydrolysates lead to protein additives intended for foliar fertilization with superior features, due to a richer and more diversified content of amino acids, including essential amino acids, for plant nutrition and stimulation, whose role is manifested especially under stress conditions [20].

Applications in the Wood Industry

Adhesive compositions for the wood industry are a viable alternative to applications of collagen recovered from chrome leather wastes.

For these applications, specific parameters that control both technical performances in the binding process and ecological implications were studied.

It was found that the addition of concentrated collagen hydrolysate, obtained from chrome leather waste, in the composition of urea-formaldehyde resin does not significantly affect the polymerisation time of adhesive blends, ranging between 74-77 seconds, compared to the standard sample for which it is 78 seconds.

Dynamic viscosity, however, recorded significant changes in relation to the amount of collagen

În concluzie, relansarea procesului hidrolitic în condiții enzimatică, în hidrolizatele de colagen obținute în condiții alcaline sau alcalino-enzimatică și condiționarea hidrolizatelor de colagen, conduce la obținerea unor aditivi proteici destinați fertilizării foliare, cu caracteristici superioare, datorită unui conținut mai bogat și mai diversificat în aminoacizi, inclusiv aminoacizi esențiali, pentru nutriția și stimularea plantelor, rolul lor manifestându-se mai ales în condiții de stres [20].

Aplicații în industria lemnului

O alternativă viabilă pentru aplicațiile colagenului recuperat din deșeurile de piele cromată o reprezintă compozиtiile adezive pentru industria lemnului.

Pentru aceste aplicații, au fost studiați parametrii specifici care controlează atât performanțele tehnice în procesul de lipire, cât și implicațiile de ordin ecologic.

S-a constatat că adaosul de hidrolizat de colagen concentrat, obținut din deșeuri de piele cromată, în compoziția rășinii ureo-formaldehidice nu afectează în mod semnificativ timpul de polimerizare al amestecurilor adezive, fiind cuprins în intervalul 74-77 secunde, față de proba standard pentru care se situează la nivelul de 78 secunde.

Vâscozitatea dinamică, însă, înregistrează modificări semnificative în raport cu cantitatea de

hydrolysate in the composition and the time elapsed from the mixture preparation, aspect illustrated in Figure 7.

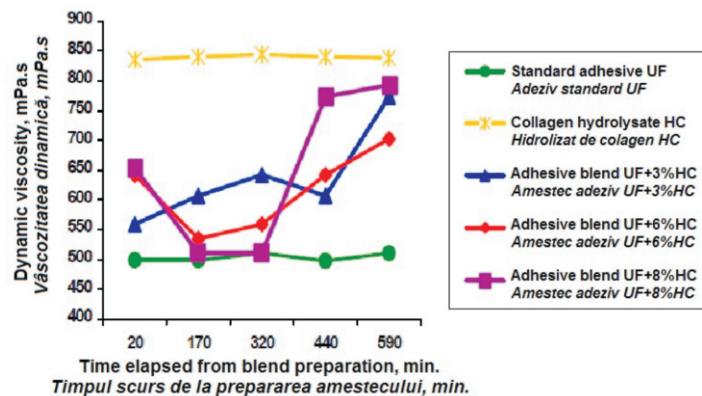


Figure 7. Dynamic viscosity of collagenous adhesive blends
Figura 7. Vâscositatea dinamică a amestecurilor adezive cu colagen

Apparently, the experiments show that the addition of 8% collagen hydrolysate is the most favourable solution, because in the range of 170-320 minutes, dynamic viscosity is at the same level as the standard adhesive. However, in practical terms, for acceptable deviations for this parameter, compared to standard UF adhesive, in as wide a range of time, the addition of collagen hydrolysate should not exceed a value of 6%. The impact degree of the pH value, illustrated in Figure 8, supports this aspect.

hidrolizat de colagen din compoziție și timpul scurs de la momentul preparării amestecului, aspect ilustrat în Figura 7.

Aparent, din experimentări reiese faptul că adaosul de 8% hidrolizat de colagen este soluția cea mai favorabilă, deoarece pentru intervalul 170-320 minute, vâscositatea dinamică se situează la același nivel cu cea a adezivului standard. Cu toate acestea, din punct de vedere practic, pentru abateri acceptabile ale acestui parametru, față de adezivul UF standard, într-un interval de timp cât mai larg, adaosul de hidrolizat de colagen nu ar trebui să depășească valoarea de 6%. În susținerea acestui aspect vine și gradul de afectare a valorii pH-ului, ilustrat în Figura 8.

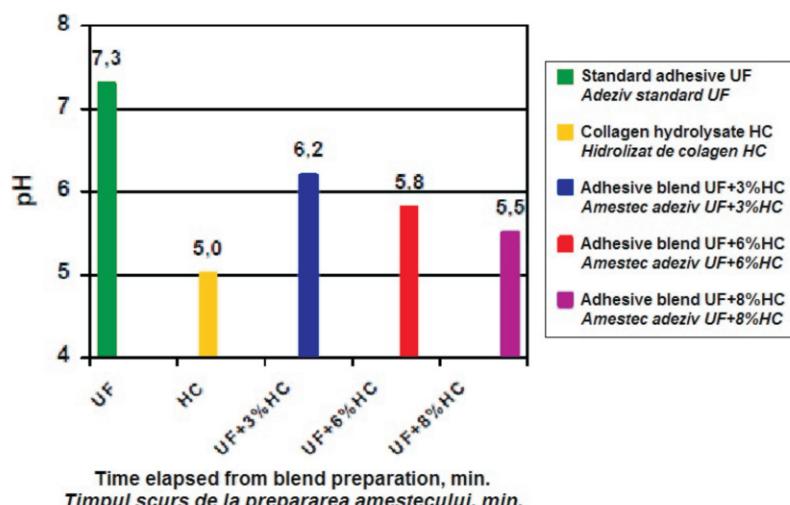


Figure 8. pH change of adhesive blends
Figura 8. Modificarea pH-ului amestecurilor adezive

An important parameter in practical terms is pH, as a too acidic or too alkaline pH may degrade the structure of elements the adhesive preparation comes into contact with.

In terms of environmental implications, the most important parameters in the binding process are free formaldehyde content and formaldehyde emission.

Free formaldehyde content of plywood, determined through the perforator method, is situated in the range of 2.0-2.2 mg/100g dry material, for samples bound with UF-collagen hydrolysate mixture for the control sample, bound with standard UF adhesive it is 5.2 mg/100g dry material; therefore approximately 2.5 times lower.

The influence of collagen hydrolysate addition in urea-formaldehyde adhesive on the formaldehyde emission is shown in Figure 9 and can be quantified by a reduction of emission by approximately 40%.

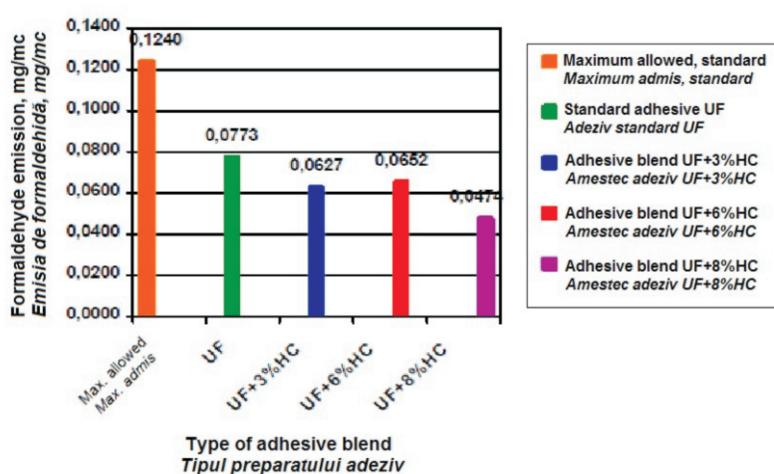


Figure 9. Formaldehyde emission from plywood
Figura 9. Emisia de formaldehidă din placaj

FTIR-ATR spectroscopy analysis of a standard UF resin sample and of UF adhesive mixture with added collagen hydrolysate revealed the possible formation of C-OH bonds with free -NH₂ groups from aldehydes, by the presence of a peak at 1544 cm⁻¹ and a decrease of the peak at 1630 cm⁻¹ compared with that at 1544 cm⁻¹, indicating a decrease in the amount of free -NH₂ groups. The results are comparable with reports from the literature [21-23], indicating that during the cross-

Un parametru important din punct de vedere practic este pH-ul, deoarece un pH prea acid sau prea alcalin poate degrada structura elementelor cu care preparatul adeziv vine în contact.

Din punctul de vedere al implicațiilor ecologice, cei mai importanți parametri în procesul de lipire sunt conținutul de formaldehidă liberă și emisia de formaldehidă.

Conținutul de formaldehidă liberă din placaj, determinat prin metoda perforator, este situat în intervalul 2,0-2,2 mg/100g material uscat, pentru probele lipite cu amestec UF-hidrolizat de colagen, iar pentru proba martor, lipită cu adeziv standard UF este 5,2 mg/100g material uscat, deci de aproximativ 2,5 ori mai mic.

Influența adaosului de hidrolizat de colagen în adezivul ureo-formaldehidic asupra emisiei de formaldehidă este prezentată în Figura 9 și poate fi cuantificată printr-o reducere a emisiei cu aproximativ 40%.

Analiza prin spectroscopie FTIR-ATR a unei probe standard de rășină UF și a unui amestec adeziv de UF cu adaos de hidrolizat de colagen a pus în evidență formarea unor posibile legături C-OH cu grupări libere -NH₂ din aldehyde, prin prezența vârfului de la 1544 cm⁻¹ și scăderea vârfului de la 1630 cm⁻¹ în raport cu cel de la 1544 cm⁻¹, ceea ce indică o scădere a cantității de grupări libere -NH₂. Rezultatele sunt comparabile cu semnalările din literatură [21-23], indicând faptul că în cursul

linking and hardening process, chemical bonds are created between polyamidoamine and resin. This is confirmed by the peak at 1670 cm^{-1} , specific to valence vibrations ($\text{C}=\text{O}$) and the decrease of intensity in the peak at 1100 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}-$) down to 1000 cm^{-1} . FT-IR spectra confirm the chemical reactions between UF resin and collagen hydrolysate. Based on spectra evaluation, we can say that free $-\text{NH}_2$ groups from proteins react with free formaldehyde, while unstable oxy-methylene bonds decrease in the hardened structure of UF resin and collagen hydrolysate mixture.

CONCLUSIONS

Chrome leather wastes are an economic source of proteins with applications in agriculture and industry.

Collagen hydrolysates obtained by alkaline hydrolysis and enriched in amino acids by complementary enzymatic hydrolysis can be used as additives in the composition of foliar fertilizers.

Control of amino acid content in collagen hydrolysates by further hydrolysis enables the formulation of a wide range of foliar fertilizers, specific to certain crops or periods of vegetation.

Dechroming chrome leather shavings, using an innovative process, without oxidation of Cr^{3+} into Cr^{6+} , allows obtaining concentrated hydrolysates, suitable for preparations with adhesive properties.

Using mixtures of urea-formaldehyde adhesives with collagen hydrolysate leads to reduction of formaldehyde emissions from bound wood materials by approximately 40%.

Acknowledgement

This paper was written in the framework of bilateral cooperation project Romania-Slovakia „Innovative materials from leather industry by-products”, financing contract no. 466/28.02.2011, concluded with UEFISCDI.

reticulării și al procesului de întărire se creează legături chimice între poli-amidoamine și răsină. Acest lucru este confirmat de vârful de la 1670 cm^{-1} , specific vibrațiilor de valență ($\text{C}=\text{O}$) și scăderea intensității vârfului de la 1100 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}-$) până la 1000 cm^{-1} . Spectrele FT-IR confirmă reacțiile chimice între răsină UF și hidrolizatul de colagen. Pe baza spectrelor de evaluare, putem afirma că grupările libere $-\text{NH}_2$ din proteine reacționează cu formaldehida liberă, în timp ce legăturile oxi-metilen instabile scad în structura întărită a amestecului de răsină UF cu hidrolizat de colagen.

CONCLUZII

Deșeurile de piele cromată reprezintă o sursă economică de proteine cu aplicații în agricultură și industrie.

Hidrolizatele de colagen obținute prin hidrolize alcaline și îmbogățite în aminoacizi prin hidroliză enzimatică complementară pot fi folosite ca aditivi în compoziția fertilizanților foliași.

Controlul conținutului de aminoacizi al hidrolizatorilor de colagen, prin hidrolize suplimentare, asigură formularea unei game largi de sortimente de fertilizanți foliași, specifici pentru anumite culturi sau pentru anumite perioade de vegetație.

Decromarea răzături de piele cromată, printr-un proces inovator, fără oxidarea Cr^{3+} la Cr^{6+} , permite obținerea unor hidrolizate concentrate, apte pentru preparate cu proprietăți adezive.

Folosirea amestecurilor de adezivi ureo-formaldehidici cu hidrolizat de colagen conduce la reducerea cu aproximativ 40% a emisiilor de formaldehidă din materialele lemnăsoase îmbinate prin lipire.

Mulțumiri

Această lucrare s-a realizat în cadrul proiectului de cooperare bilaterală România-Slovacia „Materiale inovative din subproduse din industria de pielărie”, contract de finanțare nr. 466/28.02.2011, încheiat cu UEFISCDI.

REFERENCES

1. Graf, D., Formation of Cr(VI) Trace in Chrome Tanned Leather: Causes, Prevention and Latest Findings, *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, **2001**, 96, 5, 169-179.
2. Ballardin, A., Xompero, M., Studio sulla formazione di cromo esavalente nelle pelli, *Cuoio Pelli Mat. Conc.*, **2000**, 76, 2, 155-166.
3. Chandra Babua, N.K., Asma, K., Raghupathi, A., Venba, R., Ramesh, R., Sadulla, S., *J. Cleaner Prod.*, **2005**, 13, 1189-1195.
4. Page, C., Understanding Clean Technology, *Leather International*, March **2005**, 17-23.
5. Kolomaznik, K., Adamek, M., Andel, I., Uhlirova, M., Leather Waste – Potential Threat to Human Health, and a New Technology of its Treatment, *J. Hazard. Mater.*, **2008**, 160, 2-3, 514-520.
6. Font, J. et. al., Influence of Various Factors on Chromium (VI) Formation by Photo Aging, *J. Soc. Leather Techol. Chem.*, **1999**, 83, 300.
7. Janocova, D., Kolomaznik, K., Vasek, V., Optimization of Chrome Shavings Treatment by Enzymatic Digestion, International Carpathian Control Conference ICCC Malenivice, Czech Republic, **2002**.
8. Guardini, G., Extraction of Proteins and Chromium Sulphate from Chromium-tanned Skin Waste, US Patent 4483829, **1983**.
9. Taylor, M.M., Diefendorf, E.J., Na, G.C., Marmer, W.N., Enzymatic Processing of Materials Containing Chromium and Protein, US Patent 5094946, **1992**.
10. Holloway, D.F., Recovery and Separation of Nutritious Proteins Hydrolysates and Chromium from Chrome Leather Scrap, US Patent 410054, **1978**.
11. Zăinescu, G., Voicu, P., Gherghina, C.A., Sandru, L., Exploratory Research Regarding the Use of Organic Biopolymers from Tanneries in Agriculture - Part I, *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2009**, 9, 4, 258-265.
12. Mokrejs, P., Kolomaznik, K., Mladek, F., Leather Waste Hydrolysis Treatment, The University of Thomas Bata in Zlin, Faculty of Technology, Protein and Leather Institute, Czech Republic.
13. Hrncirik, J., Dvorackova, M., Hruska, F., Kupec, J., Kolomazik, K., Kinetics of Alkaline Hydrolysis of the Insoluble Protein Fraction Following Enzymatic Hydrolysis of Chrome-Tanned Shavings, *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, **2005**, 100, 1, 1-7.
14. Kolomaznik, K., Mladek, F., Langmaier, F., Janacova, D., Taylor, M.M., Experience in Industrial Practice of Enzymatic Dechromation of Chrome Shavings, *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, **2000**, 95, 2, 55-63.
15. Kupec, J., Rudlova, M., Dvorackova, S., Ruicka, J., Kolomaznik, K., Deproteination of Chrome Waste by Washing and Enzymatic Hydrolysis, *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, **2002**, 97, 9, 349-354.
16. Taloi, D., Gaidau, C., Niculescu, M., Leather Waste Hydrolysis Assisted by Active Mathematical Modeling, ICAMS 2008 – Proceedings of the 2nd International Conference on Advanced Materials and Systems, Bucharest, 23-24 Oct. **2008**, 319-324.
17. Matyášovský, J., Sedliačík, J., Jurkovič, P., Kopný, J., Duchovič, P., De-Chroming of Chromium Shavings without Oxidation to Hazardous Cr6+, *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, **2011**, 106, 1, 8-17.
18. Sun, S., Zhong, Z., Adhesives from Modified Soy Proteins, Wood Adhesives 2000 Extended Abstracts, Nevada, *Forest Prod. Soc.*, **2000**, 5-6.
19. Shpigel, E., Goldlust, A., Eshel, A., Ber, I.K., Feroni, G., Singer, Y., Expression Purification and Applications of Staphylococcal Protein A Fused to Cellulose-binding Domain, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2000**, 31, 197-203.
20. Gaidau, C., Ghiga, M., Stepan, E., Taloi, D., Filipescu, L., Additives and Advanced Biomaterials Obtained from Leather Industry By-products, *Rev. Chim.*, Bucharest, **2009**, 60, 5, 501-507.
21. Essawy, H.A., Moustafa, A.A.B., Elsayed, N.H., Improving the Performance of Urea-formaldehyde Wood Adhesive System Using Dendritic Poly(amidoamine)s and Their Corresponding Half Generations, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2009**, 114, 1348-1355.

22. Milata, V., Segla, P., Brezova, V., Gatial, A., Kovacik, V., Miglierini, M., Stankovsky, S., Síma, J., Aplikovana molekulova spektroskopia, Bratislava, ydavatelstvo STU, **2008**.
23. Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G., Collagen Types Analysis and Differentiation by FT-IR Spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 829-837.