

## COMPARING THE IMPACT OF LIPOLYTIC ENZYME PREPARATIONS IN ADDITIONAL SOAKING AND DEGREASING OF FLESHED PIG AND SHEEP SKINS

### COMPARAREA IMPACTULUI PREPARATELOR ENZIMATICE LIPOLITICE ASUPRA DEGRESĂRII ȘI ÎNMUIERII SUPLIMENTARE A PIEILOR PORCINE ȘI OVINE DESCĂRNATE

Vasil TSANOV<sup>\*</sup>, Dimitrina IVANOVA, Margarita KOLEVA

University of Chemical Technology and Metallurgy, Department of Textile and Leather, 8 Kl. Ohridski bul., 1756 Sofia, Bulgaria, email: vasil.tsanoff@tsanoff-classic.com

#### COMPARING THE IMPACT OF LIPOLYTIC ENZYME PREPARATIONS IN ADDITIONAL SOAKING AND DEGREASING OF FLESHED PIG AND SHEEP SKINS

ABSTRACT. Appropriate use of enzyme preparations in pretanning enzymatic processes for treatment of pig and sheep skins with high content of natural fats needed comparative analysis of the mechanisms of their action of degreasing and the general rate of opening up of the fibrous structure of skin tissue. An aqueous degreasing process with enzyme addition is recommended.

KEY WORDS: lipase, animal fats, fatty acids.

#### COMPARAREA IMPACTULUI PREPARATELOR ENZIMATICE LIPOLITICE ASUPRA DEGRESĂRII ȘI ÎNMUIERII SUPLIMENTARE A PIEILOR PORCINE ȘI OVINE DESCĂRNATE

REZUMAT. Utilizarea adecvată a preparatelor enzimatice în procese enzimatice de pretăbăcire pentru tratarea pieilor porcine și ovine, cu conținut ridicat de grăsimi naturale necesită o analiză comparativă a mecanismelor acțiunii de degresare a acestora și a gradului general de deschidere a structurii fibroase a țesutului pielii. Se recomandă un proces de degresare în apă cu adaos de enzime.

CUVINTE CHEIE: lipază, grăsimi animale, acizi grași.

#### LA COMPARAISON DE L'IMPACT DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES LIPOLYTIQUES SUR LE TREMPAGE ET DÉGRAISSAGE SUPPLÉMENTAIRE DES PEAUX ÉCHARNÉES DE PORC ET DE MOUTON

RÉSUMÉ. L'utilisation appropriée des préparations enzymatiques dans le processus de prétannage enzymatiques pour le traitement des peaux de porc et de mouton à haute teneur en graisses naturelles nécessite une analyse comparative des mécanismes d'action de dégraissage et le taux général d'ouverture de la structure fibreuse du tissu cutané. On recommande un processus de dégraissage aqueux avec addition d'enzyme.

MOTS CLÉS: lipase, graisses animales, acides gras.

## INTRODUCTION

The content of fat and fat-like substances in the skin of different animals differs and is determined primarily by type, age, sex and way of feeding of the animal. For example, in the skins of the animals living in colder regions, dominate the esters of oleic acid, which makes the skin soft at low temperatures, while the skins of herbivores living in warmer climates are rich in stearic acid, which has higher melting point and therefore skins are hard [1].

In the cattle hides the amount of the fats moves in the range of 0.5-2.0%, in the goat skins – 3-10%, in pig skins (depending on the way of breeding) up to 30%. The fat content in sheep skins is high - from 4 to 30%. In some marine mammals such as seals, dolphins and more, skins are even richer in natural fats, reaching 51% [2].

## INTRODUCERE

Conținutul de grăsimi și substanțe grase în pielea diferitelor animale diferă și este determinat în primul rând de tipul, vârsta, sexul și modul de hrănire a animalului. De exemplu, în pieile animalelor care trăiesc în zonele mai reci, domină esterii ai acidului oleic, care dau moliciune pielii la temperaturi joase, în timp ce pieile ierbivorelor care trăiesc în climate mai calde sunt bogate în acid stearic, care are un punct de topire mai mare, prin urmare, pieile sunt rigide [1].

La pieile bovine, cantitatea de grăsimi se situează în intervalul 0,5-2,0%, la pieile de capră – 3-10%, la pieile porcine (în funcție de modul de reproducere), până la 30%. Conținutul de grăsimi al pieilor ovine este mare – de la 4 la 30%. La unele mamifere marine cum ar fi focile, delfinii și altele, pieile sunt chiar mai bogate în grăsimi naturale, ajungând până la 51% [2].

\* Correspondence to Vasil TSANOV, University of Chemical Technology and Metallurgy, Department of Textile and Leather, 8 Kl. Ohridski bul., 1756 Sofia, Bulgaria, email: vasil.tsanoff@tsanoff-classic.com

Degreasing of hides and skins with high content of fat is still unsatisfactory. The unsatisfactory degreasing of pig and sheep skins can cause problems in the technology process and deterioration of the quality of finished products.

In the various layers of skins lipids with different chemical composition and properties are spread. Since many studies have shown that fat above the surface of the skin has higher iodine value and specific mass, a lower melting point and saponification number, compared with fat located inside the skin. Papillary layer contains mostly fat-like substances - waxes, cholesterol and its esters. In the reticular layer and subcutaneous tissue are found only fat triglycerides of saturated fatty acids.

The problems in the processing of raw pig skins are determined by histological and morphological differences in comparison with other raw skins and hides - high content of natural fats, distributed throughout the cross-section of the skins and their absence in the upper layer.

Sheep skins have a specific zoning of fats in papillary layer and at the base of the hair root [3]. The oil given off by these fat cells will lubricate the wool.

Except in the free state, lipids can be found in the skin in the form of volatile compounds with proteins called lipoproteins. The characteristic of lipoproteins is that they can be directly extracted with organic solvents (acetone, ether, alcohol, etc.) as ordinary lipids. To be able to extract from the skin, it must undergo prior to acid or alkali treatment, in which the lipoproteins undergo hydrolysis. Released in lipid hydrolysis, the fat can now be extracted with organic solvents.

## MATERIALS AND METHODS

The goal of this study is investigation of the process of enzymatic additional soaking and enzymatic degreasing of soaked and fleshed pig and sheep skins.

As an object and for comparison are the following enzyme materials:

- Lipase BVP / Biovet Pestera, Bulgaria;
- Greasex 50L / Novozymes, Denmark;
- NovoCor ADL / Novozymes, Denmark.

Degresarea pieilor brute cu un conținut ridicat de grăsimi este încă nesatisfăcătoare. Degresarea nesatisfăcătoare a pieilor porcine și ovine poate cauza probleme în procesul tehnologic și deteriorarea calității produselor finite.

Lipide cu compoziție și proprietăți chimice diferite sunt răspândite în straturile de piele. Întrucât numeroase studii au arătat că grăsimea de la suprafața pielii are un indice de iod și masă specifică mai mari, un punct de topire și un indice de saponificare mai mici, în comparație cu grăsimea din interiorul pielii. Stratul papilar conține în cea mai mare parte substanțe grase - ceruri, colesterol și esterii acestuia. În stratul reticular și în țesutul subcutanat se găsesc numai trigliceride ale acizilor grași saturați.

Problemele la prelucrarea pieilor brute de porc sunt determinate de diferențele morfologice și histologice în comparație cu alte piei brute - conținut ridicat de grăsimi naturale, distribuite pe toată secțiunea transversală a pieilor, și absența acestora în stratul superior.

Pieile ovine au o distribuție specifică a grăsimilor în stratul papilar și la baza rădăcinii firului de păr [3]. Uleiul produs de aceste celule adipoase lubrifică lâna.

Cu excepția cazului în care lipidele sunt în stare liberă, acestea pot fi găsite în piele sub forma unor compuși volatili cu proteine numite lipoproteine. Caracteristica lipoproteinelor este aceea că pot fi extrase în mod direct cu solvenți organici (acetona, eter, alcool, etc.), precum lipidele obișnuite. Pentru a le putea extrage din piele, acestea trebuie să se aplice în prealabil un tratament acid sau alcalin, în cadrul căruia lipoproteinele sunt supuse hidrolizei. Eliberate prin hidroliza lipidelor, grăsimile se pot extrage cu solvenți organici.

## MATERIALE ȘI METODE

Scopul acestui studiu este investigarea procesului suplimentar de înmuiere enzimatică și de degresare enzimatică a pieilor porcine și ovine înmuiate și descărnate.

Următoarele produse enzimatică au fost utilizate pentru comparație:

- Lipase BVP / Biovet Pestera, Bulgaria;
- Greasex 50L / Novozymes, Danemarca;
- NovoCor ADL / Novozymes, Danemarca.

The enzyme solutions for additional soaking are prepared with drinking water. The concentration of the enzyme preparation is 0.5% (of the weight of the skin), TK=1, wetting surfactant is added (compatible with the enzyme) – Atesan LPW/DyStar/0.2%, weak mechanical treatment for 10 min followed by 20 min rest, without the addition of neutral and/or ion-active salts. Duration is 120 min at  $t=33^{\circ}\text{C}\div 35^{\circ}\text{C}$  at an altitude of 540 meters.

For initial characterization of the enzyme after soaking and degreasing these analyses are done:

- A. The amount of fats in waste waters / Sperry-Brand [4];
- B. Esterified fatty acids / Verheyden-Nys [5];
- C. Non-esterified fatty acids / Konitzer [6];
- D. The mathematical sum of esterified fatty acids and non-esterified fatty acids is removed from the total grease in the solution and produces content of other lipid-, lipoic compounds (pure waxes, lipoproteins, fat-soluble vitamins) in waste waters.

The waste waters are analyzed, to characterize the action of enzyme materials in additional soaking and opening up of the fibrous structure, by the following methods:

- Carbohydrate components compound in the waste waters of enzyme treatment of pig and sheep skins / Mendel [7];
- Total protein content in waste waters of enzyme treatment of pig and sheep skins / Lowry [8];
- Hydroxyproline content [9].

## RESULTS AND DISCUSSIONS

Comparative analysis according to the technical specifications of the activities of the enzyme materials is given in Table 1.

Soluțiile enzimatică pentru înmuiere suplimentară sunt preparate cu apă potabilă. Concentrația preparatului enzimatic este de 0,5% (raportat la greutatea pielii), TK=1; se adaugă tensioactiv de umectare (compatibil cu enzima) – Atesan LPW/DyStar/0,2%, un tratament mecanic slab timp de 10 min, urmat de repaus 20 min, fără adaos de săruri neutre și/sau activate ionic. Durata este de 120 min la  $t=33^{\circ}\text{C}\div 35^{\circ}\text{C}$ , la o altitudine de 540 de metri.

Pentru caracterizarea inițială a enzimei după înmuiere și degresare se efectuează următoarele analize:

- A. Cantitatea de grăsimi în apele uzate / Sperry-Brand [4];
- B. Acizi grași esterificați / Verheyden-Nys [5];
- C. Acizi grași non-esterificați / Konitzer [6];
- D. Suma matematică a acizilor grași esterificați și non-esterificați se elimină din grăsimea totală în soluție și produce alți compuși lipidici și lipoici (ceruri pure, lipoproteine, vitamine solubile în grăsimi) în apele uzate.

Apele uzate sunt analizate, pentru a caracteriza acțiunea produselor enzimatică asupra proceselor de înmuiere suplimentară și de deschidere a structurii fibroase, prin următoarele metode:

- Compuși carbohidrați în apele uzate rezultate în urma tratamentului enzimatic al pieilor porcine și ovine / Mendel [7];
- Conținutul de proteine totale în apele uzate rezultate în urma tratamentului enzimatic al pieilor porcine și ovine / Lowry [8];
- Conținutul de hidroxiprolină [9].

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza comparativă conform specificațiilor tehnice ale activității produselor enzimatică este prezentată în Tabelul 1.

Table 1: The results of enzyme activities  
 Tabelul 1: Rezultatele activităților enzimaticice

Enzyme material <i>Produs enzimatic</i>	Activity in the relation to the acidity of the medium <i>Activitate în raport cu aciditatea mediului</i>	Activity in the relation to the temperature of the medium <i>Activitate în raport cu temperatura mediului</i>	Residual activity in the relation to the acidity of the medium <i>Activitate reziduală în raport cu aciditatea mediului</i>	Residual activity in the relation to the temperature of the medium <i>Activitate reziduală în raport cu temperatura mediului</i>	Average activity to $t=35^{\circ}\text{C}$ ; $\text{pH}=7.5$ <i>Activitate medie la <math>t=35^{\circ}\text{C}</math>; <math>\text{pH}=7,5</math></i>
			[KU/g] (% of the maximum activity) <i>(% din activitatea maximă)</i>		
Lipase BVP	24 (98%)	17 (70%)	21 (85%)	60 min 24 (95%) 120 min 21 (85%)	21
GreaseX 50L	7.6 (96%)	6 (75%)	5.1 (85%)	60 min 7.6 (95%) 120 min 6.8 (85%)	6.9
NovoCor ADL	5.8 (96%)	4.5 (75%)	5.1 (85%)	60 min 5.7 (95%) 120 min 5.1 (85%)	5.2

The enzyme materials Lipase BVP, GreaseX 50L and NovoCor ADL at the selected temperature for the treatment ( $t=35^{\circ}\text{C}$ ) and according to the data of technical specification of the manufacturer for the activity in the relation of acidity of the medium and the optimum action ( $\text{pH}=7.5$ ) have high residual activity at 120 min, therefore the action of the enzyme materials in so specified conditions would be technologically justified to continue after the 120 min too.

For characterization of enzyme action after additional soaking and degreasing the total fats are analyzed in the waste water of enzyme treatment of pig and sheep skins. The data are listed in Table 2.

Produsele enzimaticice Lipase BVP, GreaseX 50L și NovoCor ADL, la temperatura selectată pentru tratament ( $t=35^{\circ}\text{C}$ ) și conform specificațiilor tehnice ale producătorului referitoare la activitatea în raport cu aciditatea mediului și acțiunea optimă ( $\text{pH}=7,5$ ) prezintă activitate reziduală după 120 min, prin urmare se justifică din punct de vedere tehnologic acțiunea produselor enzimaticice în condițiile precizate și după 120 min.

Pentru caracterizarea acțiunii enzimaticice după înmuiere și degresare suplimentară, s-au analizat grăsimile totale în apele uzate rezultate în urma tratamentului enzimatic al pieilor porcine și ovine. Datele sunt indicate în Tabelul 2.

Table 2: Content of total fat in waste water after enzyme treatment of pig and sheep skins  
 Tabelul 2: Conținutul de grăsimi totale în apele reziduale după tratamentul enzimatic al pieilor porcine și ovine

Enzyme material <i>Produs enzimatic</i>	Pig skin <i>Piei porcine</i>	Sheep skin <i>Piei ovine</i>
	[ % ]	
Lipase BVP	6.1	5.4
GreaseX 50L	5.4	5.2
NovoCor ADL	3.2	3.1
*percent error $\pm 0.5$ *eroare procentuală $\pm 0.5$		

We can see from the data in Table 2 that Lipase BVP has better degreasing action in comparison with GreaseX 50L and NovoCor ADL. With regard to sheep skins, enzyme materials Lipase BVP and GreaseX 50L give a greater amount of total fat in comparison with NovoCor ADL in working liquids.

Data of content of lipid substances after the enzyme treatment with Lipase BPV at 120 min is shown in Figure 1.

Din datele din Tabelul 2 se poate observa că produsul Lipase BVP are o acțiune de degresare mai bună în comparație cu GreaseX 50L și NovoCor ADL. Referitor la pieile ovine, produsele enzimatic Lipase BVP și GreaseX 50L produc o cantitate mai mare de grăsimi totale comparativ cu NovoCor ADL în apele uzate.

Datele cu privire la conținutul de lipide după tratamentul enzimatic cu Lipase BPV timp de 120 min sunt prezentate în Figura 1.



Figure 1. Content of esterified, non-esterified and other lipid and lipoic compounds to the total fat content after the action of Lipase BVP in solution for 120 min  
 Figura 1. Conținutul de compuși esterificați, non-esterificați, lipidici și lipoici din conținutul total de grăsimi după acțiunea produsului Lipase BVP în soluție timp de 120 min

Data in Figure 1 shows that the biggest is the part of esterified fatty acids (including esters between fats and alcohols, mono-, di- and triglycerides, waxes, carbohydrates, peptide residues, etc.). In action of Lipase BPV on both type of skins non-esterified fatty acids and esterified ones are equal.

Datele din Figura 1 indică faptul că acizii grași esterificați sunt majoritari (inclusiv esteri între grăsimi și alcoolii, mono-, di- și trigliceride, ceruri, carbohidrați, peptide reziduale, etc.). La acțiunea produsului Lipase BPV asupra ambelor tipuri de piei, cantitățile de acizi grași esterificați și non-esterificați sunt egale.

Data on the content of lipid substances after the enzyme treatment with Greasex 50L for 120 min is shown in Figure 2.

Datele referitoare la conținutul de lipide după tratamentul enzimatic cu Greasex 50L timp de 120 min sunt prezentate în Figura 2.

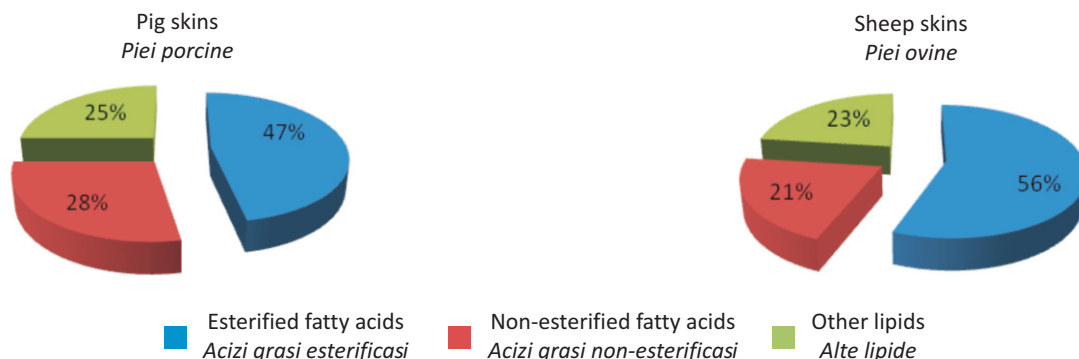


Figure 2. Content of esterified, non-esterified and other lipid and lipoic compounds to the total fat content after the action of Greasex 50L in solution for 120 min  
 Figura 2. Conținutul de compuși esterificați, non-esterificați, lipidici și lipoici din conținutul total de grăsimi după acțiunea produsului Greasex 50L în soluție timp de 120 min

Esterified fatty acids in waste water after enzyme treatment with Greasex 50L are more in sheep skin technology, while the non-esterified are more after treatment of pig skins [3].

Acizii grași esterificați din apele uzate după tratamentul enzimatic cu Greasex 50L se regăsesc în cantități mai mari la pieile ovine, iar cei non-esterificați se regăsesc în cantități mai mari la pieile porcine [3].

Data on the content of lipid substances after the action of NovoCor ADL for 120 min is shown in Figure 3.

Datele referitoare la conținutul de lipide după acțiunea produsului NovoCor ADL timp de 120 min sunt prezentate în Figura 3.

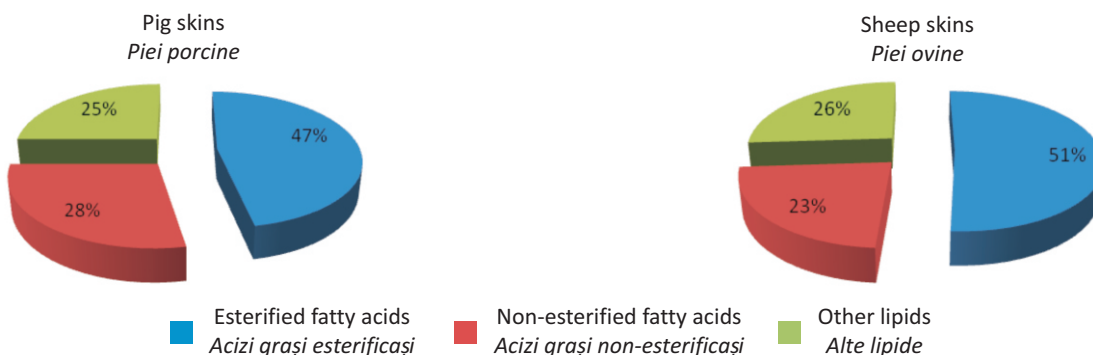


Figure 3. Content of esterified, non-esterified and other lipid and lipoic compounds to the total fat content after the action of NovoCor ADL in solution for 120 min  
 Figura 3. Conținutul de compuși esterificați, non-esterificați, lipidici și lipoici din conținutul total de grăsimi după acțiunea produsului NovoCor ADL în soluție timp de 120 min

Values in Figure 3 show that the proportion of esterified fatty acids obtained after treatment with NovoCor ADL is the biggest in sheep skins, while non-esterified are more in pig skins.

Valorile din Figura 3 arată că proporția de acizi grași esterificați obținută după tratamentul cu NovoCor ADL este mai mare la pieile ovine, în timp ce acizii grași non-esterificați se regăsesc în cantitate mai mare la pieile porcine.

The data of carbohydrate components in waste waters after enzyme treatment of pig and sheep skins are shown in Figure 4.

Datele cu privire la conținutul de carbohidrați în apele uzate după tratamentul enzimatic al pieilor porcine și ovine sunt indicate în Figura 4.

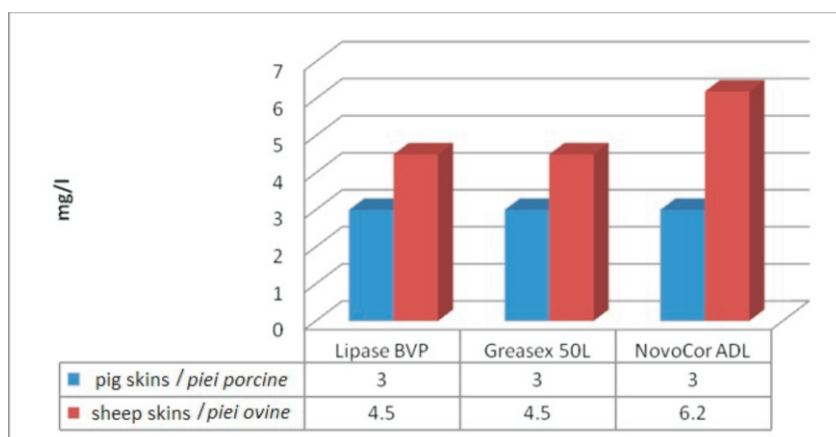


Figure 4. Content of carbohydrate components in waste waters after enzyme treatment of pig and sheep skins  
 Figura 4. Conținutul de carbohidrați în apele reziduale după tratamentul enzimatic al pieilor porcine și ovine

From the data in Figure 4 we can make a conclusion, that the biggest amount of removed carbohydrate components from the sheep skin is at the action of NovoCor ADL. Due to the small amount of structural carbohydrates in the pig skin, the three enzyme preparations removed one and the same amount.

Din datele din Figura 4 se poate trage concluzia că cea mai mare cantitate de carbohidrați din pieile ovine a fost eliminată după acțiunea produsului NovoCor ADL. Datorită cantității reduse de carbohidrați structurali din pielea porcină, cele trei preparate enzimatic au eliminat aceeași cantitate.

The amount of total protein in the waste waters after enzyme treatment of pig and sheep skins are given in Figure 5.

Cantitatea de proteine totale din apele uzate după tratamentul enzimatic al pieilor porcine și ovine este prezentată în Figura 5.

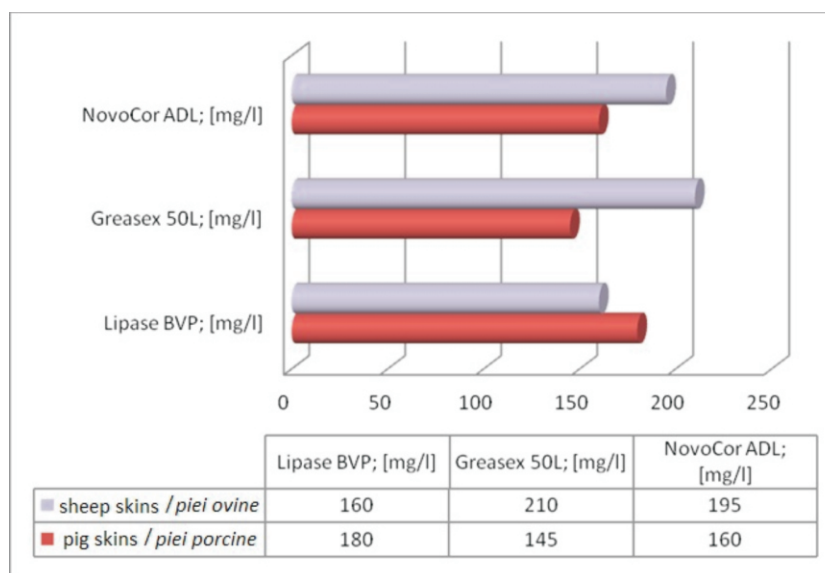


Figure 5. Content of total protein in waste waters after enzyme treatment of pig and sheep skins  
 Figura 5. Conținutul de proteină totală în apele reziduale după tratamentul enzimatic al pieilor porcine și ovine

Figure 5 shows that the amount removed proteins from pig skin are more compared to that from sheep skin when there are treated with Lipase BVP. This is due to chemical structure of non-polar proteins, which are more in the pig skin. When the enzymes of Novozymes are used we can see pronounced affinity of the protein with a polar structure, characteristic of sheep skins.

There are no traces of hydroxyproline in the waste waters in all three variants.

## CONCLUSIONS

- The enzyme preparations Lipase BVP and Greasex 50L give better degreasing effect at treatment of sheep skins, as the extraction of total fats is higher than that of the treatment with NovoCor ADL.
- In the action of Lipase BVP on both skins, non-esterified fatty acids and esterified are equal.
- After the action of NovoCor ADL the amount of non-esterified fatty acids removed from pig skins is higher, while esterified fatty acids are more in sheep skins.
- Due to the small amount of structural carbohydrates in pig skin all three enzyme preparations removed equal contents.
- When testing Novozymes enzymes, a pronounced affinity for proteins with a polar structure, characteristic of sheep skins, was observed.

## REFERENCES

1. Pesheva, I., Himija I fizika na surovata koja I dubilni veshstva, VHTI, Sofia, **1982**.
2. Savickij, I., Biologiceskaja himija, GIO, Kiev, **1982**, 60-61.
3. Covington, T., Tanning Chemistry, The University of Northampton, RSC Publ. UK, **2009**.
4. Sperry, W.M., Brand, F.C., *Biol. Chem.*, **1955**, 213, 69.
5. Verheyden, J., Nys, J., *Clin. Chim. Acta.*, **1962**, 17, 262.
6. Konitzer, K. et al., *Acta biol. Med. Germ.*, **1964**, 12, 502.
7. Ivanova, D., Rukovodstvo, Sofia, **1995**, 23.
8. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 1, 265–75.
9. Golovteva, A., Kucidi, D.A., Laboratornij practicum, Moskva, **1987**, 43.

Figura 5 indică faptul că din pielea porcine s-a eliminat o cantitate mai mare de proteine în comparație cu pielea ovină, atunci când sunt tratate cu produsul Lipase BVP. Acest fapt se datorează structurii chimice a proteinelor non-polare, care se regăsesc în cantitate mai mare în pielea porcine. La utilizarea enzimelor Novozymes se poate observa o afinitate pronunțată pentru proteine cu structură polară, specifice pieilor ovine.

Nu există urme de hidroxiprolină în apele uzate provenite de la cele trei variante.

## CONCLUZII

- Preparatele enzimatice Lipase BVP și Greasex 50L au un efect de degresare mai bun la tratarea pieilor ovine, întrucât extracția grăsimilor totale este mai mare decât cea în cazul tratamentului cu NovoCor ADL.
- La acțiunea produsului Lipase BVP asupra ambelor tipuri de piei, cantitățile de acizi grași esterificați și non-esterificați sunt egale.
- După acțiunea produsului NovoCor ADL, se elimină o cantitate mai mare de acizi grași non-esterificați din pieile porcine și o cantitate mai mare de acizi grași esterificați din pieile ovine.
- Datorită cantității reduse de carbohidrați structurali din pieile porcine, cele trei preparate enzimatice au eliminat cantități egale.
- La testarea enzimelor Novozymes, s-a observat o afinitate pronunțată pentru proteinele cu structură polară, specifice pieilor ovine.