

ESTABLISHMENT OF AVERAGE MOLECULAR STRUCTURE MODEL FOR COLLAGEN EXTRACTED FROM LEATHER SOLID WASTE WITH CHROMIUM

STABILIREA UNUI MODEL DE STRUCTURĂ MOLECULARĂ MEDIE PENTRU COLAGENUL EXTRAS DIN DEȘEURI SOLIDE DE PIELE CROMATĂ

Zhiwen DING^{1*}, Xiaoyan PANG¹, Luminița ALBU²

¹China Leather and Footwear Industry Research Institute Beijing China, 100015, email: pang_xiaoyan@126.com3; ding-zhiwen@263.net1

²INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu, 031215, Bucharest, Romania, email: icpi@icpi.ro

ESTABLISHMENT OF AVERAGE MOLECULAR STRUCTURE MODEL FOR COLLAGEN EXTRACTED FROM LEATHER SOLID WASTE WITH CHROMIUM

ABSTRACT. Collagen protein was extracted from cowhide leather solid waste with chromium by hydrolysis of alkaline and cycle method. Then different molecular weight ranges of collagen protein were got by ultrafiltration. Collagen protein was characterized by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Multi-angle Laser Scattering meter and the average molecular weight was got, based on that the average molecular structure model was established. The study will provide the theory basis for the modification research of collagen.

KEY WORDS: collagen, ultrafiltration, average molecular structure model.

STABILIREA UNUI MODEL DE STRUCTURĂ MOLECULARĂ MEDIE PENTRU COLAGENUL EXTRAS DIN DEȘEURI SOLIDE DE PIELE CROMATĂ

REZUMAT. S-a extras proteina colagenică din deșeuri solide de piele bovină tăbăcăită în crom prin hidroliză alcalină ciclică. Apoi, prin ultrafiltrare, s-au estimat diferite intervale de masă moleculară a proteinei colagenice. Proteina colagenică a fost caracterizată prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) și spectrometrie de difracție cu laser cu unghiuri multiple și s-a calculat greutatea moleculară medie; pe baza acesteia s-a stabilit modelul de structură moleculară medie. Studiul va oferi o bază teoretică pentru cercetările privind modificarea colagenului.

CUVINTE CHEIE: colagen, ultrafiltrare, model structură moleculară medie.

L'ÉTABLISSEMENT D'UN MODÈLE DE STRUCTURE MOLECULAIRE MOYENNE POUR L'EXTRAIT DE COLLAGÈNE À PARTIR DE DÉCHETS SOLIDES DE CUIR CHROMÉ
RÉSUMÉ. La protéine de collagène a été extraite à partir de déchets en cuir bovine chromé par l'hydrolyse alcaline et par la méthode du cycles. Ensuite, on a obtenu les différentes gammes de poids moléculaires de la protéine de collagène par ultrafiltration. La protéine de collagène a été caractérisée par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) et par diffusion laser multi-angle et le poids moléculaire moyen a été obtenu, a partir duquel on a établi le modèle de structure moléculaire moyenne. L'étude servira comme base théorétique pour la recherche de modification du collagène.

MOTS CLÉS: collagène, ultrafiltration, modèle de structure moléculaire moyenne.

INTRODUCTION

Animal skin is the most abundant resource of collagen protein type I. Because the collagen protein molecules have a natural unique skeleton, animal skins were used to make leather. But only about 25% of the raw materials are made into skin in the leather industry, the rest as solid waste is thrown away during the leather making process, such as splitting, shaving, buffing and trimming. In the production of leather, the leather solid waste with chromium contains the collagen protein of 90% (calculated by dry basis). Leather solid waste with chromium was produced about 200,000 tons every year in leather industry in

INTRODUCERE

Pielea animală este cea mai importantă resursă de proteină colagenică de tip I. Întrucât moleculele proteinei colagenice au o structură naturală unică, pieile animalelor au fost transformate în piele tabacăită. Însă, în industria de pielărie, doar aproximativ 25% din materia primă ajunge în produsul finit, restul deșeurilor solide sunt eliminate în timpul prelucrării pielii, în urma unor procese precum șpăltuirea, făltuirea, polizarea și ștuțuirea. La fabricarea pieilor, deșeurile solide din piele cromată conțin colagen în proporție de 90% (în raport cu substanța uscată). Din industria de pielărie din China rezultă anual în jur de 200.000 de tone de deșeuri solide de piele cromată. Recent, oamenii de

* Correspondence to: Zhiwen DING, China Leather and Footwear Industry Research Institute Beijing China, 100015, email: ding-zhiwen@263.net1

China. Recently, the worldwide scholars are committed to the study on reusing of leather solid waste. It is a kind of way that the collagen protein was extracted by the process of alkaline, acid and enzymatic method and then was modified to reuse for the leather solid waste with chromium. As we all know, collagen protein extracted by above simple extraction method contains heavy metals chromium. If the leather solid waste was recycled to the leather fields, it will not enter the food chain and endanger the health of human body. The classification of collagen protein and the establishment of the average molecular model are the basis for the modification research for reusing the leather solid waste with chromium. Small molecular weight of the collagen protein production was modified to produce leather retanning filling agent, high molecular weight collagen protein production was modified to produce leather finishing agent, which provides an effective way for reusing leather solid waste with chromium.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Cowhide leather solid waste with chromium was provided by Dongming leather Ltd. Co.; MgO, Ca(OH)₂ and NaOH are CP; acetonitrile and sodium acetate are Fisher Scientific; hydrochloric acid is AR. All the chemicals provided by Beijing Chemical Reagent Co.

Main Equipment

Cup type ultrafiltration system, SCM-310, produced by Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences; HPLC, Agilent 1100 produced by America Agilent Co.; DAWN EOS Multi angle Light scatterer, produced by America Wyatt Co.

Ultrafiltration and Classification for Collagen Protein

Collagen protein molecules with different molecular weight have different appearance size. Under certain pressure, when the collagen protein of

știință din întreaga lume s-au angajat în studiul reutilizării deșeurilor solide de piele. Proteina colagenică a fost extrasă prin metode alcaline, acide și enzimaticе, apoi a fost modificată pentru a reutiliza deșeurile solide de piele cromată. După cum știm cu toții, proteina colagenică obținută prin metodele de extracție simplă menționate mai sus conține metale grele precum cromul. Dacă deșeurile solide de piele au fost reciclate în domeniile conexe pielăriei, cromul nu va pătrunde în lanțul alimentar și, prin urmare, nu va pune în pericol starea de sănătate a organismului uman. Clasificarea proteinei colagenice și stabilirea modelului de structură moleculară medie stau la baza cercetării privind reutilizarea deșeurilor solide de piele cromată. Colagenul cu masă moleculară mică a fost modificat pentru a obține un agent de umplere și de retăbăcire pentru piele, colagenul cu masa moleculară mare a fost modificat pentru a obține un agent de finisare a pielii, oferind o modalitate eficientă pentru reutilizarea deșeurilor solide de piele cromată.

MATERIALE ȘI METODE

Materiale

Deșeurile solide de piele bovină cromată au fost furnizate de Dongming Leather Ltd. Co.; MgO, Ca(OH)₂, și NaOH sunt chimic pure; acetonitrilul și acetatul de sodiu provin de la Fisher Scientific; acidul clorhidric este de calitate analitică. Toate substanțele chimice au fost furnizate de Beijing Chemical Reagent Co.

Aparatură principală

Sistem de ultrafiltrare de tip cupă, SCM-310, produs de Institutul de Fizică Aplicată din Shanghai, Academia Chineză de Științe; HPLC, Agilent 1100 produs de America Agilent Co.; spectroscop cu dispersie de lumină cu unghiuri multiple DAWN EOS, produs de America Wyatt Co.

Ultrafiltrarea și clasificarea proteinei colagenice

Moleculele de colagen cu diferite mase moleculare au dimensiuni și aspect diferite. Sub o anumită presiune, când proteina colagenică cu masa

different molecular weight across the hole film with certain pore size, collagen protein molecules with small molecular weight can pass through the membrane hole, and collagen protein with big molecular weight will be intercepted. Collagen protein will be speared to different molecular weight from the mixture by a series of pore membrane with different diameter size. And then relatively concentrated molecular weight of collagen protein was got.

EXPERIMENTAL

Cowhide chromium-contained leather solid waste was used to extract collagen protein by the method of alkaline and circulation. And the collagen protein was classified by different size of ultrafiltration membrane.

Hydrolysis of Chrome Leather Wastes

Alkaline Hydrolysis Process

Add 800% (weight percent) water to cowhide wet blue shaving scraps and use alkaline 5% (weight percent) of MgO, Ca(OH)₂ and NaOH respectively, the hydrolysis temperature is 90°C.

Circulation Hydrolysis Process

Leather solid waste with chromium was hydrolyzed and chromium sludge was got after filtered. Filtrate 1 and chromium cake was got after the chromium sludge was hydrolyzed again. Filtrate 2 was got after washing the chromium cake. Then combine the filtrate 1 and filtrate 2 and collagen protein hydrolysate with low concentration was got which was reused to hydrolyze the leather solid waste with chromium high concentration of collagen protein solution was got. The specific process routes are presented in Figure 1.

The ultrafiltration membrane of intercepted molecular weight for 50,000, 30,000, 10,000, 5,000 and 2,000 were used in turn. The collagen protein with different molecular weight range including more than 50,000, 30,000~50,000, 10,000~30,000,

moleculară diferită este așezată pe membrana cu o anumita dimensiune a porilor, moleculele proteinei colagenice cu masa moleculară mică pot trece prin membrană, iar proteina colagenului cu masă moleculară mare va fi oprită. Proteina colagenului se separă de amestec în funcție de masa moleculară diferită printr-o serie de membrane cu pori de diametru diferit. Apoi s-au obținut mase moleculare relativ concentrate ale proteinei colagenice.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

S-au utilizat deșeuri solide de piele bovină cu conținut de crom pentru a extrage proteina colagenică prin metoda alcalină ciclică. Proteina colagenică a fost clasificată pe diferite dimensiuni ale membranei de ultrafiltrare.

Hidroliza deșeurilor de piele cromată

Procesul de hidroliză alcalină

Se adaugă 800% apă (raportat la greutate) la făltuiturile de piele bovină wet blue, apoi se adaugă substanțe alcaline în proporție de 5% (raportat la greutate) precum MgO, Ca(OH)₂, respectiv NaOH, iar temperatura de hidroliză este de 90°C.

Procesul de hidroliză ciclică

S-au hidrolizat deșeurile solide de piele cromată și s-a obținut nămolul cu conținut de crom după filtrare. S-au obținut filtratul 1 și turta de crom după ce s-a hidrolizat din nou nămolul cu crom. Filtratul 2 s-a obținut după spălarea turtei de crom. S-au combinat apoi filtratul 1 și filtratul 2 și s-a obținut hidrolizatul de colagen cu concentrație scăzută, care a fost apoi refolosit la hidroliza deșeurilor solide de piele cu conținut de crom, obținându-se în cele din urmă o soluție cu concentrație mare de colagen. Etapele detaliate ale procesului sunt prezentate în Figura 1.

S-a utilizat membrana de ultrafiltrare pentru mase moleculare de 50.000, 30.000, 10.000, 5.000 și 2.000. S-a obținut proteina colagenică cu diferite mase moleculare, de peste 50.000, 30.000~50.000,

5,000~10,000, 2,000~5,000 and less than 2000 were got.

Collagen Protein Characterization and Establishment of Average Structure Model

High performance liquid chromatography (HPLC) and multi-angle laser scattering were used to determine the molecular weight distribution and the content of amino acid composition of collagen. The amino acid composition of per gram collagen protein mixture was confirmed so as to confirm the average amino acid composition, average molecular formula and average molecular weight. Then the average collagen protein molecular structure model was established based on above research.

The Determination of Molecular Weight Distribution

The conditions of performance liquid chromatographic is that chromatographic column: TSK2000; detected wavelength: 230 nm; mobile phase: 0.1 mol/L PBS containing 0.1 mol/L NaCl; flow rate: 0.5 ml/min; loading quantity of sample: 20 l.

The Determination of the Amino Acid Composition

Protein hydrolysis: 6 mol/L HCL, 110°C, hydrolyzed time 16 h, DNFB derivative; chromatography SBC18 pillars, detected wavelength 360 nm, mobile phase: A 0.05 mol/L acetic acid sodium, B 50% acetonitrile, gradient elution; loading quantity of sample: 5 l.

10.000~30.000, 5.000~10.000, 2.000~5.000 si sub 2.000.

Caracterizarea proteinei colagenice și stabilirea modelului de structură medie

S-au utilizat cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) și spectroscopia cu dispersie de lumină cu unghiuri multiple pentru a determina distribuția masei moleculare și conținutul de aminoacizi din colagen. S-a confirmat conținutul de aminoacizi per gram din amestecul de colagen pentru a se determina compoziția medie de aminoacizi, formula moleculară medie și masa moleculară medie. Apoi s-a stabilit modelul de structură moleculară medie a colagenului pe baza cercetărilor de mai sus.

Determinarea distribuției masei moleculare

Condițiile în care s-a efectuat cromatografia lichidă de înaltă performanță sunt urmatoarele: coloana cromatografică: TSK2000; lungimea de undă detectată: 230 nm; faza mobilă: 0,1 mol/L PBS cu un conținut de 0,1 mol/L NaCl; debit: 0,5 ml/min; cantitatea probei analizate: 20 l.

Determinarea compoziției de aminoacizi

Hidroliza proteinelor: 6 mol/L HCL, 110°C, durată hidroliză: 16h, derivat DNFB; coloană cromatografică: SBC18, lungime de undă detectată: 360 nm, faza mobilă: A 0,05 mol/L acetat de sodiu, B 50% acetonitril, eluarea gradientului; cantitatea probei analizate: 5 l.

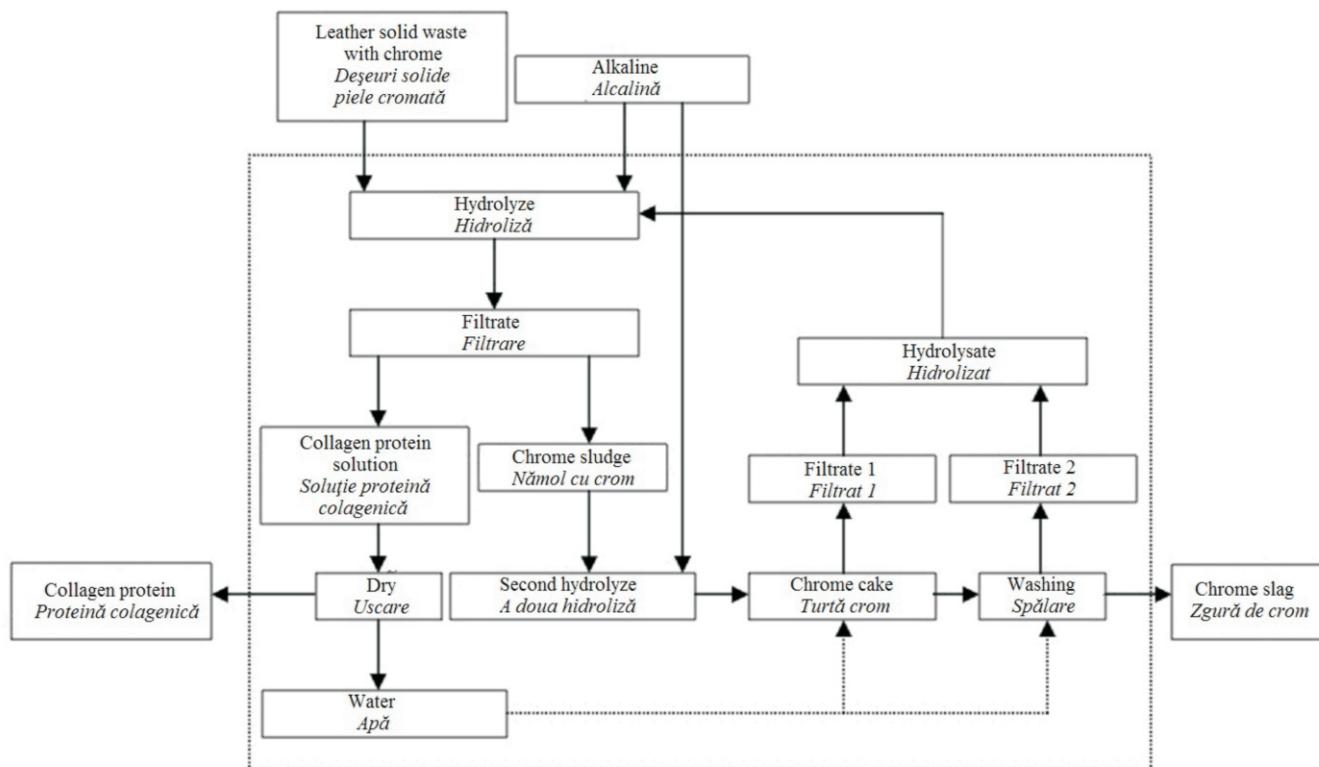


Figure 1. Technique route of small molecular weight collagen protein extracted by circulation method from leather solid waste with chrome
 Figura 1. Diagrama obținerii proteinei colagenice cu masă moleculară mică extrasă prin metoda ciclică din deșeuri solide de piele cromată

RESULTS AND DISCUSSION

Ultrafiltration for Collagen

Collagen solution was graded by above method and the collagen content of different level was determined. The results are shown in Figure 2.

Figure 2 shows the proportion of collagen protein with molecular more than 50,000 is 55.1% hydrolyzed by MgO, 34.5% hydrolyzed by Ca(OH)₂, and 6.9% hydrolyzed by NaOH. It is because the basicity of NaOH and Ca(OH)₂ is stronger than MgO, so the proportion of collagen protein with small molecules weight hydrolyzed by NaOH and Ca(OH)₂ is higher than MgO. The proportion collagen protein with molecules weight less than 10,000 is 48.8% hydrolyzed by NaOH, 23.8% hydrolyzed by Ca(OH)₂, and 15.5% hydrolyzed by MgO.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Ultrafiltrarea colagenului

S-a clasificat soluția de colagen prin metoda menționată mai sus și s-a determinat conținutul de colagen al diferitelor niveluri. Rezultatele sunt prezentate în Figura 2.

Figura 2 prezintă proporția proteinei colagenice cu masa moleculară peste 50.000, și anume: 55,1% prin hidroliză cu MgO, 34,5% prin hidroliză cu Ca(OH)₂, și 6,9% prin hidroliză cu NaOH. Aceasta se datorează faptului că bazicitatea NaOH și Ca(OH)₂ este mai mare decât cea a MgO, prin urmare proporția proteinei colagenice cu masă moleculară mică obținută prin hidroliză cu NaOH și Ca(OH)₂ este mai mare decât cea obținută prin hidroliză cu MgO. Proportția proteinei colagenice cu masă moleculară sub 10.000 este: 48,8%

Above results shows that molecular weight of collagen protein concentrated relatively was got by ultrafiltration classification.

prin hidroliză cu NaOH, 23,8% prin hidroliză cu Ca(OH)₂, și 15,5% prin hidroliză cu MgO. Rezultatele de mai sus arată că, prin ultrafiltrare, s-a obținut masa moleculară a proteinei colagenice relativ concentrată.

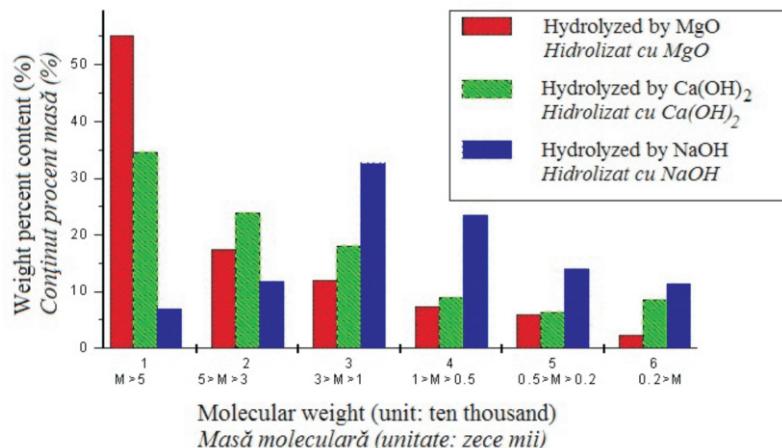


Figure 2. Classification results of collagen hydrolyzed by different alkaline
Figura 2. Rezultatele clasificării colagenului hidrolizat cu diferite substanțe alcaline

Collagen protein extracted by alkaline and circulation method was graded by the same way and the results are shown in Figure 3 below.

Proteina colagenică extrasă prin metoda alcalină ciclică a fost clasificată în același mod, iar rezultatele sunt prezentate în Figura 3.

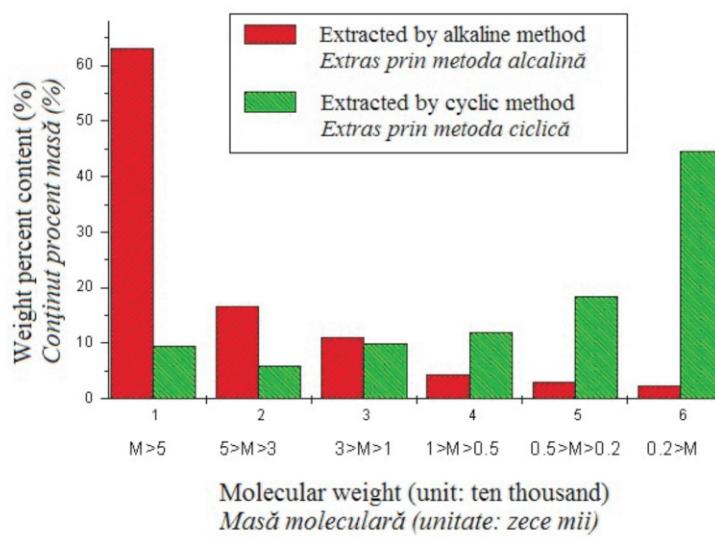


Figure 3. Classification results of collagen extracted by alkaline and cyclic method
Figura 3. Rezultatele clasificării colagenului extras prin metoda alcalină ciclică

The results can be seen in Figure 3, for the extraction of collagen protein from leather solid waste with chromium, large molecular weight is got mainly by alkaline method. The proportion of molecular weight

Dupa cum arată rezultatele din Figura 3, la extragerea proteinei colagenice din deșeuri solide de piele cromată, masa moleculară mare s-a obținut, în principal, prin metoda alcalină. Proporția masei

more than 30,000 is 79.6% and the molecular weight less than 10,000 is only 9.5%. But small molecular weight is got mainly by circulation method. The proportion of molecular weight less than 5,000 is 62.9% and the molecular weight more than 30,000 is only 15.3%.

From the results of above study, we can see the collagen protein extracted from leather solid waste with chromium can be separated to different range of molecular weight by ultrafiltration method. Molecular weight of over 30,000 can be collected to prepare the protein finishing agent and the molecular weight in below 10,000 can be collected to prepare the retanning and filling agent based on this technology.

Establishment of Collagen Average Molecular Structure Model

Analysis of Amino Acid of Collagen

Table 3 shows the results of amino content of amino acid per 1000 amino acid. The quantity of Glycin is the biggest. There is not tryptophan in the collagen protein.

Average Molecular Weight

Figure 4 is the spectrogram of Reverse Phase HPLC of amino acid composition. Figure 5 is the distribution of collagen molecular weight. The percent of collagen with different molecular weight can be seen from Figure 5 and Table 1. Table 2 shows the number average molecular weight of collagen is 7,018.9.

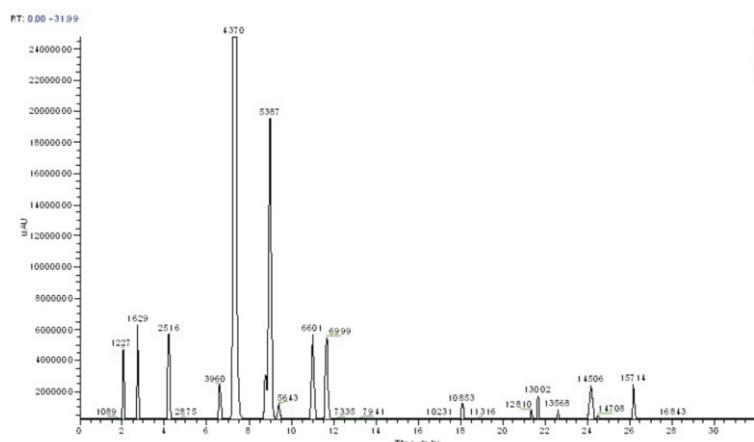


Figure 4. Reverse Phase HPLC of amino acid composition

Figura 4. HPLC în fază inversă a compoziției amino-acizilor

molecularare mai mari de 30.000 este de 79,6%, iar masa moleculară mai mică de 10.000 de doar 9,5%. Masa moleculară mică s-a obținut, în principal, prin metoda ciclică. Proporția masei moleculare mai mici de 5.000 este de 62,9%, iar masa moleculară mai mare de 30.000 este de doar 15,3%.

Din rezultatele studiului de mai sus, se poate observa că proteina colagenică extrasă din deșeuri solide de piele cromată poate fi separată în funcție de diferite mase moleculare prin metoda ultrafiltrării. Proteina colagenică cu masă moleculară de peste 30.000 poate fi colectată pentru a obține agentul proteic de finisare, iar cea cu masă moleculară sub 10.000 poate fi colectată pentru a obține agentul de retăbăcire și umplere pe baza acestei tehnologii.

Stabilirea modelului de structură moleculară medie a colagenului

Analiza aminoacizilor din colagen

Tabelul 3 arată rezultatele determinării conținutului de aminoacizi per 1000 aminoacizi. Cantitatea de glicină este cea mai mare. Nu există triptofan în proteina colagenică.

Masa moleculară medie

Figura 4 prezintă spectrograma HPLC în fază inversă a compoziției de aminoacizi. Figura 5 prezintă distribuția masei moleculare a colagenului. Procentul de colagen cu diferite mase moleculare se poate observa în Figura 5 și în Tabelul 1. Tabelul 2 arată că masa moleculară medie numerică a colagenului este 7.018,9.

HL:
5.38 ET
C18+1A
UV
Goatg' latex

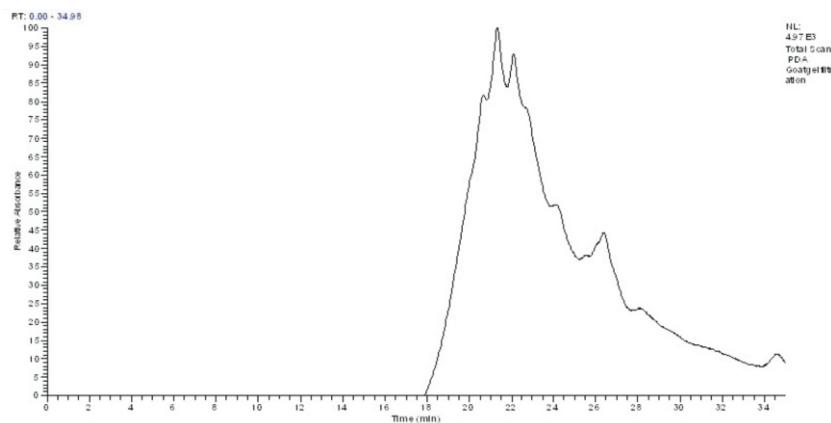


Figure 5. Distribution of collagen molecular weight
Figura 5. Distribuția masei moleculare a colagenului

Table 1: Different percent of different molecular weight composition
Tabelul 1: Diferite procente ale compozitiilor cu diferite mase moleculare

Molecular weight (unit: ten thousand) <i>Masă moleculară (unitate: zece mii)</i>	Percent (%) <i>Procent (%)</i>
1.9	2.6
1.1	8.7
0.82	34.9
0.59	27.1
0.46	15.7
0.35	11

Table 2: Analysis of number average molecular weight of collagen protein
Tabelul 2: Analiza masei moleculare medii numerice a proteinei colagenice

Molecular weight (unit: ten thousand) <i>Masă moleculară (unitate: zece mii)</i>	Percent (%) <i>Procent (%)</i>	Value (unit: ten thousand) <i>Valoare (unitate: zece mii)</i>
1.9	2.6	0.0494
1.1	8.7	0.0957
0.82	34.9	0.28618
0.59	27.1	0.15989
0.46	15.7	0.072222
0.35	11	0.0385
Number average molecular weight <i>Masa moleculară medie numerică</i>		0.70189

Establishment of Collagen Average Molecular Structure Mode

Because the collagen protein extracted from leather solid waste is a mixture of different molecular weight, how to show the collagen protein formula has been a problem for a long time. Now a way of average formula for collagen protein is developed and the average molecular structure model was established which is important for the study on the modification of collagen.

From Table 3 we can see the number of amino acid of average each collagen protein molecules is 77, the average collagen protein formula is C₂₉₅H₄₅₆N₉₀O₁₀₈S and the molecular weight is 7,016 g/mol.

Table 3: Analysis of the establish of average molecular structure model for collagen
Tabelul 3: Analiza modelului de structură moleculară medie pentru colagen

Amino acid Aminoacid	Abb Abr.	Mw Masă moleculară	Amino acid/1000 Aminoacid /1000	Total Mw Masă moleculară totală	Proportion % Proporție %	Molecular formular Formulă moleculară	Quantity of amino acid Cantitate de aminoacid
Asparagin Asparagină	Asp	115	51	5865	6.43	C ₄ H ₅ NO ₃	3.9
Glutamic acid Acid glutamic	Glu	129	70	9030	9.90	C ₅ H ₇ NO ₃	5.4
Hydroxyproline Hidroxiprolină	HyP	113	102	11526	12.63	C ₅ H ₇ NO ₂	7.9
Serine Serină	Ser	87	37	3219	3.53	C ₃ H ₅ NO ₂	2.8
Glycin Glicină	Gly	57	318	18126	19.87	C ₂ H ₃ NO	24.5
Threonine Treonină	Thr	101	17	1717	1.88	C ₄ H ₇ NO ₂	1.3
Arginine Arginină	Arg	156	46	7176	7.86	C ₆ H ₁₂ N ₄ O	3.5
Proline Prolină	Pro	97	129	12513	13.72	C ₅ H ₇ NO	9.9
Alanine Alanină	Ala	71	115	8165	8.95	C ₃ H ₅ NO	8.9
Valine Valină	Val	99	21	2079	2.28	C ₅ H ₉ NO	1.6
Methionine Metionină	Met	131	8	1048	1.15	C ₅ H ₉ NOS	0.6

Stabilirea modelului de structură moleculară medie a colagenului

Întrucât proteina colagenică extrasă din deșeuri solide de piele este un amestec de mase moleculare diferite, determinarea formulei proteinei colagenice a constituit o problemă pentru o lungă perioadă de timp. S-a dezvoltat o modalitate de a obține formula pentru proteina colagenică și s-a stabilit modelul de structură moleculară medie, care este important pentru studiul privind modificarea colagenului.

În Tabelul 3 se poate observa că numărul de aminoacizi al fiecarei molecule medii a proteinei colagenice este 77, formula proteinei colagenice medii este C₂₉₅H₄₅₆N₉₀O₁₀₈S, iar masa moleculară este 7.016 g/mol.

Table 3: Continued
Tabelul 3: Continuare

Amino acid Aminoacid	Abb Abr.	Mw Masă moleculară	Amino acid/1000 Aminoacid /1000	Total Mw Masă moleculară totală	Proportion % Proportie %	Molecular formular Formulă moleculară	Quantity of amino acid Cantitate de aminoacid
Isoleucine Izoleucină	Ile	113	12	1356	1.49	C ₆ H ₁₁ NO	0.9
Leucine Leucină	Leu	113	23	2599	2.85	C ₆ H ₁₁ NO	1.8
Tryptophan Triptofan	Trp	186	/	/	/	/	/
Phenylalanine Fenilalanină	Phe	147	12	1764	1.93	C ₉ H ₉ NO	0.9
Histidine Histidină	His	137	4	548	0.60	C ₆ H ₇ N ₃ O	0.3
Cysteine Cisteină	Cys	103	2	206	0.22	C ₃ H ₅ NOS	0.15
Lysine Lizină	Lys	128	31	3968	4.35	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	2.4
Tyrosine Tirozină	Tyr	163	2	326	0.36	C ₉ H ₉ NO ₂	0.15
Total Total			1000	91231	100	C _{295.2} H _{455.6} N _{90.4} O _{107.6} S 0.75	76.9

Table 4 shows that the number activity group of average 1mol collagen: carboxyl group 10 mol, amine group 14 mol (including: primary amine 6mol, aliphatic secondary amine 3.5 mol, secondary amine on imidazole ring 0.3 mol, C=NH 3.5 mol), hydroxyl group 13 mol (aliphatic hydroxyl group 12 mol, phenolic hydroxyl group 0.15 mol).

Table 4: Number of activity groups in the average molecular structure model of collagen protein
Tabelul 4: Numarul de grupe de activitate în modelul de structura moleculară medie a proteinei colagenice

Activity group Grupă de activitate		mol/mol collagen protein Proteină colagenică mol/mol
Amine group Grupare amino	Primary amine group Grupări amino primare	5.9
	Aliphatic secondary amine group Grupări amino secundare alifatice	3.5
	Secondary amine on imidazole ring Amine secundare pe ciclu imidazol	0.3
	C=NH	3.5

Tabelul 4 arată numărul grupelor de activitate dintr-un mol mediu de colagen: grupare carboxil 10 mol, grupare amino 14 mol (care includ amine primare 6 mol, amine secundare alifatice 3,5 mol, amine secundare pe ciclu imidazol 0,3 mol, C=NH 3,5 mol), grupare hidroxil 13 mol (grupări hidroxil alifatice 12 mol, grupări hidroxil fenolice 0,15 mol).

Table 4: Continued
Tabelul 4: Continuare

	Activity group <i>Grupă de activitate</i>	mol/mol collagen protein <i>Proteină colagenică mol/mol</i>
Hydroxyl group <i>Grupare hidroxil</i>	Aliphatic primary hydroxyl group <i>Grupări hidroxil primare alifatice</i>	2.8
	Aliphatic secondary hydroxyl group <i>Grupări hidroxil secundare alifatice</i>	1.3
	Secondary hydroxyl group in five membered ring <i>Grupări hidroxil secundare într-un ciclu cu cinci atomi</i>	7.9
	Phenolic hydroxyl group <i>Grupări hidroxil fenolice</i>	0.15
	Carboxyl group <i>Grupare carboxil</i>	10

CONCLUSION

Collagen was got by hydrolysis of alkaline and cycle method from cowhide leather solid waste with chrome. Then different molecular weight ranges of collagen were got by ultrafiltration. Collagen was characterized by High Performance Liquid Chromatography and Multi-angle Laser Scattering meter and the average molecular weight was got, based on that the average molecular structure model was established. The study has resolved the problem of collagen raw material with composition complex and difficult to characterize which will provide the theory basis for the modification research of collagen.

Acknowledgements

The authors wish to thank National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Project No.2011AA06A108; National Natural Science Foundation of Republic of China (Project No.21146003) and Executive Agency for Higher Education, Research, Development and Innovation Funding (UEFISCDI) of Romania (Project number 504 CB/2011) for financial support.

CONCLUZII

Colagenul s-a obținut prin hidroliza alcalină ciclică din deșeuri solide de piele bovină cromată. Apoi, prin ultrafiltrare s-au obținut fracțiuni cu diferite intervale de masă moleculară a colagenului. Colagenul a fost caracterizat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță și spectroscopie cu dispersie de lumină cu unghiuri multiple, obținându-se masa moleculară medie, iar pe baza acesteia s-a stabilit modelul de structură moleculară medie. Studiul a rezolvat problema colagenului ca materie primă cu o compoziție complexă și dificil de caracterizat și va oferi o bază teoretică pentru cercetările privind modificarea colagenului.

Mulțumiri

Autorii doresc să mulțumească Programului Național de Cercetare și Dezvoltare în Domeniul Înaltelor Tehnologii al Chinei (Program 863) (proiect nr. 2011AA06A108); Fundația Națională a Științelor Naturii din Republica Chineză (proiect nr. 21146003) și Unității Executive pentru Finanțarea Învățământului Superior, Cercetării, Dezvoltării și Inovării (UEFISCDI) din România (proiect nr. 504 CB/2011) pentru sprijinul financiar acordat.

REFERENCES

1. Albu, M., Ferdes, M., Giurginca, M., Chelaru, C., Constantinescu, R., Ghica, M.V., The Activity of Some Enzymes on Type I Fibrillar Collagen, *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2011**, 11, 3, 191-200.
2. Albu, M.G., Titorencu, I., Chelaru, C., The Stability of Some Collagen Hydrogels, *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2011**, 11, 1, 11-20.
3. Albu, M.G., Ficai, A., Lungu, A., Preparation and Characterization of Collagen Matrices Obtained at Different Freezing Temperatures, *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2010**, 10, 3, 39-50.
4. Ding, Z., Yu, S., Zhang, W. et al., "Preparation and Application of amino resin modified collagen protein retanning and filling agent", *China Leather*, 36, 9, **2007**, 54-57.
5. Liu, K., Ding, Z., Tang, K., "Study on the collagen modified polyurethane finishing agent for leather", *China Leather*, 36, 19, **2007**, 37-40.
6. Xu, Y., Sun, J., Pang, X., Ding, Z., "Mechanism of Polyurethane Modified Collagen and its Application (III)—retanning and filling agent of polyurethane modified collagen protein", *China Leather*, 39, 5, **2010**, 12-14.
7. Zhao, S., "Study on the collagen extracted by enzyme from fresh pigskin", *Science and Technology of Food Industry*, 5, **1998**, 16-17.