REVISTA

DE PIELĂRIE ÎNCĂLŢĂMINTE

Leather and Footwear Journal

December / Decembrie 2016
Volume / Volumul 16
Issue / Ediția 4

INCDTP - SUCURSALA INSTITUTUL DE CERCETĂRI PIELĂRIE ÎNCĂLȚĂMINTE
INCDTP - DIVISION: LEATHER AND FOOTWEAR RESEARCH INSTITUTE

PIELĂRIE/LEATHER ÎNCĂLŢĂMINTE/FOOTWEAR BUNURI DE CONSUM DIN CAUCIUC/RUBBER GOODS

AIMS AND SCOPE

REVISTA DE PIELARIE INCALTAMINTE aims to present current science and technology developments and initiatives in Romania and South Eastern Europe region. The Journal publishes original research papers of experimental and theoretical nature, followed by scientific, technical, economic and statistic information, reviews of local and foreign conferences, congresses, symposia, with the purpose of stimulating the dissemination of research results.

REVISTA DE PIELARIE INCALTAMINTE focuses particular attention on the key areas of new systems and technologies applied in leather, footwear and rubber goods sectors; biomaterials, collagen-based medical devices, biochemistry of collagen; environment; innovation; leather and parchment cultural heritage; management and marketing, quality assurance; applications of IT field in these sectors, and other related fields.

JOURNAL SPONSORSHIP

Edited with the sponsorship from the Ministry of Education, Research and Innovation of Romania, National Authority for Scientific Research. We are pleased to acknowledge support from the following: The Confederation of National Associations of Tanners and Dressers of the European Community – COTANCE, Belgium; Romanian Leather and Fur Producers Association, APPBR, Romania; Light Industry Owner's Federation – FEPAIUS, Romania.

COPYRIGHT

INCDTP – DIVISION: LEATHER AND FOOTWEAR RESEARCH INSTITUTE, 93 Ion Minulescu St., postal code 031215, sector 3, Bucharest, Romania, Europe.

ABSTRACTING AND INDEXING

REVISTA DE PIELARIE INCALTAMINTE is acknowledged in Romania by the National University Research Council (CNCSIS) in Category B+, and is indexed in Chemical Abstracts Service (CAS) Database, USA, CAB Database (CAB International, UK), Elsevier's Compendex and SCOPUS, EBSCO, CiteFactor and AcademicKeys.

SUBSCRIPTIONS

REVISTA DE PIELARIE INCALTAMINTE (Print ISSN 1583-4433) is published 4 times a year, by Leather and Footwear Research Institute (ICPI) Bucharest, Romania, Division of The National Research and Development Institute for Textiles and Leather (INCDTP).

The subscription rates are 160 EURO for companies and 100 EUR for individual subscribers, and the rate for a single issue is 40 EUR. Subscriptions (include mailing costs) can be made at the editorial office, to the following address:

INCDTP – DIVISION: LEATHER AND FOOTWEAR RESEARCH INSTITUTE, 93 Ion Minulescu Street, postal code 031215, sector 3, Bucharest, Romania, Europe, or by order in the following account:

Account holder: INCDTP – Division: Leather and Footwear Research Institute; Address of the account holder: 93 Ion Minulescu Street, postal code 031215, sector 3, Bucharest, Romania, Europe

IBAN Code: RO25 RNCB 0074029208380005

Bank code: 300413024

Swift bank address: RNCBROBU; Bank: BCR sector 3 (ROMANIAN COMMERCIAL BANK – SECTOR 3); Bank address: 11 Decebal Blvd., Bl. S14, sector 3, Bucharest, Romania.

CORRESPONDENCE

Editor in Chief – Dr. Viorica Deselnicu

INCDTP – Division: Leather and Footwear Research Institute (ICPI), 93, Ion Minulescu Street, Bucharest, sector 3, postal code 031215, Romania, Europe; tel./fax: + 40 21 323 52 80, e-mail: jlfjournal@gmail.com

CERTEX Publishing House – Bucharest, 16 Lucreţiu Pătrăşcanu St., sector 3; Tel./ Fax: (0040) 21 340.55.15; certex@ns.certex.ro

Site: http://revistapielarieincaltaminte.ro

Pagină Facebook: http://www.facebook.com/LeatherFootwearJournal

SCOP ŞI OBIECTIVE

REVISTA DE PIELARIE INCALTAMINTE are ca scop prezentarea celor mai actuale contribuţii şi iniţiative în ştiinţă şi tehnologie din România şi Europa de Sud-Est. Revista publică lucrări de cercetare originale, cu caracter experimental şi teoretic, urmate de informaţii ştiinţifice, tehnice, economice şi statistice, informaţii despre conferinţe, congrese, simpozioane, cu scopul stimulării diseminării rezultatelor ştiinţifice.

REVISTA DE PIELARIE INCALTAMINTE abordează domenii cheie privind noile sisteme şi tehnologii aplicate în sectoarele pielărie, încălţăminte şi bunuri de consum din cauciuc; biomateriale, dispozitive medicale pe bază de colagen, biochimia colagenului; mediu; inovare; patrimoniu cultural din piele şi pergament; management şi marketing, asigurarea calităţii; aplicaţii IT în aceste sectoare, şi alte domenii conexe.

SUPORT ŞI SPONSORIZARE

Revista este editată cu sprijinul Ministerul Educaţiei, Cercetării şi Inovării din România, Autoritatea Naţională pentru Cercetare Ştiinţifică. Mulţumim pentru suport Confederaţiei Asociaţiilor Naţionale ale Tăbăcarilor şi Confecţionerilor din Comunitatea Europeană – COTANCE, Belgia; Asociaţiei Producătorilor de Piele şi Blană din România, APPBR, România; Federaţiei Patronale a Textilelor, Confecţiilor şi Pielăriei – FEPAIUS, România.

COPYRIGHT

INCDTP – SUCURSALA INSTITUTUL DE CERCETĂRI PIELĂRIE ÎNCĂLŢĂMINTE, Str. Ion Minulescu nr. 93, cod poştal 031215, sector 3, Bucureşti.

INDEXARE

REVISTA DE PIELARIE INCALTAMINTE este recunoscută în România de către Consiliul Naţional al Cercetării Ştiinţifice din Învăţământul Superior (CNCSIS), în Categoria B+, şi este indexată în baze de date internaţionale: Chemical Abstracts Service (CAS) Database, SUA, CAB Database (CAB International, UK), Compendex şi SCOPUS, EBSCO, CiteFactor şi AcademicKeys.

ABONAMENTE

REVISTA DE PIELARIE INCALTAMINTE (ISSN 1583-4433) apare trimestrial, fiind publicată de către Institutul Naţional de Cercetare - Dezvoltare Pentru Textile şi Pielărie (INCDTP) – Sucursala Institutul de Cercetare Pielărie - Încălţăminte (ICPI) Bucureşti, România.

Costul unui abonament este de 160 euro pentru societăţi comerciale, 100 euro pentru persoane fizice, iar preţul unui singur număr este de 40 euro.

Abonamentele (includ cheltuieli de expediţie) se pot încheia la redacţie, pe adresa:

INCDTP – SUCURSALA INSTITUTUL DE CERCETĂRI PIELĂRIE ÎNCĂLŢĂMINTE

Str. Ion Minulescu nr. 93, cod poştal 031215, sector 3, Bucureşti, sau prin ordin de plată în următorul cont:

INCDTP – Sucursala Institutul de Cercetări Pielărie Încălţăminte

CUI 9342821

Cod IBAN: RO36 RNCB 0074029208380001 - BCR sector 3, Bucureşti, România.

CORESPONDENŢĂ

Editor Şef – Dr. Viorica Deselnicu

INCDTP – Sucursala Institutul de Cercetări Pielărie-Încălţăminte, Str. Ion Minulescu nr. 93, cod poştal 031215, sector 3, Bucureşti, Tel./fax: + 40 21 323 52 80, e-mail: jlfjournal@gmail.com

Editura CERTEX – Bucureşti, Str. Lucreţiu Pătrăşcanu nr. 16, sector 3; Tel./ Fax: (0040) 21 340.55.15; certex@ns.certex.ro

Website: http://revistapielarieincaltaminte.ro

Facebook page: http://www.facebook.com/LeatherFootwearJournal

REVISTA DE PIELĂRIE ÎNCĂLŢĂMINTE LEATHER AND FOOTWEAR JOURNAL

EDITOR IN CHIEF
Dr. Viorica DESELNICU
Scientific Secretary
INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, Bucharest

EDITOR
Dr. Luminita ALBU
Director
INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, Bucharest

EDITORIAL ASSISTANT
Dana GURAU
INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, Bucharest

EDITORIAL ADVISORY BOARD

Prof. Dr. Aurel ARDELEAN
Western University "Vasile Goldis" Arad
94-96 Revolutiei Blvd., 310025, Arad, Romania
Member of the Romanian Academy of Medical Sciences, Member of Academy of Science, New York
Tel./Fax: +40 257 28 03 35
e-mail: rectorat@uvvg.ro

Prof. Dr. Altan AFSAR
Ege University Faculty of Engineering
Leather Engineering Department
35100, Bornova, Izmir, Turkey
Tel: + 90 232-3884000/2644; Fax: +90 232 342 53 76
e-mail: altan.afsar@ege.edu.tr

Prof. Dr. Viaceslav BARSUKOV
National University of Technology & Design
2, Nemyrovych-Danchenko Str., Kiev, Ukraine
Tel./Fax: +380 (44) 290-05-12
e-mail: chemi@mail.vtv.kiev.ua

Assoc. Prof. Dr. Mehmet Mete MUTLU
Ege University, Faculty of Engineering
Leather Engineering Department,
35100 Bornova, Izmir, Turkey
Tel.: +90 232 3880110 – 2644; Fax: + 90 232 342 53 76
e-mail: mete.mutlu@ege.edu.tr

Prof. Dr. Todorka Gancheva VLADKOVA
University of Chemical Technology and Metallurgy,
Bld. Kliment Ohridsky 8, Sofia, 1756, Bulgaria
e-mail: tgv@uctm.edu

Prof. Dr. Margareta FLORESCU
The Bucharest Academy of Economic Studies
6 Piata Romana, 010374, Bucharest, Romania
Tel.: +40 21 319 1900; + 40 21 319 1901
Fax: +40 21 319 1899
e-mail: icefaceus@yahoo.com

Assoc. Prof. Dr. Zenovia MOLDOVAN
University of Bucharest
90-92 Şos. Panduri, 050663, sector 5,
Bucharest, Romania
Tel.: +40 21 4103178/125
e-mail: z_moldovan@yahoo.com

Prof. Dr. Wuyong CHEN
National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University,
Chengdu 610065, Sichuan, P. R. China
Tel: +86-(0)28-85404462; +86-28-85405840
Fax: +86-28-85405237
e-mail: wuyong.chen@163.com

Dr. Ding ZHIWEN
China Leather & Footwear Industry Research Institute
18 Jiangtaixi Road, Chaoyang District,
Beijing, P. R. China, 100015
Tel: +86-10-13701315570
e-mail: ding-zhiwen@263.net

Prof. Dr. Aurelia MEGHEA
University "Politehnica" of Bucharest
1-7 Polizu, sector 1, 011061, Bucharest, Romania
Tel.: +40 021 212 99 52
e-mail: a_meghea@chim.upb.ro

Assoc. Prof. Dr. Sergiu Stelian MAIER
"Gh. Asachi" Technical University of Iasi
67 Dimitrie Mangeron Blvd., Iaşi, Romania
Tel.: +40 232 21 23 22; Fax: +40 232-21 16 67
e-mail: smaier@ch.tuiasi.ro

Dipl. Eng. Mariana VOICU
Ministry of Economy, Trade and Tourism
152 Calea Victoriei, sector 1, 010096, Bucharest, Romania
Tel. +4021/2025158; Fax: +4021/2025159
e-mail: Mariana_Voicu@minind.ro

Dipl. Eng. Dorel ACSINTE
Director of S.C PIELOREX S.A.
President of Romanian Leather and Fur Producers Association, APPBR
33 A, Prelungirea Sos. Giurgiului, Jilava, Ilfov, Romania
Tel. + 40 31 425 5556; Fax + 40 21 457 1018
e-mail: pielorexsa@yahoo.com, appb.ro@gmail.com

Prof. Dr. Aura MIHAI
"Gh. Asachi" Technical University of Iasi
67 Dimitrie Mangeron Blvd., Iaşi, Romania
Tel.: +40 232 21 23 22; Fax: +40 232-21 16 67
e-mail: amihai@tex.tuiasi.ro

Assoc. Prof. Dr. Dana Corina DESELNICU
University "Politehnica" of Bucharest
1-7 Polizu, sector 1, 011061, Bucharest, Romania
Tel.: +40 021 212 99 52
e-mail: dana.deselnicu@upb.ro

REVISTA DE PIELĂRIE ÎNCĂLŢĂMINTE LEATHER AND FOOTWEAR JOURNAL

Volume 16 No. 4 December / Decembrie 2016

CONTENTS / CUPRINS / SOMMAIRE

	CONTENTS	CUPRINS	SOMMAIRE	
Ersin ONEM **Gokhan CIN** **Ataman ALANKUS** **Hasan PEHLIVAN** **Mehmet Mete MUTLU**	Utilization of chestnut shell wastes as a dyeing agent for leather industry	Utilizarea cojilor de castane ca agent de vopsire pentru industria de pielărie	L'utilisation des coquilles de châtaignes comme agent de teinture pour l'industrie du cuir	257
Nan ZHOU **Jing YAN** **Wuyong CHEN** **Caibo HU** **Xiaoyan ZHANG**	Effects of daily used bags on biomechanics characteristic of elementary students	Influenţa rucsacurilor utilizate zilnic asupra caracteristicilor biomecanice ale elevilor din învăţământul primar	Les effets des sacs à dos utilisés quotidiennement sur les caractéristiques biomécaniques des élèves de l'enseignement primaire	265
Gözde TURHAN BİLGİ **Binnur MERİÇLİ YAPICI** **Sadi Turgut BİLGİ**	Phylogenetic identification of two extremely halophilic archaeon isolated from raw hide and investigation of their lipolytic activities	Identificarea filogenetică a două archaea extrem halofile izolate din piei crude şi investigarea activităţilor lipolitice ale acestora	L'identification phylogénétique de deux archées extrêmement halophiles isolées de la peau et l'investigation sur leurs activités lipolytiques	275
Jinghui ZHANG **Jinlong LIU** **Bo XU** **Wuyong CHEN** **Jianxin WU** **Jin ZHOU**	Influence of walking direction on the intra-limb coordination of healthy children aged between three and six	Influenţa direcţiei de mers asupra coordonării membrelor inferioare la copiii sănătoşi cu vârste între trei şi şase ani	L'influence de l'orientation de marche sur la coordination entre les membres chez les enfants sains âgés entre trois et six ans	289
Eylül KÜÇÜKAKIN **Arife Candaş ADIGÜZEL ZENGIN** **Remziye DEVECI** **Nilay ÖRK** **Gökhan ZENGIN** **Behzat Oral BITLISLI**	Histological, histochemical and chemical study on *Katsuwonus pelamis* fish skins	Studiu histologic, histochimic şi chimic al pielii de peşte din specia *Katsuwonus pelamis*	L'étude histologique, histochimique et chimique sur les peaux de poissons *Katsuwonus pelamis*	299
	National and International Events	Evenimente interne și internaționale	Evénements nationaux et internationaux	313

UTILIZATION OF CHESTNUT SHELL WASTES AS A DYEING AGENT FOR LEATHER INDUSTRY

UTILIZAREA COJILOR DE CASTANE CA AGENT DE VOPSIRE PENTRU INDUSTRIA DE PIELĂRIE

Ersin ONEM, Gokhan CIN, Ataman ALANKUS, Hasan PEHLIVAN, Mehmet Mete MUTLU*

Ege University, Faculty of Engineering, Department of Leather Engineering, 35100, Izmir, Turkiye, e-mail: deri@mail.ege.edu.tr

UTILIZATION OF CHESTNUT SHELL WASTES AS A DYEING AGENT FOR LEATHER INDUSTRY

ABSTRACT. In this study, extraction of dyestuff from chestnut shell wastes and dyeing properties were investigated. Firstly, feed/solvent (F/S): 1/10-1/20 (g/ml), time: 1-2 h, solvent: water, water+NaOH (2.5%, 5%, 10%) parameters at 90°C were examined for the extraction of chestnut shell. 43.61% extraction yield was obtained in water+10% NaOH, F/S: 1/10 at 90°C for 1 hour as optimum parameters. Chestnut shell extract produced in optimum conditions was used as a dyeing agent in leather process. Potassium aluminium sulphate [$KAl(SO_4)_2.12H_2O$], copper sulphate [$CuSO_4.5H_2O$] and Ferro sulphate [$FeSO_4.7H_2O$] mordants were used after dyeing process to increase the fastness properties of leather. Rub, perspiration and light fastnesses were examined on the dyed leathers. Colour measurements of leathers were also carried out with Konica Minolta CM-3600d spectrophotometer. Mordants did not show significant effect on colour but fastness values varied by the used mordant types.
KEY WORDS: leather, dyeing, dyestuff, chestnut shell, valorisation, extract, waste

UTILIZAREA COJILOR DE CASTANE CA AGENT DE VOPSIRE PENTRU INDUSTRIA DE PIELĂRIE

REZUMAT. În acest studiu, s-a investigat extracția colorantului din coji de castane și proprietățile de colorare ale acestuia. Pentru a obține extractul din coji de castane, s-au examinat mai întâi parametri precum raportul substanță/solvent (F/S): 1/10-1/20 (g/ml), timpul: 1-2 h, solventul: apă, apă+NaOH (2,5%, 5%, 10%) la 90°C. S-a obținut un procent de extracție de 43,61% la parametrii optimi apă+NaOH, F/S: 1/10 la 90°C timp de 1 oră. Extractul din coji de castane obținut în condiții optime a fost utilizat ca agent de vopsire la prelucrarea pieilor. După procesul de vopsire s-au utilizat mordanți precum sulfat de potasiu și aluminiu [$KAl(SO_4)_2.12H_2O$], sulfat de cupru [$CuSO_4.5H_2O$] și sulfat de fier [$FeSO_4.7H_2O$] pentru a crește rezistența pieilor. S-a examinat rezistența la frecare, la transpirație și la lumină a pieilor vopsite. S-au efectuat măsurători de culoare cu spectrofotometrul Konica Minolta CM-3600d. Mordanții nu au avut un efect semnificativ asupra culorii, însă valorile rezistenței au variat în funcție de tipul de mordant utilizat.
CUVINTE CHEIE: piele, vopsire, colorant, coji de castane, valorificare, extract, deșeu

L'UTILISATION DES COQUILLES DE CHÂTAIGNES COMME AGENT DE TEINTURE POUR L'INDUSTRIE DU CUIR

RÉSUMÉ. Dans cette étude on a étudié l'extraction du colorant des coquilles de châtaignes et ses propriétés colorantes. Pour obtenir l'extrait de coquilles de châtaignes on a d'abord examiné des paramètres tels que le rapport substance/solvant (F/S): 1/10-1/20 (g/ml), temps: 1-2 heures, solvant: eau, eau+NaOH (2,5%, 5%, 10%) à 90°C. On a obtenu un taux d'extraction de 43,61% aux paramètres optimaux eau+NaOH, F/S: 1/10 à 90°C pendant 1 heure. L'extrait de coquilles de châtaignes obtenu dans des conditions optimales a été utilisé comme agent de coloration dans le traitement du cuir. Après la teinture, on a utilisé de mordants tel que le sulfate d'aluminium et de potassium [$KAl(SO_4)_2.12H_2O$], le sulfate de cuivre [$CuSO_4.5H_2O$], et le sulfate de fer [$FeSO_4.7H_2O$] pour augmenter la résistance du cuir. On a examiné la résistance des cuirs teints à l'abrasion, à la transpiration et à la lumière. On a effectué des mesures de couleur avec le spectrophotomètre Konica Minolta CM-3600d. Les mordants n'ont pas eu d'effet significatif sur la couleur, mais les valeurs de résistance varient en fonction du type de mordant utilisé.
MOTS CLÉS: cuir, teinture, colorant, coquilles de châtaignes, récupération, extraction, déchet

INTRODUCTION

Chestnut is a kind of fruit cultivated in Asia, Europe and America continents of the Northern Hemisphere and in South America partially. Asia is the most important region and China is the leader of Asia. Southern Europe and Turkey (Mediterranean countries) are the second important regions [1]. According to FAO statistics [2], the world's largest producers of chestnut are China (1,000,000 tons), South Korea (75,000 tons), Italy and Turkey (55,000 tons), and Japan (26,000 tons).

Chestnut shells are the waste product from chestnut food processing and have not been fully utilised to date. The glace chestnut industry produces each year a huge amount of chestnut shells as waste [3]. The shell, which represents around 10% by weight of the chestnut, is removed in the peeling

INTRODUCERE

Castanele sunt o specie de fructe cultivate în Asia, Europa, America de Nord și parțial în America de Sud. Asia este cea mai importantă regiune, iar China este liderul Asiei. Europa de Sud și Turcia (țările mediteraneene) se situează pe locul doi ca importanță [1]. Potrivit statisticilor FAO [2], cei mai mari producători mondiali de castane sunt China (1.000.000 tone), Coreea de Sud (75.000 tone), Italia și Turcia (55.000 tone) și Japonia (26.000 tone).

Cojile de castane sunt deșeuri rezultate în urma prelucrării castanelor pentru consum și nu sunt în prezent utilizate la potențial maxim. Industria de castane confiate produce anual o cantitate enormă de coji de castane considerate deșeuri [3]. Coaja, reprezentând aproximativ 10% din greutatea castanei, este înlăturată în procesul de decojire și

Correspondence to: Mehmet Mete MUTLU, Ege University, Faculty of Engineering, Department of Leather Engineering, 35100, Izmir, Turkiye, Tel.: +90 232 311 2644, e-mail: mete.mutlu@ege.edu.tr

process and used as fuel in the industry. These shells contain a large quantity of brown pigment which is mainly used in the food industry, where it is gradually replacing caramel pigment, with some toxicity at high concentrations [4]. Chestnut wood tannins are also of the most common hydrolyzable tannins used in leather industry as vegetable tanning agent [5].

Current arguments, environmental concerns, and related legal regulations have increased the demand for natural products in leather industry, similar to those of other branches. Research studies conducted in this context are becoming more crucial and valuable day by day to ensure environmental standards compliance. Research on utilization of 100% natural products as substitutes of chemical products widely used in the past are gradually gaining higher importance [6].

The prohibition of certain dyestuffs in the leather industry is also being contemplated as various regulatory frameworks worldwide are implemented. For example, the use of certain azo-dyes has been prohibited because they are difficult to biologically decompose and are known to constitute potential toxicity in living organisms [7]. The restrictions on the waste waters containing inorganic dyestuffs also impel the researchers to use natural dyestuffs. With the employment of various mordants, non-pollutant natural dyestuffs are convenient for obtaining a wide range of colours and good fastnesses [8]. In this study, optimum extraction yield of chestnut shell from the industrial wastes, dyeing of leather with the extract-mordant combinations and fastness properties of the dyed leathers were researched.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Chestnut shells as an industrial waste were supplied from a chestnut sweet producing food company in Turkey. Domestic wet-blue sheep skins were used as the leather material. Mordants of potassium aluminium sulphate [$KAl(SO_4)_2.12H_2O$], copper sulphate [$CuSO_4.5H_2O$] and Ferro sulphate [$FeSO_4.7H_2O$] were obtained from Borkim Chemicals (Turkey).

Methods

Moisture Content of the Shells and Ash Content of the Extract

Moisture content of the shells was determined according to SLC 113 standard method [9]. Ash contents of the extract were done to TS 4125 EN ISO

utilizată în industrie pentru combustibil. Aceste coji conțin o mare cantitate de pigment maro, utilizat în principal în industria alimentară, unde înlocuiește treptat pigmentul pe bază de caramel, care este toxic în concentrații mari [4]. De asemenea, taninurile pe bază de lemn de castan se numără printre cele mai uzuale taninuri hidrolizabile utilizate în industria de pielărie ca agent tanant de origine vegetală [5].

Argumentele actuale, preocupările legate de mediu și reglementările locale au dus la creșterea cererii de produse naturale în industria de pielărie, precum și în alte ramuri ale industriei. Studiile efectuate în acest context capătă pe zi ce trece o importanță și o valoare din ce în ce mai mare, în vederea asigurării conformității cu standardele de mediu. Cercetările privind utilizarea unor produse 100% naturale ca înlocuitori pentru produsele chimice utilizate pe scară largă în trecut capătă importanță din ce în ce mai mare [6].

Se are în vedere, de asemenea, interzicerea anumitor coloranți în industria de pielărie, pe măsură ce se pun în practică diverse cadre de reglementare la nivel mondial. De exemplu, utilizarea anumitor coloranți azoici a fost interzisă deoarece se descompun biologic foarte greu și sunt cunoscuți pentru toxicitatea potențială pentru organismele vii [7]. Restricțiile privind apele uzate cu conținut de coloranți anorganici îndeamnă cercetătorii să utilizeze coloranți naturali. Utilizați în combinație cu diferiți mordanți, coloranții naturali nepoluanți sunt convenabili pentru obținerea unei game largi de culori și unor rezistențe superioare [8]. În acest studiu, s-au investigat randamentul optim de extracție al cojilor de castane din deșeuri industriale, vopsirea pieilor cu combinații extract-mordant și proprietățile de rezistență ale pieilor vopsite.

MATERIALE ȘI METODE

Materiale

Cojile de castane ca deșeu industrial au fost furnizate de către o companie producătoare de dulciuri din Turcia. S-au utilizat piei de oaie tăbăcite în crom din surse locale. Mordanții utilizați, sulfat de potasiu și aluminiu [$KAl(SO_4)_2.12H_2O$], sulfat de cupru [$CuSO_4.5H_2O$] și sulfat de fier [$FeSO_4.7H_2O$], au fost furnizați de Borkim Chemicals (Turcia).

Metode

Conținutul de umiditate al cojilor și conținutul de cenușă al extractului

Conținutul de umiditate al cojilor a fost determinat conform metodei standard SLC 113 [9]. Conținutul de cenușă al extractului a fost determinat conform standardului TS 4125 EN ISO 4047 [10]. Experimentele au fost efectuate în duplicat, făcându-

4047 standard [10]. The experiments were done in duplicate and average contents were determined.

Extraction of Chestnut Shells

Chestnut shells were crushed and dried before the extraction processes. Extractions were performed by using distilled water as solvent. 10g (±0.05) sample was used for each run. Temperature was kept constant at 90°C for the extractions and parameters of F/S: 1/10-1/20 g/ml, time: 1-2 h and combination of water+NaOH were examined. Chestnut shell and water mixed at room temperature, heated and, once the selected temperature was attained, the alkali was added and contact time begun to run.

The extraction solutions were collected and filtered using a Whatman filter paper (no. 1) and then dried in an air oven at 90°C. The extraction experiments were repeated two times.

Extraction Yield

10 ml of samples were taken from the extract solution into clean, dried and weighed glass dishes, in order to determine amount of carried solid matter into extraction medium. The extracts were dried in a hot-air oven (100±2°C) until all the water evaporated and only the solid matter was left. The dishes were then cooled in a desiccator and weighed, in this way, the amount of solid matter was determined.

Dyeing Process of Leather

Process of wet-blue skins was given in Table 1. Skins were processed with the chestnut shell extract and then mordanted for dyeing. A group of leather samples were dyed with only extract without mordanting.

se o medie a valorilor obținute.

Obținerea extractului din coji de castane

Cojile de castane au fost zdrobite și uscate înainte de procesele de extracție. Extracțiile au fost efectuate utilizând apă distilată ca solvent. S-au utilizat 10g (±0,05) de probă pentru fiecare test. Temperatura s-a menținut constantă la 90°C pentru extracții și s-au determinat parametrii F/S: 1/10-1/20 g/ml, timp: 1-2 h și combinația apă+NaOH. Cojile de castane și apa s-au amestecat la temperatura camerei, s-au încălzit și, odată ce s-a atins temperatura selectată, s-a adăugat baza și s-a măsurat timpul de contact.

S-au colectat și filtrat soluțiile de extracție utilizând hârtie de filtru Whatman (nr. 1), apoi s-au uscat în cuptor cu aer la 90°C. Experimentele de extracție s-au realizat de două ori.

Randament de extracție

S-au prelevat 10 ml de probă din soluția de extract și s-au depus în vase de sticlă curate, uscate și cântărite, pentru a determina cantitatea de materie solidă în mediul de extracție. S-au uscat extractele într-un cuptor cu aer cald (100±2°C) până ce s-a evaporat toată apa și a rămas doar materia solidă. Apoi vasele au fost răcite într-un exsicator și s-au cântărit, determinând astfel cantitatea de materie solidă.

Procesul de vopsire a pielii

Procesul de fabricare a pieilor cromate este prezentat în Tabelul 1. Pieile au fost prelucrate cu extract de coajă de castane și apoi tratate cu mordant pentru vopsire. O parte din probele de piele au fost vopsite doar cu extract, fără tratare cu mordant.

Table 1: Leather dyeing process
Tabelul 1: Procesul de vopsire a pielii

Process *Proces*	%	Substance *Substanță*	Temperature (°C) *Temperatură (°C)*	Time (min.) *Timp (min.)*	Remarks *Observaţii*
Washing *Spălare*	100	Water *Apă*	30		
	0.5	Formic acid *Acid formic*		45	Drain *Scurgere*
Neutralisation *Neutralizare*	100	Water *Apă*	35		
	1	Sodium formate *Formiat de sodiu*		10	
	1	Sodium bicarbonate *Bicarbonat de sodiu*		3x15+45	pH: 5.0-5.2, drain *pH: 5,0-5,2, scurgere*
Washing *Spălare*	300	Water *Apă*	35	10	Drain *Scurgere*
Dyeing-fatliquoring-retanning *Vopsire-ungere-retăbăcire*	100	Water *Apă*	40		

	5	Dyestuff *Vopsea*		60	
	1	Mordant* *Mordant**		45	
	8	Combined natural and synthetic fatliquor *Agent de ungere combinat natural şi sintetic*		60	
	2	Phenolic syntan *Sintan fenolic*		20	
	2	Synthetic tanning agent *Agent tanant sintetic*		20	
	1	Formic acid *Acid formic*		3x15+45	Drain *Scurgere*
Washing *Spălare*	300	Water *Apă*	20	10	Drain *Scurgere*

** Potassium aluminium sulphate, copper sulphate and ferro sulphate.*

Colorimetric Measurements

Konica Minolta CM-3600d brand spectrophotometer has been used for measuring the colours of the leather samples which were processed with plant extracts, and how each extract changes the leather colour has been examined compared to the control sample. The colour differences between the control sample and the leathers processed with plant extracts have been calculated according to CIE Lab-76 colour difference formula [11].

Rub, Perspiration and Light Fastnesses

Analyses of rub, perspiration and light fastness were carried out using standard procedures [12-14] and grey scale was used for the assessment of colour change.

RESULTS AND DISCUSSION

Average moisture content of the shell was determined as 13.15% before the extractions. Vázquez *et al.* reported an increase from 70 to 90°C implied an increase in the extraction yield more significant for chestnut shell [5]. Thus, temperature was kept constant at 90°C in our study, and effects of NaOH addition into water, F/S ratio and time were investigated. Extraction yield results of chestnut shell were given in Table 2.

** Sulfat de potasiu și aluminiu, sulfat de cupru și sulfat de fier.*

Măsurători colorimetrice

S-a utilizat spectrofotometrul Konica Minolta CM-3600d pentru măsurarea culorilor probelor de piele prelucrate cu extracte vegetale și s-a examinat modul în care fiecare extract modifică culoarea pielii în comparație cu proba martor. Diferențele de culoare dintre proba martor și probele de piele prelucrate cu extracte vegetale s-au calculat utilizând formula diferenței de culoare din recomandările CIE Lab-76 [11].

Rezistența la frecare, transpirație și lumină

Analizele de rezistență la frecare, transpirație și lumină s-au efectuat utilizând proceduri standard [12-14], utilizându-se scara de gri pentru a evalua modificarea culorii.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul mediu de umiditate al cojilor a fost determinat la 13,15% înainte de extracție. Vázquez și colab. au raportat o creștere de la 70 la 90°C, ceea ce presupune o creștere semnificativă a randamentului de extracție din cojile de castane [5]. Astfel, în studiul nostru, temperatura s-a menținut constantă la 90°C și s-au investigat efectele adăugării NaOH în apă, raportul F/S și timpul. Rezultatele randamentului de extracție din cojile de castane sunt prezentate în Tabelul 2.

Table 2: Effect of the parameters on extraction yield
Tabelul 2: Influenţa parametrilor asupra randamentului de extracţie

Extraction parameters *Parametri de extracţie*	Temperature (°C) *Temperatură (°C)*	Solvent *Solvent*	Feed/ Solvent (g/ml) *Raport substanţă/ solvent (g/ ml)*	Time (h) *Timp (h)*	Extraction yield (%) *Randament de extracţie (%)*
EP1	90	Water *Apă*	1/20	2	9.72
EP2	90	Water *Apă*	1/10	2	11.79
EP3	90	Water *Apă*	1/10	1	11.71
EP4	90	Water+2.5% NaOH *Apă+2,5% NaOH*	1/10	1	30.16
EP5	90	Water+5% NaOH *Apă+5% NaOH*	1/10	1	35.36
EP6	90	Water+10% NaOH *Apă+10% NaOH*	1/10	1	43.61

F/S: 1/10 and 1/20 ratios did not show significant differences (EP1, EP2). EP2 and EP3, time of 1 and 2 hour did not differ for the extraction yield. After reaching these results, parameters of F/S: 1/10 and time: 1 h were kept constant and effect of NaOH addition into water was examined. The maximum extraction yield from chestnut shell with the value of 43.61% was obtained in parameter of EP6. Addition of 10% NaOH into water was increased the solubility and extraction yield was increased. After determination of maximum response, chestnut shell extracts were produced under the conditions of EP6 and collected extracts were used in dyeing process of the skins. Ash content of the extract produced in optimum conditions was found to be 26.27%.

The colour values of dyed and mordanted leathers were analysed spectrophotometrically and provided in Table 3.

Rapoartele F/S: 1/10 și 1/20 nu au prezentat diferențe semnificative (EP1, EP2). EP2 și EP3, cu timpii de două ore, respectiv o oră nu au prezentat diferențe în ceea ce privește randamentul de extracție. După obținerea acestor rezultate, raportul F/S: 1/10 și timpul: 1 h s-au menținut constanți și s-a examinat influența adăugării NaOH în apă. Randamentul maxim de extracție din coji de castane cu valoarea de 43,61% a fost obținut în cazul experimentului EP6. Adăugarea a 10% NaOH în apă a crescut solubilitatea și, prin urmare și randamentul de extracție. După determinarea răspunsului maxim, extractele de coji de castane au fost obținute în condițiile EP6, iar extractele colectate au fost utilizate în procesul de vopsire a pieilor. Conținutul de cenușă al extractului obținut în condiții optime a fost de 26,27%.

Culoarea pieilor vopsite și tratate cu mordant a fost determinată spectrofotometric și valorile obținute sunt prezentate în Tabelul 3.

Table 3: L, a, b values of dyed and mordanted leathers
Tabelul 3: Valorile L, a, b ale pieilor vopsite şi tratate cu mordant

No *Nr. crt.*	Mordants *Mordant*	*L*	*a*	*b*
1	Dyestuff extract *Extract colorant*	39.25	10.74	18.16
2	Extract + Potassium aluminium sulphate *Extract + Sulfat de potasiu şi aluminiu*	42.10	9.82	17.65
3	Extract + Copper sulphate *Extract + Sulfat de cupru*	37.57	9.54	15.77
4	Extract + Ferro sulphate *Extract + Sulfat de fier*	38.16	8.00	13.70

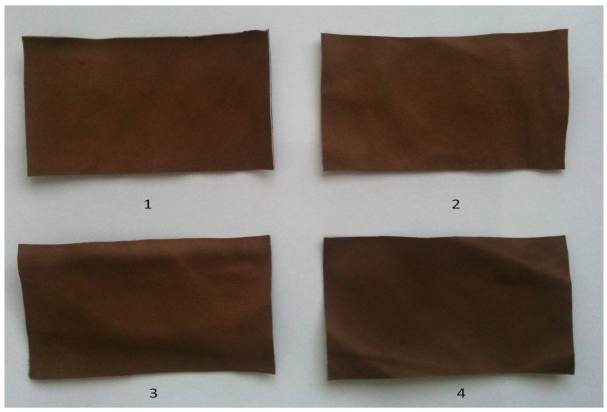

Figure 1. Appearance of dyed and mordanted leathers
Figura 1. Aspectul pieilor vopsite şi tratate cu mordant

It can be seen from the Figure 1 that mordants did not affect the colour of the leathers because chestnut shell extract gave dark brown colour. Potassium aluminium sulphate slightly increased the lightness of the leather with the 42.10 *L* value, and other mordants slightly decreased the *L* values of the colours. Rub, perspiration and light fastnesses of the leathers dyed with chestnut shell extract and are seen in Tables 4-6.

Se poate observa din Figura 1 că mordanții nu au afectat culoarea pieilor, întrucât extractul din coji de castane a conferit o culoare maronie închisă. Sulfatul de potasiu și aluminiu a crescut ușor luminozitatea pielii, la valoarea *L* de 42,10, iar ceilalți mordanți au scăzut ușor valoarea *L* a culorilor. Valorile rezistenței la frecare, la transpirație și la lumină a pieilor vopsite cu extract din coji de castane sunt prezentate în Tabelele 4-6.

Table 4: Rub fastnesses of dyed and mordanted leathers
Tabelul 4: Rezistenţa la frecare a pieilor vopsite şi tratate cu mordant

Process *Proces*	Leather *Piele - faţă*		Felt *Piele - carne*	
	Dry rubbing *Frecare uscată*	Wet rubbing *Frecare umedă*	Dry rubbing *Frecare uscată*	Wet rubbing *Frecare umedă*
Extract (Unmordanted) Extract (fără mordant)	4	4	4/5	4
Extract + Potassium aluminium suphate *Extract + Sulfat de potasiu şi aluminiu*	4/5	4/5	5	5
Extract + Copper sulphate *Extract + Sulfat de cupru*	4/5	4/5	4/5	4/5
Extract + Ferro sulphate *Extract + Sulfat de fier*	5	4/5	5	5

Gray Scale for color change: 5: no change, 4: slight, 3: noticeable, 2: considerable, and 1: much.

Scara de gri pentru modificarea culorii: 5: nemodificat, 4: modificare uşoară, 3: modificare vizibilă, 2: modificare considerabilă şi 1: modificare pronunţată.

Table 5: Perspiration fastness on grain (G) and flesh (F) sides of leathers
Tabelul 5: Rezistenţa la transpiraţie pe laturile de faţă şi de carne ale pielii

Process *Proces*	Color change *Modificarea culorii*		Staining *Colorare*											
	Grain side *Faţă*	Flesh side *Carne*	Cellulose acetate *Acetat de celuloză*		Cotton *Bumbac*		Nylon 6.6 *Nylon 6.6*		Polyester *Poliester*		Acrylic *Acril*		Wool *Lână*	
			G	F	G	F	G	F	G	F	G	F	G	F
Extract	4/5	4/5	4/5	4	4	3/4	3/4	3/4	4	4	4	4	4/5	4

Extract+PAS	4/5	4/5	4/5	4	4	3/4	4	3/4	4/5	4	4/5	4	4/5	4
Extract+CS	5	4/5	5	4/5	4	3/4	4	3/4	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5
Extract+FS	5	5	5	5	4/5	4/5	4/5	4/5	5	4/5	5	5	5	4/5

PAS: potassium aluminium sulphate, CS: copper sulphate, FS: ferro sulphate.

PAS: sulfat de potasiu și aluminiu, CS: sulfat de cupru, FS: sulfat de fier.

Table 6: Light fastness values of dyed leathers
Tabelul 6: Valorile rezistenței la lumină a pieilor vopsite

Process *Proces*	Light fastness *Rezistența la lumină*
Extract	3
Extract+PAS	3/4
Extract+CS	3/4
Extract+FS	4

Although mordant applications did not affect the colour of the leathers, they increased the fastness values compared to unmordanted leathers. The best rub fastness was obtained with ferro sulphate mordant and dry rubbing of the leathers was relatively better than wet rubbing. Perspiration fastnesses on the grain and flesh sides of leathers did not considerably differ, but ferro sulphate gave the best fastness values again for both perspiration and light fastness. Onem *et al.* also reported that the highest rub, perspiration and light fastnesses of the leathers dyed with *Rubia tinctorum* extract were obtained with FS mordant [8]. Ozgunay determined the light fastness of chestnut tannin as hydrolysable tannin better than condensed tannins [15]. Light fastness of chestnut shell extract was found as 3 in this study and increased to 4 with FS mordant. Onem *et al.* researched the dyeing properties of the extract from onion skins (*Allium cepa*) as a natural dyeing agent [16]. Chestnut shell extract showed better light fastness properties than *Allium cepa* on leather. For textile industry, Wang *et al.* [4] purposed to develop an environmentally friendly dyeing process using brown pigment from chestnut shells obtained from foodstuff residues. The brown pigment was extracted from the raw material and purified with solvents containing EtOH. It was then used to dye flax fabric in aqueous solution with added NaCl as a dye accelerator. The effects of dyeing conditions and fastness were investigated. The dyed fabrics showed lower fastness to washing and higher fastness to rubbing and light.

CONCLUSIONS

In this study, a waste product, chestnut shells from food industry, was converted to a usable product with an economic value, a natural dyestuff used

Deși utilizarea mordanților nu a afectat culoarea pieilor, aceștia au dus la creșterea valorilor de rezistență în comparație cu pieile netratate cu mordant. Cea mai bună rezistență la frecare a fost obținută la utilizarea mordantului pe bază de sulfat de fier, iar rezistența la frecare uscată a fost relativ mai bună decât rezistența la frecare umedă. Rezistența la transpirație pe partea de față și pe partea de carne nu a prezentat nicio diferență semnificativă, însă utilizarea sulfatului de fier a avut ca rezultat cele mai bune valori atât pentru rezistența la transpirație, cât și pentru rezistența la lumină. Onem și colab. au raportat, de asemenea, că cele mai mari valori ale rezistenței la frecare, la transpirație și la lumină a pieilor vopsite cu extract de *Rubia tinctorum* au fost obținute cu mordant pe bază de sulfat de fier [8]. Ozgunay a constatat că rezistența la lumină a pieilor tratate cu tanin hidrolizabil pe bază de castane este mai bună decât cea a pieilor tratate cu taninuri condensate [15]. Rezistența la lumină a pieilor tratate cu extract din coji de castane a avut valoarea 3 în acest studiu și a crescut până la 4 la utilizarea mordantului pe bază de sulfat de fier. Onem și colab. au studiat proprietățile de vopsire ale extractului din coji de ceapă (*Allium cepa*) ca agent de vopsire natural [16]. Pielea tratată cu extractul din coji de castane a prezentat proprietăți de rezistență la lumină mai bune decât cea tratată cu *Allium cepa*. În industria textilă, Wang și colab. [4] au dezvoltat un proces de vopsire ecologic utilizând pigment maro din coji de castane obținute din deșeuri din industria alimentară. Pigmentul maro a fost extras din materia primă și s-a purificat cu solvenți cu conținut de EtOH. S-a utilizat apoi la vopsirea țesăturii de in în soluție apoasă cu adaos de NaCl ca accelerator de vopsire. S-au investigat efectele condițiilor de vopsire și rezistența. Țesăturile vopsite au prezentat valori mai scăzute ale rezistenței la spălare și valori crescute ale rezistenței la frecare și lumină.

CONCLUZII

În acest studiu, s-a convertit un deșeu, cojile de castane din industria alimentară, într-un produs

in dyeing of leather. 43.61% extract was obtained after optimization studies in water+10% NaOH, F/S: 1/10 at 90°C for 1 hour. The chestnut dyestuff gave dark brown colour with *L*=39.25, *a*=10.74, *b*=18.16 values and the colour did not change much with mordant application. However the rub fastness, perspiration fastness and light fastness properties of leathers dyed with chestnut shell extract enhanced with the mordant usage. The dyeing properties of leathers were found acceptable and can be enhanced with different mordants and dyeing techniques. Considering that, in recent years there is a demand on usage of ecologic and natural products in the world, usage of environmental friendly vegetable dyeing agents and producing natural leathers and colours can be more advantageous to gain the admiration and attention of consumers.

utilizabil cu valoare economică, și anume un colorant natural utilizat la vopsirea pieilor. S-a obținut, după studii de optimizare, 43,61% extract în apă+10% NaOH, F/S: 1/10 la 90°C timp de 1 oră. Colorantul pe bază de coji de castane a conferit o culoare maronie închisă cu valorile *L*=39,25, *a*=10,74, *b*=18,16, iar culoarea nu s-a modificat vizibil la utilizarea mordanților. Pe de altă parte, proprietățile de rezistență la frecare, la transpirație și la lumină ale pieilor vopsite cu extract din coji de castane s-au îmbunătățit în cazul utilizării mordanților. Proprietățile de vopsire ale pieilor obținute au fost considerate acceptabile și pot fi îmbunătățire cu diferiți mordanți și tehnici de vopsire. Având în vedere că în ultimii ani există o mare cerere la nivel global de utilizare a produselor ecologice și naturale, utilizarea agenților de vopsire ecologici pe bază de plante și fabricarea pieilor naturale cu coloranți naturali poate fi mai avantajoasă în ceea ce privește atragerea admirației și atenției consumatorilor.

REFERENCES

1. Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrer, A.M., Diaz-Hernandez, M.B., Ciordia-Ara, M., Rios-Mesa, D., Chemical composition of chestnut cultivars from Spain, *Sci Hortic-Amsterdam*, **2006**, 107, 3, 306-314.
2. FAO: available at: http://faosat.fao.org/default.aspx, last access: January, **2014**.
3. Gómez, J., Pazos, M., Couto, S.R., Sanromán, M., Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by Coriolopsis rigida under solid-state conditions, *J Food Eng*, **2005**, 68, 3, 315-319.
4. Wang, L., Li, J., Feng, H., Dyeing of flax fabric with natural dye from chestnut shells, *Pigm Resin Technol*, **2009**, 38, 6, 347-352.
5. Vázquez, G., González-Alvarez, J., Santos, J., Freire, M.S., Antorrena, G., Evaluation of potential applications for chestnut (Castanea sativa) shell and eucalyptus (Eucalyptus globulus) bark extracts, *Ind Crop Prod*, **2009**, 29, 2-3, 364-370.
6. Adiguzel Zengin, C.A., Crudu, M., Maier, S.S., Deselnicu, V., Albu, L., Gulumser, G., Bitlisli, B.O., Basaran, B., Mutlu, M.M., Eco-leather: Chromium-free leather production using titanium, oligomeric melamine-formaldehyde resin, and resorcinol tanning agents and the properties of the resulting Leathers, *Ekoloji*, **2012**, 21, 82, 17-25.
7. Reife, A., Freeman, S., Environmental chemistry of dyes and pigments, John Wiley&Sons Inc., New York, **1996**.
8. Onem, E., Gulumser, G., Ocak, B., Evaluation of natural dyeing of leather with Rubia tinctorum extract, *Ekoloji*, **2011**, 20, 80, 81-87.
9. Official Methods of Analysis, SLC-113, Determination of moisture, Society of Leather Technologists and Chemists, **1996**.
10. TS 4125 EN ISO 4047, Leather - Determination of sulphated total ash and sulphated water - Insoluble ash. Turkish Standards Institution, Ankara, **2000**.
11. CIE (Comission Interantionalle DeL'Eclairage), Official recommendations on uniform colour spaces colour difference equations metric colour terms, **1976**.
12. TS EN ISO 11640, Leather - Tests for colour fastness - Colour fastness to cycles of to-and-fro rubbing. Turkish Standards Institution, Ankara, **2013**.
13. TS EN ISO 11641, Leather - Tests for colour fastness - Colour fastness to perspiration. Turkish Standards Institution, Ankara, **2013**.
14. International standard ISO 105-B02:2000/Amd.2.2000(E), **2000**, Color fastness to artificial light: Xenon arc fading lamp test.
15. Ozgunay, H., Lightfastness properties of leathers tanned with various vegetable tannins, *J Am Leather Chem As*, **2008**, 103, 10, 345-351.
16. Onem, E., Mutlu, M.M., Gunay, S., Azeri, H., Natural dyestuff extraction from onion (Allium cepa) skin and utilization for leather dyeing, *Tekstil ve Mühendis*, **2012**, 19, 88, 1-8.

Article received/Data primirii articolului: 19.08.2016
Accepted/Acceptat la data: 28.10.2016

EFFECTS OF DAILY USED BAGS ON BIOMECHANICS CHARACTERISTIC OF ELEMENTARY STUDENTS

INFLUENŢA RUCSACURILOR UTILIZATE ZILNIC ASUPRA CARACTERISTICILOR BIOMECANICE ALE ELEVILOR DIN ÎNVĂŢĂMÂNTUL PRIMAR

Nan ZHOU[1,2], Jing YAN[2], Wuyong CHEN[1*], Caibo HU[3], Xiaoyan ZHANG[2]

[1]National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu 610065, China

[2]Guangzhou Shiling Leather & Leather Products Investigation Center Co. Ltd, Guangzhou, 510850, China

[3]People's government of Shiling town, Huadu district, Guangzhou, 510850, China

EFFECTS OF DAILY USED BAGS ON BIOMECHANICS CHARACTERISTIC OF ELEMENTARY STUDENTS

ABSTRACT. In order to evaluate the effects on biomechanics characteristic of daily used bags of elementary students, we select three different types of marketable school bags (backpack A with shoulder cushion design, backpack B with shoulder-back cushion design and Japanese backpack C with bio-mechanics optimization design). The mFLEX, Codamotion and Footscan were used to measure shoulder pressure, back pressure, body posture and plantar pressure on 8 elementary students (male and female ratio 3 to 5) with different loads equivalent to 5%, 10%, 15%, 20% and 25% of their body weights. The results showed that the value of shoulder pressure, back pressure and trunk leaning angle change linearly with the load increasing, there is no significant impact of plantar pressure value. But, different bags significantly impacts on shoulder pressure and back pressure and body posture. Evaluation results showed that two optimization design bags (B and C) had no advantages on decreasing shoulder pressure, back pressure and trunk leaning angle.
KEY WORDS: loads, shoulder pressure, back pressure, body posture, plantar pressure, elementary students

INFLUENŢA RUCSACURILOR UTILIZATE ZILNIC ASUPRA CARACTERISTICILOR BIOMECANICE ALE ELEVILOR DIN ÎNVĂŢĂMÂNTUL PRIMAR

REZUMAT. Pentru a evalua influenţa rucsacurilor utilizate zilnic de elevii din învăţământul primar asupra caracteristicilor biomecanice, s-au selectat trei tipuri diferite de rucsacuri pentru şcoală din comerţ (rucsacul A cu pernuţe în zona umerilor, rucsacul B cu pernuţe în zona umerilor şi a spatelui şi rucsacul japonez C cu design de optimizare a biomecanicii). S-au utilizat sistemele mFLEX, Codamotion şi Footscan pentru a măsura presiunea în zona umerilor, presiunea în zona spatelui, poziţia corpului şi presiunea plantară la 8 elevi din învăţământul primar (raportul dintre băieţi şi fete a fost de 3 la 5), cu diferite sarcini echivalente cu 5%, 10%, 15%, 20% şi 25% din greutăţile corporale ale acestora. Rezultatele au arătat că valorile presiunii în zona umerilor, ale presiunii în zona spatelui şi unghiul de înclinaţie al corpului se modifică liniar odată cu creşterea sarcinii, însă nu există niciun impact semnificativ al valorii presiunii plantare. Cu toate acestea, diferitele tipuri de rucsacuri au un impact semnificativ asupra presiunii în zona umerilor, în zona spatelui şi asupra posturii corpului. Rezultatele evaluării au arătat că cele două rucsacuri cu design de optimizare (B şi C) nu au avut niciun avantaj în privinţa scăderii presiunii în zona umerilor, în zona spatelui sau asupra unghiului de înclinaţie al corpului.
CUVINTE CHEIE: sarcini, presiunea în zona umerilor, presiunea în zona spatelui, postura corpului, presiune plantară, elevi primari

LES EFFETS DES SACS À DOS UTILISÉS QUOTIDIENNEMENT SUR LES CARACTÉRISTIQUES BIOMÉCANIQUES DES ÉLÈVES DE L'ENSEIGNEMENT PRIMAIRE

RÉSUMÉ. Afin d'évaluer les effets des sacs à dos utilisés quotidiennement sur les caractéristiques biomécaniques des élèves de l'enseignement primaire, on a sélectionné trois types de sacs à dos d'école commerciaux (sac à dos A avec des coussins dans la région les épaules, sac à dos B avec des coussins dans les région des épaules et du dos et le sac à dos japonais C avec l'optimisation biomécanique). Les systèmes MFLEX, Codamotion et Footscan ont été utilisés pour mesurer la pression dans les régions des épaules et du dos, la posture du corps et la pression plantaire chez 8 élèves de l'enseignement primaire (le rapport entre les garçons et les filles était 3-5) avec de différentes charges équivalant à 5%, 10%, 15%, 20% et 25% de leur poids corporel. Les résultats indiquent que la pression dans les régions des épaules et du dos et l'angle d'inclinaison des corps changent linéairement avec l'augmentation de la charge, mais il n'y a pas d'impact significatif de la valeur de la pression plantaire. Cependant, les différents types de sacs à dos ont un impact significatif sur la pression dans les régions des épaules et du dos et sur la posture du corps. Les résultats de l'évaluation ont montré que les deux sacs à dos avec optimisation (B et C) n'ont eu pas d'avantage sur la diminution de la pression dans les régions des épaules, du dos ou sur l'angle d'inclinaison du corps.
MOTS CLÉS : charges, pression sur les épaules, pression sur le dos, posture corporelle, pression plantaire, élèves de l'enseignement primaire

INTRODUCTION

As a convenient way of load carriage, a schoolbag is necessary for primary school students in the daily use. Reports showed that teenagers' shoulder and back pain, scoliosis and psychosis were closely related to the weight of schoolbag [1-5]. Currently, more and more scholars focus on the influence of different loading ways and weight on the human body, including changes of body posture and gait [6, 7]. Reducing the bag weight was beneficial to reduce

INTRODUCERE

Rucsacul este utilizat zilnic de elevii din învățământul primar ca modalitate convenabilă de transportare a sarcinii. Rapoartele au arătat că durerile de umeri și de spate, scolioza și psihoza la adolescenți sunt strâns legate de greutatea rucsacului [1-5]. În prezent, din ce în ce mai mulți oameni de știință se concentrează asupra influenței diferitelor sarcini asupra corpului uman, inclusiv modificări ale posturii corpului și ale mersului [6, 7]. Reducerea greutății rucsacului duce la scăderea efectelor negative

* *Correspondence to: Wuyong CHEN, National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu 610065, China, wuyong.chen@163.com*

the adverse effects on the human body, bag structure and the center of gravity optimization, and it also could reduce the possible damage to some extent [8, 9]. Some studies have pointed out that bag's weight was not more than 10% of body weight [10-13], others said that 15% was the edge of security value [14]. At present, there is less research on the impacts of bio-mechanical effects on bags.

In the market, there are a great variety of schoolbags, mainly backpacks, trolley bags and shoulder bags. As the actual weight of schoolbag was overweight [8, 15], wearing single-shouldered and uneven loading bags might injure student body and lead to scoliosis [16]. Some studies indicated that symmetrical backpack should be chosen [17]. The trolley bag is a kind of "ease-burden" product, whose load-bearing mode was changed to avoid the physical injuries to the student, but the tray with wheels is weighty and not portable; therefore, the easy portable backpack is the most widely used now.

In this paper, the changes of shoulder pressure, back pressure, body posture and plantar pressure were studied in three different aspects-commercial backpacks with different weight. Besides, the harm of overweight and the influence of different structural bags were discussed to provide the scientific basis for the subsequent schoolbag design from the perspectives of bio-mechanics and physiology.

METHODS

Participants

Eight healthy students were selected from a local primary school to participate in this experiment. The students' conditions were stated as follows:

I. No foot operation history, no cerebral palsy;

II. Not suffering from scoliosis;

III. No foot injury;

IV. Able to walk independently, in normal gait.

The subjects' information is stated Table 1.

asupra organismului uman, la optimizarea structurii rucsacului și a centrului de greutate, precum și la reducerea posibilelor daune într-o anumită măsură [8, 9]. Unele studii au subliniat faptul că greutatea rucsacului nu a constituit mai mult de 10% din greutatea corporală [10-13], iar alții au fost de părere că 15% a reprezentat limita de siguranță [14]. În prezent, există foarte puține studii de cercetare cu privire la impactul efectelor biomecanice asupra rucsacurilor.

Există o mare varietate de genți pentru școală pe piață, în principal, rucsacuri, ghiozdane tip troler și genți de umăr. Întrucât greutatea reală a rucsacului este prea mare [8, 15], purtarea genților pe un singur umăr sau cu încărcare inegală ar putea dăuna organismului elevului, conducând la scolioză [16]. Unele studii au indicat faptul că rucsacul simetric este recomandat [17]. Trolerul este un produs care ușurează sarcina, al cărui mod de transportare a greutății a fost modificat pentru a evita leziunile fizice ale elevului, însă sistemul cu roți este greu și incomod, prin urmare, în prezent cel mai des utilizat este rucsacul purtat pe umeri.

În această lucrare s-au studiat modificările presiunii în zona umerilor și a spatelui, postura corpului și presiunea plantară utilizând trei rucsacuri comerciale cu aspect și greutate diferite. În plus, s-au discutat efectele negative ale excesului de greutate și influența diferitelor structuri ale rucsacurilor pentru a oferi o bază științifică pentru proiectarea ulterioară a ghiozdanelor din perspectiva biomecanicii și fiziologiei.

METODE

Participanţi

S-au selectat pentru participare în acest experiment opt elevi sănătoși dintr-o școală primară locală. Condițiile de selecție au fost următoarele:

I. să nu fi avut operații în zona piciorului, să nu sufere de paralizie cerebrală;

II. să nu sufere de scolioză;

III. să nu aibă leziuni la nivelul picioarelor;

IV. să poată merge independent.

Datele subiecților sunt prezentate în Tabelul 1.

Table 1: Basic information of subjects
Tabelul 1: Informaţii de bază ale subiecţilor

No. *Nr. crt.*	1	2	3	4	5	6	7	8
Sex	Female *Feminin*	Female *Feminin*	Male *Masculin*	Female *Feminin*	Male *Masculin*	Female *Feminin*	Female *Feminin*	Male *Masculin*
Age/yr *Vârstă/ani*	9	6	8	11	9	8	7	10
Height/cm *Înălţime/cm*	126	112	115	152	133	132	122	133

Weight/kg *Greutate/kg*	24.9	20	20.5	48.6	27.4	29.5	24.5	30.4
BMI *IMC*	15.7	15.9	15.5	21.0	15.5	16.9	16.5	17.2

Note: BMI, body mass index, or body weight index.

Obs.: IMC, indice de masă corporală

Of all the subjects, only No. 4 was overweight, the rest of the seven people kept their BMI in the normal range, and no one was underweight or fat.

Prior to the test, the staff communicated thoroughly with the guardians of subjects about the test flow and precautions, and written consents were obtained from them prior to data collection. All tests were approved by the local Ethics Committee, and were conducted according to the Declaration of Helsinki.

Dintre toți subiecții, doar subiectul nr. 4 a prezentat exces de greutate, celelalte șapte persoane au avut IMC în limite normale și nu au existat subiecți subponderali sau grași.

Înaintea testării, personalul a informat în detaliu părinții subiecților cu privire la procedura de testare și măsurile de precauție și s-au obținut acorduri scrise de la aceștia înainte de colectarea datelor. Toate testele au fost aprobate de către comitetul de etică local și s-au desfășurat în conformitate cu Declarația de la Helsinki.

Test Bags

In the test, students wore three types of marketable school backpacks: backpack A (see Figure 1a) with shoulder cushion design, backpack B (see Figure 1b) with shoulder-back cushion design and Japanese backpack C (see Figure 1c) with bio-mechanics optimization design. Firstly, the load weight was determined by each subject's body weight. Load weights were 5%, 10%, 15%, 20% and 25% of body weight respectively. In the test, subjects wore the schoolbags, which is 5% of body weight, increasing the load weight in order to reach 25% of body weight.

Rucsacurile testate

În cadrul testului, elevii au purtat trei tipuri de rucsacuri comerciale: rucsacul A (a se vedea Figura 1a), cu pernuțe la nivelul umerilor, rucsacul B (a se vedea Figura 1b), cu pernuțe la nivelul umerilor și spatelui și rucsacul japonez C (a se vedea Figura 1c) cu design de optimizare a biomecanicii. S-a determinat mai întâi greutatea sarcinii în funcție de greutatea corporală a fiecărui subiect. Greutățile sarcinilor au fost de 5%, 10%, 15%, 20%, respectiv 25% din greutatea corporală. În cadrul experimentului, subiecții au purtat rucsacurile, care reprezentau 5% din greutatea corporală, mărind sarcina pentru a ajunge la 25% din greutatea corporală.

Figure 1. (a) Sensor position distribution backpack A, (b) Sensor position distribution backpack B, (c) Sensor position distribution backpack C, (d) Sensor size

Figura 1. (a) Poziţia senzorului pe rucsacul A, (b) poziţia senzorului pe rucsacul B, (c) poziţia senzorului pe rucsacul C, (d) dimensiunea senzorului

Test Methods

Prior to the test, subjects walked across the test area at a self-preferred speed in natural gait for a 2-3 minute warm-up practice trial wearing the backpack equipped with sensor. Data collection began after the student walking

Metode de testare

Înainte de experiment, subiecții s-au deplasat pe zona de testare, cu o viteză la alegere în mers natural timp de 2-3 minute, pentru încălzire, purtând rucsacul echipat cu senzor. Colectarea datelor a început în momentul în

gait stability, and ended prior to stopping walking. Effective data of each load group needed to be collected 3 times.

The mFLEX pressure measuring system, which was researched in Rsscan international, Belgium, was utilized to gain the contact pressure between the body and the backpack. Prior to each test, strap length and sensor position were adjusted according to each primary school student's body condition. Installation method of mFLEX pressure sensor in the test was shown in Figure 1. In total, 24 pressure sensors were used from number 1-6 on the left shoulder, 7-12 on the right shoulder and 13-24 on the lower back. The area of pressure sensors is 0.96 cm^2 and the frequency is 5 Hz. Maximum pressure (mmHg) in each area needed to be calculated.

Codamotion, a 3-D Motion Capture system (Charnwood Dynamics Ltd, England) was used to test forward lean angle of head and body, and the Odin software was used to collect data. The 3-D Motion Capture system included two motion captures, located in both sides of experiment aisle, could collect accurately the changes of mark points on the subjects walking in the aisle. The position of markers (diameter=4 mm) pasted in the joint point on the left side of the body were recorded to calculate corresponding angles, markers at tragus, acromion collar bone joints and femoral greater trochanter. Markers were the active infrared markers, driven by a driving box, each marked point was identified one by one by the system. The relative displacement of markers was ignored caused by the body movement.

Foot-scan plantar pressure measuring system (Rsscan, Belgium) was used to test plantar pressure, and plantar pressure measuring system (length=1m) lay in the middle of aisle in a plane. The supporting software, Footscan7.0, was used to analyze data, the main analysis indicator was peak pressure of various plantar regions.

Statistical Analysis

All of the data were verified using 1-sample K-S test to check its normal distribution situation. All analytical models of the research were performed using SPSS (V20, SPSS Inc., Chicago, USA), significance was defined as 0.05, confidence interval 95%.

care elevii au căpătat stabilitate în mers, și s-a încheiat înainte de oprirea mersului. A fost necesară colectarea de 3 ori a datelor efective ale fiecărei grupe de sarcină.

S-a utilizat sistemul de măsurare a presiunii mFLEX, produs de Rsscan International, Belgia, pentru a obține presiunea de contact dintre corp și rucsac. Înainte de fiecare test, s-au ajustat lungimea curelei și poziția senzorului în funcție de corpul fiecărui elev de școală primară. Metoda de instalare a senzorului de presiune mFLEX a fost prezentată în Figura 1. S-au utilizat în total 24 de senzori de presiune, de la 1 la 6 pe umărul stâng, de la 7 la 12 pe umărul drept și de la 13 la 24 pe partea inferioară a spatelui. Suprafața senzorilor de presiune este de 0,96 cm^2, iar frecvența este de 5 Hz. A fost necesar să se calculeze presiunea maximă (mm Hg) în fiecare regiune.

S-a utilizat sistemul de captare a mișcării 3D Codamotion (Charnwood Dynamics Ltd, Anglia) pentru a determina unghiul de înclinație al capului și al corpului, iar software-ul Odin a fost folosit pentru a colecta datele. Sistemul de captare a mișcării 3D a inclus două capturi de mișcare, din ambele părți ale culoarului de-a lungul căruia s-a desfășurat experimentul, colectând cu acuratețe modificările punctelor de reper la subiecții care s-au deplasat de-a lungul culoarului. S-a înregistrat poziția markerilor (diametru = 4 mm) lipiți în zona articulațiilor de pe partea stângă a corpului (la nivelul tragusului, al articulației acromio-claviculare și al trohanterului mare) pentru a calcula unghiurile corespunzătoare. Markerii activi în domeniul infraroșu au fost dirijați cu ajutorul unui driver, fiecare punct marcat fiind identificat pe rând de către sistem. Deplasarea relativă a markerilor a fost ignorată, fiind cauzată de mișcarea corporală.

S-a utilizat sistemul Footscan de măsurare a presiunii plantare (Rsscan, Belgia) pentru a determina presiunea plantară, sistemul de măsurare (lungime = 1 m) fiind poziționat în mijlocul culoarului. S-a utilizat programul Footscan 7.0 pentru a analiza datele, indicatorul de analiză principal fiind presiunea maximă în diferite regiuni plantare.

Analiza statistică

Toate datele au fost verificate folosind testul K-S cu un eșantion pentru a determina distribuția normală. Toate modelele analitice utilizate în studiu au fost efectuate cu ajutorul programului SPSS (V20, SPSS Inc., Chicago, SUA); nivelul de semnificație a fost definit la 0,05, iar intervalul de încredere a fost de 95%.

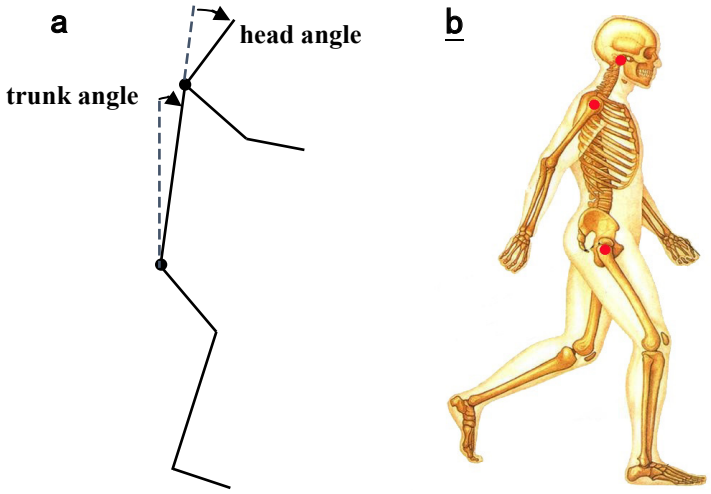

Figure 2. Definition of the forward-leaning angle (a), mark points position distribution (b)
Figura 2. Definirea unghiului de înclinaţie (a), distribuţia punctelor de presiune (b)

Figure 3. Codamotion 3-D motion capture system: (a) motion capture, (b) driver and (c) markers
Figura 3. Sistemul de captare a mişcării 3D Codamotion: (a) captarea mişcării, (b) driver şi (c) markeri

Figure 4. Footscan plantar pressure measuring system
Figura 4. Sistemul Footscan pentru măsurarea presiunii plantare

RESULT

The Influence of Bag Structure on the Shoulder Pressure and Back Pressure

The maximum shoulder and back pressure values under different loading of eight subjects were recorded. The result was shown in Figure 5. With increased load weight, shoulders and back maximum pressure values of the three bags increased significantly. And all the maximum pressure values increased linearly along with the increase of load (left shoulder: A R^2=0.9966, B R^2=0.9638, C R^2=0.9957; right shoulder: A R^2=0.998, B R^2=0.9969, C R^2=0.9948; back: A R^2=0.9966, B R^2=0.9316, C R^2=0.9873). The result indicated that influence of load was obviously on back pressure condition.

REZULTATE

Influenţa structurii rucsacului asupra presiunii în zona umerilor şi în zona spatelui

S-au înregistrat valorile presiunii maxime pentru zona umărului și cea a spatelui la opt subiecți cu diferite sarcini. Rezultatul a fost prezentat în Figura 5. Pe măsură ce a crescut sarcina, valorile presiunii maxime în zona umărului și cea a spatelui la utilizarea celor trei rucsacuri a crescut în mod semnificativ. De asemenea, toate valorile presiunii maxime au crescut liniar odată cu creșterea sarcinii (umărul stâng: A R^2 = 0,9966, B R^2 = 0,9638, C R^2 = 0,9957; umărul drept: A R^2 = 0,998, B R^2 = 0,9969, C R^2 = 0,9948 ; spate: A R^2 = 0,9966, B R^2 = 0,9316, C R^2 = 0,9873). Rezultatele au indicat că sarcina a influențat îndeosebi presiunea în zona spatelui.

Diferențele dintre rucsacurile cu structuri diferite au fost analizate utilizând testul One

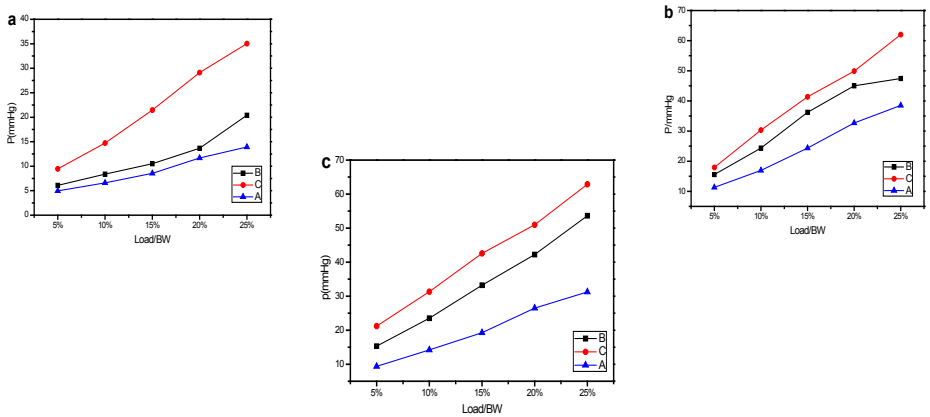

Figure 5. Mean maximum pressure value under various loading conditions of left shoulder (a), right shoulder (b) and back (c)

Figura 5. Valorile medii ale presiunii maxime în diferite condiţii de încărcare în zona umărului stâng (a), umărului drept (b) şi a spatelui (c)

The differences between different structure bags were analyzed by One Way ANOVA. Among them, the differences of shoulders pressure values between bag A and the other two bags were striking (left shoulder: $P_{A\&B}$=0.020, $P_{A\&C}$=0.000; right shoulder: $P_{A\&B}$=0.001, $P_{A\&C}$=0.000), back pressure values of bag C had significant differences as compared with that of bag A and B ($P_{C\&A}$=0.000, $P_{C\&B}$=0.000). The effect on the pressure value of the bags' structure was especially significant.

The Influence of Bag Structure on the Body Posture

The mean values of forward lean angle of head and trunk in a gait cycle under different loading were showed in Figure 6. The trunk leaning angle increased linearly with the increasing of bag weight (Figure 6b). And the

Way ANOVA. Dintre acestea, diferențele valorilor presiunii la nivelul umerilor între rucsacul A și celelalte două rucsacuri au fost frapante (umărul stâng: $P_{A\&B}$ = 0,020, $P_{A\&C}$ = 0,000; umărul drept: $P_{A\&B}$ = 0,001, $P_{A\&C}$ = 0,000), valorile presiunii la utilizarea rucsacului C au avut diferențe semnificative în comparație cu cele obținute în cazul rucsacurilor A și B ($P_{C\&A}$ = 0,000, $P_{C\&B}$ = 0,000). Influența structurii rucsacurilor asupra valorii presiunii a fost deosebit de semnificativă.

Influenţa structurii rucsacului asupra posturii corpului

Valorile medii ale unghiului de înclinație al capului și al corpului într-un ciclu de mers cu diferite sarcini au fost redate în Figura 6. Unghiul de înclinație al corpului crește liniar odată cu creșterea în greutate a rucsacului (Figura 6b). De asemenea, unghiul de înclinație al capului s-a modificat odată cu greutatea, dar tendința nu a fost evidentă.

Comparând influența diferitelor structuri ale rucsacurilor asupra poziției corpului, influența

head angle also changed with the weight, but the trend was not obvious.

By comparing the influence of different structure bag on the body posture, the influence of bag B and other two bags on values of forward lean angle of head and trunk was not significant, and difference between bag A and C was significant (forward lean angle of head: $P_{A\&C}$=0.011, trunk leaning angle: $P_{A\&C}$=0.001). Results show that bag structure had much effect on the body posture.

rucsacului B și a celorlalte două rucsacuri asupra valorilor unghiului de înclinație al capului și al corpului nu a fost semnificativă, însă diferența dintre rucsacurile A și C a fost semnificativă (unghiul de înclinație al capului: $P_{A\&C}$ = 0,011, unghiul de înclinație al corpului: $P_{A\&C}$ = 0,001). Rezultatele arată că structura rucsacului a avut un efect semnificativ asupra posturii corpului.

Influenţa structurii rucsacului asupra presiunii plantare

Distribuția presiunii plantare a fost simetrică la purtarea rucsacurilor în timpul

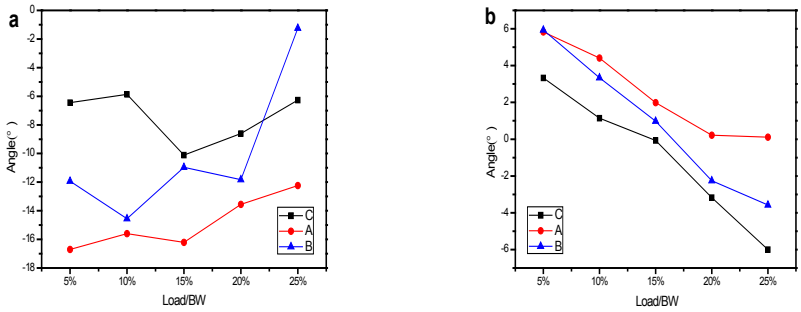

Figure 6. Changes of forward lean angle of head (a) and trunk (b)
Figura 6. Modificarea unghiului de înclinaţie al capului (a) şi al corpului (b)

The Influence of Bag Structure on the Plantar Pressure

For wearing backpack, plantar pressure distribution was symmetrical during walking. Therefore, plantar pressure distribution of left foot was chosen for example to analyze in this paper. As seen in Table 2, the plantar sub-regions dynamic peak pressure changed with the load; among them, the peak pressure of the medial area in forefoot (Meta2, Meta3, Meta4) and heel (HM, HL) increased by a great margin with bag A, but changed less with bag B or C. No significant changes were found in the effect of bag structure on plantar pressure during walking by comparing with the inter-group differences of the regional dynamic peak pressure among three bags.

The influence of load on the maximum peak in each region of plantar pressure was significant. When the load was less than 15%, the maximum plantar peak pressure area of primary school students was heel (HM and HL). When the load was increased to 15%, peak pressure of Meta2, Meta3 and Meta4 were close to or more than that of HM and HL. The results showed that the peak pressure moved forward with load increasing during walking.

mersului. Prin urmare, în această lucrare s-a selectat distribuția presiunii plantare a piciorului stâng pentru analiză. După cum arată Tabelul 2, presiunea maximă dinamică în regiunile plantare s-a modificat odată cu sarcina. Presiunea maximă în zona mediană a antepiciorului (metatarsienele 2, 3 și 4) și în zona călcâiului (regiunile externă și internă) a crescut cu o marjă mare în cazul rucsacului A, dar s-a modificat mai puțin în cazul rucsacurilor B și C. Nu s-au constatat modificări semnificative în influența structurii rucsacurilor asupra presiunii plantare în timpul mersului, prin compararea cu diferențele inter-grup ale presiunii maxime dinamice regionale la utilizarea celor trei rucsacuri.

Influența sarcinii asupra presiunii maxime în fiecare regiune plantară a fost semnificativă. Când sarcina a fost mai mică de 15%, zona cu presiune plantară maximă în cazul elevilor din învățământul primar a fost cea a călcâiului (regiunile externă și internă). Când sarcina a crescut la 15%, presiunea maximă în regiunea metatarsienelor 2, 3 și 4 a fost apropiată sau mai mare decât cea din regiunile externă și internă ale călcâiului. Rezultatele au arătat că presiunea maximă s-a deplasat înainte odată cu creșterea sarcinii în timpul mersului.

DISCUSSION

This research compared effects of three different structures of schoolbags to human

DISCUŢII

Acest studiu a comparat efectele a trei rucsacuri cu structuri diferite asupra biomecanicii corpului uman, în principal, cu privire la trei aspecte: presiunea în zona umărului

Table 2: Peak pressure value of each foot region under different types bags with different loading (n=8, N/cm²•ms)

Tabelul 2: Valorile presiunii maxime în fiecare zonă a piciorului la utilizarea rucsacurilor de diferite tipuri şi sarcini (n=8, N/cm²•ms)

	A						B					C				
	0%	5%	10%	15%	20%	25%	5%	10%	15%	20%	25%	5%	10%	15%	20%	25%
Meta 1 *Metatarsian 1*	1.493	1.252	1.305	1.686	2.005	1.529	0.579	0.846	0.875	0.713	1.467	1.033	1.200	1.667	0.911	0.944
Meta 2 *Metatarsian 2*	2.420	2.443	2.100	3.876	3.371	3.733	1.538	1.392	1.863	1.583	2.446	2.539	2.450	3.094	2.583	2.806
Meta 3 *Metatarsian 3*	3.777	3.052	3.000	3.876	6.105	4.276	2.654	1.629	2.008	2.183	3.429	4.367	3.394	3.839	5.111	3.950
Meta 4 *Metatarsian 4*	3.107	2.043	2.367	3.162	5.286	4.405	2.967	1.175	2.100	2.733	2.254	3.033	3.628	2.839	4.456	3.294
Meta 5 *Metatarsian 5*	1.393	0.524	0.819	0.967	2.219	0.862	1.188	0.308	0.875	0.983	0.637	1.311	1.311	1.033	1.344	1.106
Midfoot *Zona centrală*	0.937	0.867	0.724	0.986	1.352	0.938	1.100	0.750	0.721	0.904	0.913	1.006	0.611	0.622	0.561	0.650
Toe 1 *Degetul 1*	2.433	2.157	1.443	1.471	2.690	2.929	1.071	1.383	1.317	1.254	1.667	1.694	1.506	1.628	1.250	1.572
Toe 2-5 *Degetele 2-5*	0.957	0.824	0.348	0.395	1.157	0.695	0.283	0.275	0.313	0.550	0.567	0.428	0.339	0.472	0.383	0.344
Heel Lateral *Călcâi extern*	2.707	2.519	2.486	3.805	4.710	3.990	3.071	2.225	2.200	2.675	3.075	2.294	2.328	2.233	2.444	2.878
Heel Medial *Călcâi intern*	3.810	2.924	3.262	3.933	5.152	5.214	3.092	3.233	3.017	3.554	3.492	3.122	2.850	3.211	2.617	3.872

body bio-mechanics, mainly from three aspects: shoulder-back pressure, body posture and plantar pressure. Results indicated that the pressure values of A bag (only with shoulder cushion design) were significantly less than that of bag B or C (with human bio-mechanics of optimization design), which turned our traditional view of the pressure and it also can relieve pressure by the bag with optimize structure. In respects of body posture, the change of the forward lean angle of head and trunk under different load conditions with bag A was minimal. It might be because the back cushion of B and C bags was above a hard board, and the hard board shape is not easy to change. When the load increases, students changed the position of the center of gravity by trunk leaned to balance torque backwards, so the greater the counterpoise torque, the bigger the trunk leaning angle was. But schoolbag A was made of polyester cloth and was easily changed. So wearing the bag A, the trunk leaning angle changed the least.

The forward lean angle of body increased with the increase in load, so the student may strain the neck muscle after long-term wearing overweight backpack, and the spine mechanics balance is destroyed, even cervical dislocation leads to abnormal curved spine. Pressure peak

și a spatelui, postura corpului și presiunea plantară. Rezultatele au indicat faptul că valorile presiunii în cazul rucsacului A (cu pernuțe în zona umărului) au fost semnificativ mai mici decât în cazul rucsacurilor B și C (cu design de optimizare a biomecanicii), ceea ce a schimbat viziunea noastră tradițională privind presiunea, aceasta putând fi ameliorată și prin utilizarea rucsacurilor cu structură optimizată. În ceea ce privește postura corpului, modificarea unghiului de înclinație al capului și al corpului în diferite condiții de încărcare în cazul rucsacului A fost minimă. Aceasta s-ar putea datora faptului că pernuța de pe spatele rucsacurilor B și C a fost poziționată peste o placă dură, a cărei formă nu se poate schimba cu ușurință. La creșterea sarcinii, elevii au schimbat poziția centrului de greutate prin aplecarea în față a trunchiului pentru a echilibra efortul de torsiune, așadar, cu cât este mai mare cuplul contragreutate, cu atât este mai mare unghiul de înclinație al corpului. Însă rucsacul A confecționat din pânză de poliester s-a modificat cu ușurință. Astfel, la purtarea rucsacului A, unghiul de înclinație al corpului s-a modificat cel mai puțin.

Unghiul de înclinație al corpului a crescut odată cu creșterea sarcinii, astfel încât elevul își poate suprasolicita mușchiul gâtului după purtarea rucsacului cu exces de greutate pe termen lung, iar echilibrul mecanicii coloanei vertebrale este distrus, chiar și dislocarea la nivel cervical duce la curbarea anormală a coloanei vertebrale. Valoarea presiunii maxime este un

value is an important index of reflecting the plantar pressure distribution [18], its size and the location have the important influence for the foot fatigue accumulation and injury happening [19]. The much high plantar pressure hurt the plantar foot easily, and made the area tissue damage. If the load is too heavy for a long time, it may affect the normal development of arch and development into flat feet. The foot area with too heavy pressure will form callous [20]. And callus, in turn, further increases the plantar pressure. In this study, when bag A and bag C weighed more than 15%, and schoolbag B weighed more than 20%, maximum plantar pressure forward when walking. It might be because the trunk leaning angle of student increased with load increasing, leading to the center of gravity moving forward. As the pupil arch muscle has not been fully developed, too much pressure will damage their feet. Therefore, it is suggested that schoolbag weight should not be more than 15% of the body weight.

The domestic and overseas experts studied the influence of the backpack on back pressure, body posture and plantar pressure of youth humeral, with different load, and very good research has been acquired. But there is little research about the influence of different backpack structure on the three aspects. Among them, Pascoe [8] studied the changes in body posture for 10 teenagers with four kinds of bags: with no bag, single shoulder schoolbag, backpack or single shoulder sports bags. The results indicated that the supporting abilities have enhanced observably; when we choose single shoulder bag, the rachis would side turn; when we choose two shoulder bag, the trunk angle was bigger. Backpack was chosen in this study, the trunk leaning angle increased significantly with the load, this was consistent with conclusion of others.

CONCLUSIONS

These results indicated that when carrying the bag A, variation of shoulder-back pressure and trunk leaning angle were minimum. The two optimization design bags B and C did not have an advantage on alleviating shoulder-back pressure and decreasing trunk leaning angle. Therefore, ordinary bag A may be more suitable for primary school students.

indicator important care reflectă distribuția presiunii plantare [18], intensitatea și poziția acesteia influențează în mod semnificativ acumularea oboselii la nivelul piciorului și riscul de apariție a leziunilor [19]. O presiune plantară foarte mare poate cu ușurință provoca leziuni la nivelul piciorului și deteriora țesutul. Dacă se menține o sarcină prea mare pentru o perioadă lungă de timp, aceasta poate afecta dezvoltarea normală a bolții și apariția piciorului plat. La o presiune prea mare se vor forma calozități în zona picioarelor [20], iar acestea, la rândul lor, vor crește și mai mult presiunea plantară. În acest studiu, atunci când rucsacul A și rucsacul C au cântărit mai mult de 15%, iar rucsacul B mai mult de 20%, presiunea plantară maximă s-a deplasat înainte în timpul mersului. Aceasta se poate datora creșterii unghiului de înclinație al corpului odată cu creșterea sarcinii, ceea ce duce la deplasarea centrului de greutate înainte. Din cauza nedezvoltării mușchiului bolții la elevi, o presiune prea mare poate provoca leziuni la nivelul picioarelor. Prin urmare, se sugerează că greutatea rucsacului nu trebuie să depășească 15% din greutatea corporală.

Experții naționali și din străinătate au studiat influența rucsacului asupra presiunii la nivelul spatelui, posturii corpului și presiunii plantare la nivelul humerusului la subiecți tineri, cu sarcini diferite, obținând informații foarte bune, însă cercetările influenței diferitelor structuri ale rucsacurilor asupra celor trei aspecte au fost puține. Printre aceștia, Pascoe și colab. [8] au studiat modificările posturii corpului la 10 adolescenți în patru situații: fără rucsac, cu rucsac purtat pe un singur umăr, cu rucsac purtat pe ambii umeri sau cu geantă sport purtată pe un singur umăr. Rezultatele au indicat faptul că abilitățile de susținere au sporit perceptibil; atunci când alegem rucsacul purtat pe un singur umăr, coloana vertebrală se deplasează lateral; atunci când alegem rucsacul purtat pe ambii umeri, unghiul de înclinație al corpului a crescut. În acest studiu s-a ales rucsacul, iar unghiul de înclinație al corpului a crescut în mod semnificativ odată cu creșterea sarcinii, rezultate în concordanță cu concluzia altor cercetători.

CONCLUZII

Aceste rezultate au indicat faptul că, la transportarea rucsacului A, variația presiunii la nivelul umerilor și al spatelui și unghiul de înclinație al corpului au fost minime. Cele două rucsacuri cu design de optimizare B și C nu au avut niciun avantaj în privința micșorării presiunii în zona umeri-spate și a unghiului de înclinație al corpului. Prin urmare, rucsacul obișnuit A pare a fi mai potrivit pentru elevii de școală primară.

Acknowledgments

The author would like to thank those who provided financial support, Science Plan Project (2012, HD12CXYG0016) of Huadu Area, Guangzhou, Guangdong.

Mulțumiri

Autorii doresc că mulțumească pentru sprijin financiar programului Science Plan Project (2012, HD12CXYG0016) din regiunea Huadu, Guangzhou, Guangdong.

REFERENCES

1. Birrell, S.A., Haslam, R.A., Subjective skeletal discomfort measured using a comfort questionnaire following a load carriage exercise, *Mil Med*, **2009**, 174, 2, 177-182.
2. Mehta, T.B., Thorpe, D.E., Freburger, J.K., Development of a survey to assess backpack use and neck and back pain in seventh and eighth graders, *Pediatr Phys Ther*, **2002**, 14, 4, 171-184.
3. Navuluri, N., Navuluri, R.B., Study on the relationship between backpack use and back and neck pain among adolescents, *Nurs Health Sci*, **2006**, 8, 4, 208-215.
4. Korovessis, P., Koureas, G., Zacharatos, S. *et al.*, Backpacks, back pain, sagittal spinal curves and trunk alignment in adolescents: A logistic and multinomial logistic analysis, *Spine*, **2005**, 30, 2, 247-255.
5. Zhou, N., Chen, W., Yang, L., Zhou, J., Application and Perspective of Biomechanics Analytic Technology in Design of Bags, *Leather Science and Engineering*, **2015**, 25, 5, 27-32.
6. Wang, M., Lu, A., Zhang, Q. *et al.*, Research on the Influence of Backpack on the Balance, Posture and Gait of the Youngsters, *Sports Scientific Research*, **2015**, 36, 2, 8-12.
7. Frank, E., Stevenson, J.M., Stothart, P., The effect of load placement on static posture and reaction forces in youth, *Med Sci Sport Exercise*, **2003**, 35, 5, S21.
8. Pascoe, D.D., Pascoe, D.E., Wang, Y.T. *et al.*, Influence of carrying book bags on gait cycle and posture of youths, *Ergonomics*, **1997**, 40, 6, 631-640.
9. Chansirinukor, W., Wilson, D., Dansie, B., Effects of backpacks on students: Measurement of cervical and shoulder posture, *Aust J Physiother*, **2001**, 47, 2, 110-120.
10. Hong, Y., Brueggemann, G.P., Changes in gait patterns in 10-year-old boys with increasing loads when walking on a treadmill, *Gait Posture*, **2000**, 11, 3, 254-259.
11. Li, J.X., Hong, Y.L., Robinson, D.P., The effect of load carriage on movement kinematics and respiratory parameters in children during walking, *Eur J Appl Physiol*, **2003**, 90, 1-2, 35-43.
12. Zhou, N., Zhou, J., Yang, L. *et al.*, Investigation of the Effect of Varied Schoolbag Weight on the Health of Primary Students: A Quantitative Plantar Pressure Study, Revista de Pielarie Incaltaminte (*Leather and Footwear Journal*), **2015**, 15, 3, 159-168.
13. Zhou, N., Yan, J., Zhou, J. *et al.*, Effects of different loads schoolbags on body posture of elementary students, *China Leather*, **2016**, 45, 2, 69-73.
14. Hong, Y., Cheung, C.K., Gait and posture responses to backpack load during level walking in children, *Gait Posture*, **2003**, 17, 1, 28-33.
15. Zhu, H., Ma, J., Liu, E.Q. *et al.*, Investigation on school bag-related hygienic problems among primary and secondary school students in Beijing, *Chinese Journal of School Health*, **2001**, 22, 1, 26-27.
16. Geng, H., Foot pressure features of single-shoulder and double-shoulder schoolbag weight walk of children, *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, **2011**, 15, 33, 6267-6270.
17. Negrini, S., Negrini, A., Postural effects of symmetrical and asymmetrical loads on the spines of schoolchildren, *Scoliosis*, **2007**, 2, 8, 1-7.
18. Chen, Z., Zhang, Y., Zhen, Z. *et al.*, Quantitative Evaluation of Postoperative EFFECT of Calcaneal Fractures Using, *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, **2009**, 23, 8, 925-929.
19. Cheng, L., The analysis on distribution characteristics of thenar pressure parameter of the elderly people who have fell down, Changchun: Northeast Normal University, **2010**.
20. Meng, Z., Yuan, W., Distribution of Planter Pressure in School Children during Walking with Different Loads on Their Backs, *Journal of Biomedical Engineering*, **2008**, 5, 4, 852-855.

Article received/Data primirii articolului: 28.06.2016
Accepted/Acceptat la data: 12.09.2016

PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF TWO EXTREMELY HALOPHILIC ARCHAEON ISOLATED FROM RAW HIDE AND INVESTIGATION OF THEIR LIPOLYTIC ACTIVITIES

IDENTIFICAREA FILOGENETICĂ A DOUĂ ARCHAEA EXTREM HALOFILE IZOLATE DIN PIEI CRUDE ŞI INVESTIGAREA ACTIVITĂŢILOR LIPOLITICE ALE ACESTORA

Gözde TURHAN BİLGİ[1], Binnur MERİÇLİ YAPICI[2*], Sadi Turgut BİLGİ[3]

[1]Biology Department, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Canakkale Onsekiz Mart University, 17020, Çanakkale, Turkey, gzdtrhn@hotmail.com

[2]Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, *Çanakkale* Onsekiz Mart University, 17020, *Çanakkale*, Turkey, byapici@comu.edu.tr

[3]Department of Midwifery, School of Health, Canakkale Onsekiz Mart University, 17020, *Çanakkale*, Turkey, stbilgi@comu.edu.tr

PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF TWO EXTREMELY HALOPHILIC ARCHAEON ISOLATED FROM RAW HIDE AND INVESTIGATION OF THEIR LIPOLYTIC ACTIVITIES

ABSTRACT. This research serves two different purposes. Primarily, two extremely halophilic archaeons were isolated from salted raw hide samples and were phylogenetically identified by 16S rRNA sequence analyses. It was determined that isolate 1 shared similarities with *Halomicrobium zhouii* strain 144 and isolate 2 with *Haloarchaeon* strain 129. These results were substantiated by some phenotypic analyses. Both strains displayed Gram-negative reactions and they were susceptible to the antibiotics bacitracin and novobiocin. It was qualitatively determined that they have lipolytic activity. Secondly, esterase and lipase enzyme activity conditions of the two archaea were also determined in the current study to evaluate industrial applicability of these enzymes. For the identification of quantitative esterase and lipase activities of both strains, p-nitrophenyl butyrate and p-nitrophenyl laurate substrates were used, respectively, and their activities were measured on a daily basis. After the quantitative and qualitative determination of esterase and lipase activities, esterase and lipase activities were determined at different temperatures (4-60°C), pH levels (4-11pH) and in NaCl concentrations (0-5.5M). According to daily enzyme activity results, the highest esterase and lipase values for isolate 1 were found to be 4 U/ml and 1 U/ml, respectively, on the 4th day and for isolate 2 to be 2.7 U/ml and 1.9 U/ml, respectively, on the 3rd day. Furthermore, the maximum esterase activity for isolate 1 was elicited at 35°C, pH 8 and in 2.5 M NaCl, and for isolate 2 at 35°C, pH 7 and in 3 M NaCl. Moreover, the maximum lipase activity for isolate 1 was explored at 40°C, pH 7.0 and 2.0-3.5 M NaCl, and for isolate 2 at 35°C, pH 7.5 and in 2 M NaCl. Optimal conditions for both extreme halophilic Archaea was determined as the data may be considered for the production of industrial enzymes. Therefore, this research is an exemplary study as well as a small-scoped survey which includes the two goals mentioned above and only focuses on two archaea on salted raw hides.
KEY WORDS: salted hides, halophilic archaea, halophilic esterase, halophilic lipase

IDENTIFICAREA FILOGENETICĂ A DOUĂ ARCHAEA EXTREM HALOFILE IZOLATE DIN PIEI CRUDE ŞI INVESTIGAREA ACTIVITĂŢILOR LIPOLITICE ALE ACESTORA

REZUMAT. Acest studiu de cercetare are două scopuri distincte. În primul rând, două Archaea extrem halofile au fost izolate din probe de piele crudă şi au fost identificate filogenetic prin analize de secvenţă ARNr 16S. S-a determinat faptul că izolatul 1 are similitudini cu tulpina *Halomicrobium zhouii* 144, iar izolatul 2 cu tulpina *Haloarchaeon* 129. Aceste rezultate au fost confirmate prin câteva analize fenotipice. Ambele tulpini au prezentat reacţii Gram-negative şi au fost sensibile la bacitracină şi novobiocină. S-a determinat calitativ faptul că au activitate lipolitică. În al doilea rând, condiţiile de activitate a esterazei şi lipazei la cele două Archaea au fost determinate în studiul de faţă pentru a evalua aplicabilitatea industrială a acestor enzime. Pentru identificarea activităţilor cantitative ale esterazei şi lipazei la ambele tulpini, s-au utilizat substraturi pe bază de p-nitrofenil butirat, respectiv p-nitrofenil laurat, iar activităţile acestora au fost măsurate zilnic. După determinarea cantitativă şi calitativă a activităţilor esterazei şi lipazei, s-au observat activităţile esterazei şi lipazei la diferite temperaturi (4-60°C), nivel de pH (4-11) şi concentraţii de NaCl (0-5,5 M). Conform rezultatelor activităţii zilnice ale enzimelor, cele mai mari valori ale esterazei şi lipazei pentru izolatul 1 s-au dovedit a fi de 4 U/ml, respectiv 1 U/ml, în cea de-a patra zi, iar pentru izolatul 2 valorile au fost de 2,7 U/ml, respectiv 1,9 U/ml, în cea de-a treia zi. Mai mult, activitatea maximă a esterazei pentru izolatul 1 a avut loc la 35°C, pH 8 şi 2,5 M NaCl, iar pentru izolatul 2, la 35°C, pH 7 şi 3 M NaCl. Activitatea maximă a lipazei pentru izolatul 1 a avut loc la 40°C, pH 7,0 şi 2,0-3,5 M NaCl, iar pentru izolatul 2, la 35°C, pH 7,5 şi 2 M NaCl. S-au determinat condiţiile optime pentru ambele Archaea extrem halofile pentru ca datele să poată fi luate în considerare pentru producţia de enzime industriale. Prin urmare, această cercetare este un studiu exemplar cu domeniu de aplicare restrâns, care include cele două obiective menţionate mai sus şi se concentrează doar pe două Archaea izolate din piei brute sărate.
CUVINTE CHEIE: piei sărate, Archaea halofile, esterază halofilă, lipază halofilă

L'IDENTIFICATION PHYLOGÉNÉTIQUE DE DEUX ARCHÉES EXTRÊMEMENT HALOPHILES ISOLÉES DE LA PEAU ET L'INVESTIGATION SUR LEURS ACTIVITÉS LIPOLYTIQUES

RÉSUMÉ. Cette recherche a deux objectifs différents. Principalement, deux archées extrêmement halophiles ont été isolées d'échantillons salés de peau crue et ont été identifiées phylogénétiquement par des analyses de séquences d'ARNr 16S. On a été déterminé que l'isolat 1 partageait des similitudes avec la souche *Halomicrobium zhouii* 144 et l'isolat 2 avec la souche *Haloarchaeon* 129. Ces résultats ont été confirmés par certaines analyses phénotypiques. Les deux souches ont présenté des réactions Gram-négatives et ont été sensibles aux antibiotiques bacitracine et novobiocine. On a déterminé qualitativement qu'ils ont une activité lipolytique. Deuxièmement, les conditions d'activité enzymatique de l'esterase et de la lipase des deux archées ont également été déterminées dans l'étude actuelle pour évaluer l'applicabilité industrielle de ces enzymes. Pour l'identification des activités quantitatives de l'estérase et de la lipase des deux souches,

** Correspondence to: Binnur MERİÇLİ YAPICI, Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Çanakkale Onsekiz Mart University, 17020, Çanakkale, Turkey, byapici@comu.edu.tr*

on a utilisé des substrats de p-nitrophényl butyrate et respectivement de p-nitrophényl laurate et leurs activités ont été mesurées quotidiennement. Après la détermination quantitative et qualitative des activités de l'estérase et de la lipase, on a observé les activités de l'esterase et de la lipase à différentes températures (4-60°C), pH (4-11) et concentration de NaCl (0-5,5 M). Selon les résultats quotidiens de l'activité enzymatique, on a trouvé que les valeurs les plus élevées d'estérase et de lipase pour l'isolât 1 ont été 4 U/ml et 1 U/ml, respectivement, le 4ème jour et pour l'isolât 2 les valeurs ont été 2,7 U/ml et respectivement 1,9 U/ml, le 3ème jour. De plus, l'activité estérase maximale pour l'isolât 1 a été provoquée à 35°C, pH 8 et 2,5 M NaCl, et pour l'isolât 2, à 35°C, pH 7 et 3 M NaCl. L'activité lipase maximale pour l'isolât 1 a été explorée à 40°C, pH 7,0 et 2,0-3,5 M NaCl, et pour l'isolât 2, à 35°C, pH 7,5 et 2 M NaCl. Les conditions optimales pour les deux archées extrêmement halophiles ont été déterminées car les données peuvent être considérées pour la production d'enzymes industrielles. Par conséquent, cette recherche est une étude exemplaire ainsi qu'une enquête à petite échelle qui comprend les deux objectifs mentionnés ci-dessus et se concentre uniquement sur deux archées sur les peaux crues salées.
MOTS CLÉS: peaux salées, archées halophile, esterase halophile, lipase halophile

INTRODUCTION

The primary raw materials of the leather industry are hides and skins [1]. Autolytic destruction starts after 5-6 hours following the flaying if they are not well protected [2-6]. Therefore, raw hides or skins should be conserved with salt before transferred to tannery for processing [7-9]. Although this method limits the microbial growth, it does not provide sufficient protection [10, 11]. Halophiles, which need a high amount of salt concentration to live in and have developed different strategies with this property to survive in salt-loving environment, are members of a large group and have representatives in all three domains known as Bacteria, Archaea and Eukaryotes [12]. Halophiles were classified by Kushner [13] according to their need for optimal amount of NaCl.

In leather industry, microbiological research is scarce. Most studies are related to bacteria and fungi. But in recent years, attention is drawn to the presence of Archaea in raw hides. Different types of halophilic archaea with hydrolytic activity have been identified on salted raw hides and skins. For example, in the study by Bilgi *et al*. [14], 186 extremely halophilic archaea, which need 15% or higher salt were shown to exhibit proteolytic (107 strains) and lipolytic (70 strains) activity, were isolated from salted skins or hides.

Furthermore, industrial enzymes are usually obtained from microorganisms. The comparison between microbial enzymes and other enzymes originating from plants or animals revealed that microbial enzymes have high catalytic activities, do not generate undesirable by-products, are more stable and inexpensive, and can be obtained in large quantities [15]. Many studies in the field related to industrial enzymes of biotechnology are being

INTRODUCERE

Principala materie primă a industriei de pielărie este pielea de origine animală [1]. Distrugerea autolitică a acesteia începe după 5-6 ore de la jupuire în cazul în care pieile nu sunt bine protejate [2-6]. Prin urmare, pieile crude necesită conservare cu sare înainte de a fi transferate la tăbăcărie pentru prelucrare [7-9]. Această metodă limitează creşterea microbiană, însă nu oferă o protecţie suficientă [10, 11]. Halofilele, care au nevoie de o cantitate mare de sare pentru a supraviețui și au dezvoltat diferite strategii pe baza acestei proprietăţi pentru a supravieţui într-un mediu sărat, fac parte dintr-o grupă mare şi au reprezentanţi în toate cele trei domenii cunoscute sub numele de *Bacteria*, *Archaea* şi *Eucaria* [12]. Halofilele au fost clasificate de către Kushner [13] în funcţie de nevoia lor de cantitate optimă de NaCl.

În industria de pielărie, cercetarea microbiologică este limitată. Cele mai multe dintre studii se concentrează pe bacterii şi fungi. Însă în ultimii ani, atenţia s-a îndreptat asupra prezenţei Archaea pe piei brute. Diferite tipuri de Archaea halofile cu activitate hidrolitică au fost identificate pe piei brute sărate. De exemplu, în studiul efectuat de Bilgi şi colab. [14], s-a dovedit că 186 Archaea extrem halofile, care au nevoie de sare în concentraţie de 15% sau mai mult, prezintă activitate proteolitică (107 tulpini) şi lipolitică (70 tulpini) și au fost izolate din piei sărate.

De asemenea, enzimele industriale sunt de obicei obţinute din microorganisme. Comparaţia dintre enzimele microbiene şi alte enzime de origine vegetală sau animală a arătat că enzimele microbiene au activităţi catalitice ridicate, nu generează produse secundare indezirabile, sunt mai stabile şi ieftine şi pot fi obţinute în cantităţi mari [15]. Multor studii referitoare la enzimele industriale din domeniul biotehnologiei li se

attached more importance due to the gradual development of enzyme technology, diversified usages and very high economic value of the products. Lipases are widely used in fields such as clinical biotechnology, detergent industry, biodiesel production, taste and flavor industry and food industry. Lipase enzyme can also be used in the leather industry to prepare pelts for processes such as tanning and dyeing by removing skin fats [16]. In literature, there is little research on the examination of lipase from extremely halophilic archaea on the leather. Therefore, investigation of the lipase enzyme obtained from different microorganisms such as archaea and determination of the activity conditions are of great importance.

Leather processing steps are home to a wide variety of microorganisms classified into the three domains of life such as Bacteria, Archaea and Eukaryotes. Therefore, identification of the microbial diversity and their products in these environments can make significant contributions to the humanity, which cannot be predicted in advance.

In this study, only two of the Extremely Halophilic Archaea, which have lipolytic activity and are able to survive on salted raw hides were phylogenetically identified by 16S rRNA gene sequence analyses. Additionally, lipolytic activities of archaea were investigated in different environmental conditions such as temperature, pH value and salt content.

MATERIAL AND METHODS

Two lipolytic halophilic Archaea isolates which were previously isolated from salted raw hides were used in the present research. SW 25 medium was used for culture isolation, activation and phenotypic tests. This medium was composed of 833.4 ml/l SW 30 solution, 5 g/l yeast extract, and 20 g/l agar. SW 30 solution contains 234 g/l NaCl, 39 g/l $MgCl_2$, 61 g/l $MgSO_4$, 1 g/l $CaCl_2$, 6 g/l KCl, 0.25 g/l $NaHCO_3$, and 0.7 g/l NaBr. Media were adjusted to pH 7.5 with 1N NaOH [17]. Dussault [18] Gram staining was performed for determination of Gram reactions and of cell morphology of the isolates. To test antibiotic susceptibilities of the isolates, disc diffusion method was applied and antibiotics such as Ampicillin 10 µg (A 10), Bacitracin 10 µg (B 10), Erythromycin 15 µg (E 15), Novobiosin30 µg

acordă o importanţă mai mare datorită dezvoltării treptate a tehnologiei enzimatice, utilizărilor diversificate şi valorii economice foarte ridicate a produselor. Lipazele sunt utilizate pe scară largă în domenii cum ar fi biotehnologia clinică, industria detergenţilor, producţia de biodiesel, industria aromelor şi industria alimentară. Lipaza poate fi, de asemenea, utilizată în industria de pielărie la pregătirea pieilor gelatină pentru procese precum tăbăcirea şi vopsirea prin îndepărtarea grăsimilor pielii [16]. În literatura de specialitate, există puţine cercetări privind examinarea lipazei din Archaea extrem halofile din piele. Prin urmare, investigarea lipazei obţinute din diferite microorganisme, cum ar fi Archaea, şi determinarea condiţiilor de activitate ale acesteia sunt foarte importante.

Etapele de prelucrare a pielii favorizează apariţia unei mari varietăţi de microorganisme clasificate în cele trei domenii ale vieţii, şi anume *Bacteria*, *Archaea* și *Eucaria*. Prin urmare, identificarea diversităţii microbiene şi a produselor rezultate în aceste medii poate aduce contribuţii semnificative umanităţii, care nu pot fi prezise în avans.

În acest studiu s-au identificat filogenetic prin analize de secvenţă a genei ARNr 16S doar două dintre Archaea extrem halofile, care au activitate lipolitică şi sunt capabile să supravieţuiască pe pieile crude sărate. În plus, activităţile lipolitice ale Archaea au fost investigate în diferite condiţii de mediu, cum ar fi temperatura, valoarea pH-ului şi conţinutul de sare.

MATERIAL ŞI METODE

În cadrul prezentei cercetări s-au utilizat două izolate Archaea halofile lipolitice care au fost izolate anterior din piei brute sărate. Mediul SW 25 a fost utilizat pentru testele de izolare a culturii, de activare şi fenotipice. Acest mediu a fost compus din 833,4 ml/l SW 30 soluţie, 5 g/l extract de drojdie şi 20 g/l agar. Soluţia SW 30 conţine 234 g/l NaCl, 39 g/l $MgCl_2$, 61 g/l $MgSO_4$, 1 g/l $CaCl_2$, 6 g/l KCl, 0,25 g/l $NaHCO_3$, şi 0,7 g/l NaBr. S-a ajustat pH-ul mediilor la 7,5 cu NaOH 1N [17]. S-a efectuat colorația Gram Dussault [18] pentru a determina reacţiile Gram şi morfologia celulară a izolatelor. Pentru a testa sensibilitatea izolatelor la antibiotice, s-a aplicat metoda de difuziune a discurilor și s-au utilizat

(NV 30), Penicillin G 10 U (P 10), Streptomycin 10 µg (S 10), Tetracycline 30 µg (T 30), Vancomycin 30 µg (VAN 30), Chloramphenicol 30 µg (C 30), and Cefotaxime 30 µg (CTX 30) were used [19-21].

The genomic DNA isolation of two Archaea isolates was performed by using the modified version of the Dyall-Smith [22] method and Geneon® Bacterial DNA isolation kit. For Genomic DNA isolation, 1.5 ml of the culture samples ($OD_{600\sim}$ 1) grown in SW-25 liquid medium was transferred into sterile microcentrifuge tubes and centrifuged at +4°C at 10.000xg for 10 min. After removing the supernatants of the samples, 400 µl of sterile cold ultra-pure water was added in the tubes and the resultant mixture was shaken for a short time to disintegrate the cells. Samples were centrifuged at +4°C, 10.000xg for 3 min to remove supernatants, and genomic DNA isolation was performed in line with the instructions of the commercial kit. 0.8% agarose gel (80 V, 100 mA, 1 hour) was prepared with 1X TAE for control and Syber® Green I and 6X gel loading dye was used to load the samples onto the gel.

The distinction between Archaea and Bacteria was made by 16S rRNA molecular Polymerase Chain Reaction (PCR) with used bac27f/bac1492r and arc7f/arc1384r primers [23, 24]. For the configuration of Polymerase Chain Reaction (PCR), Geneon® Maximo TaqDNA Polymerase kit was used. This PCR program consisted of 30 repetitive cycles with a strand separation step at 94°C for 45s, an annealing step at 53°C of 45s, and an elongation step for 1m at 72°C. PCR samples were made to move forward on 1.7% agarose gel to check. *Haloferax sp*. HSC4 was used for Archaea and *Salinibacter ruber* for Bacteria for a positive control. Chromatograms of the sequence analyses were viewed and edited via Chromas®. Forward and reverse sequences were aligned on the NCBI's (National Center of Biotechnology Information) website, and then 16S rRNA gene sequences were obtained by removing the shared parts. These sequences were analyzed by using nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) at http://www.ncbi.nlm.nih.gov and compared with existing 16S rRNA sequences in the GenBank database.

antibiotice cum ar fi: ampicilină 10 µg (A 10), bacitracină 10 µg (B 10), eritromicină 15 µg (E 15), novobiocină 30 µg (NV 30), penicilină G 10 U (P 10), streptomicină 10 µg (S 10), tetraciclină 30 µg (T 30), vancomicină 30 µg (VAN 30), cloramfenicol 30 µg (C 30), cefotaxim 30 µg (CTX 30) [19-21].

S-a izolat ADN-ul genomic din două izolate Archaea utilizând versiunea modificată a metodei Dyall-Smith [22] şi kitul de izolare a ADN-ului bacterian Geneon®. Pentru izolarea ADN-ului genomic, s-a transferat 1,5 ml din probele de cultură ($OD_{600\sim}$ 1) cultivate în mediu lichid SW-25 în tuburi de microcentrifugare sterile şi s-au centrifugat la +4°C la 10,000xg timp de 10 min. După îndepărtarea supernatanţilor probelor, s-au adăugat 400 µl de apă rece sterilă ultra-pură în tuburi, iar amestecul rezultat a fost agitat timp de o perioadă scurtă pentru a dezintegra celulele. Probele au fost centrifugate la +4°C, 10,000xg timp de 3 min, pentru a îndepărta supernatanţii, iar izolarea ADN-ului genomic a fost realizată în conformitate cu instrucţiunile kitului comercial. S-a preparat 0,8% gel de agaroză (80 V, 100 mA, 1 oră), având ca martor 1X TAE, folosind Syber® Green I şi 6X colorant de încărcare în gel pentru a încărca probele pe gel.

Distincţia dintre Archaea şi bacterii s-a realizat prin reacția de polimerizare în lanț (PCR) moleculară a ARNr 16S cu primeri bac27f/bac1492r şi arc7f/arc1384r [23, 24]. Pentru configurarea reacției de polimerizare în lanț (PCR), s-a folosit kitul Geneon® Maximo TaqDNA Polymerase. Acest program PCR a constat din 30 de cicluri repetitive cu o etapă de separare a fibrelor la 94°C timp de 45 s, o etapă de maleabilizare la 53°C timp de 45 s, şi o etapă de alungire de 1 m la 72°C. Probele PCR au fost verificate prin migrare în 1,7% gel de agaroză. S-a utilizat Haloferax *sp*. HSC4 ca martor pozitiv pentru Archaea şi *Salinibacter ruber* ca martor pozitiv pentru bacterii. Cromatogramele analizelor de secvenţă au fost vizualizate şi editate utilizând programul Chromas®. Secvenţele directe și inverse au fost comparate cu cele regăsite pe site-ul NCBI (Centrul Naţional de Informare în Biotehnologii), şi apoi s-au obţinut secvenţele genei ARNr 16S prin îndepărtarea părților comune. Aceste secvenţe au fost analizate cu ajutorul programului Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponibil la http://www.ncbi.nlm.nih.gov şi s-au comparat cu

Esterase test [25-27] and lipase test [28, 26] were applied in screening qualitatively extracellular hydrolytic enzyme. Inoculated isolates were incubated for 7 days at 37°C on SW-25 agar containing 1% Tween 80. Opaque zone observed around the colony was considered as positive esterase activity [25-27]. For lipase activity, inoculated isolates were incubated for 7 days at 37°C on modified rhodamine B lipase agar. After the incubation, plates were examined under 350 nm ultraviolet (UV) light. Bright orange-red colonies were evaluated as positive lipase activity [26, 28, 29].

After the isolates were cultured in SW-25 broth medium at 37°C at 150 rpm, the liquid samples were taken daily. 1% Tween 80 and olive oil were added to medium as inducing agent. The samples were centrifuged at 10.000xg for 10 min and then supernatants were used as the enzyme source. Esterase and lipase activities were measured at 410 nm of UV spectrophotometer using p-Nitrophenyl butyrate (pNPB) and p-nitrophenyl laurate (pNPL), respectively [30]. Both of 10 mM pNPB and pNPL were dissolved in 2-propanol for substrate solution. Buffer solution was prepared in pure water and meanwhile 100 mM Tris HCl, 0.5% Triton X-100, 2 M NaCl at pH 7.5 were added. Substrate mixture was prepared by adding 1 ml substrate solution into 9 ml buffer solution (1:9,v/v) and preheating was carried out at 37°C for 5 minutes. The solution was freshly prepared each time.

Firstly, reactions of esterase and lipase activity were performed with 0.8 ml of pNP substrate mixture and 0.2 ml of enzyme source for 10 min at 37°C. Secondly, 0.5 ml of Na_2CO_3 (0.5 M) was used as reaction stopper and finally the samples were centrifuged at 10.000 x g for 10 min. The same procedure was applied for the blind tube without the enzyme source. The enzyme amount producing 1 µmol p-Nitrophenol per minute under aforementioned reaction conditions was identified as the 1 unit of milliliter (U/ml) enzyme activity [30, 31]. Different temperatures (4-60°C), pH (3.0-12.0 pH) and NaCl (0.5-5M) conditions were modified in reactions to determine their effects on enzyme activities. In acidic reactions, sodium acetate buffer was used instead of Tris HCl buffer.

secvenţele ARNr 16S existente din baza de date GenBank.

S-au efectuat testul esterazei [25-27] şi testul lipazei [28, 26] pentru selectarea enzimei hidrolitice extracelulare calitative. Izolatele inoculate au fost incubate timp de 7 zile la temperatura de 37°C pe agar SW-25 conţinând 1% Tween 80. Zona opacă observată în jurul coloniei a fost considerată activitate pozitivă a esterazei [25-27]. Pentru activitatea lipazei, izolatele inoculate au fost incubate timp de 7 zile la 37°C pe agar modificat cu rodamina B. După incubare, plăcile au fost examinate la lumină ultravioletă (UV) de 350 nm. Coloniile roşu-portocaliu aprins au reprezentat o activitate pozitivă a lipazei [26, 28, 29].

După cultivarea izolatelor în mediu SW-25 la 37°C la 150 rpm, s-au prelevat zilnic probe de lichid. S-au adăugat în mediu 1% Tween 80 şi ulei de măsline ca agenţi de inducere. Probele au fost centrifugate la 10,000xg timp de 10 minute şi apoi s-au utilizat supernatanții ca sursă de enzimă. Activităţile esterazei şi lipazei au fost măsurate la 410 nm cu spectrofotometrul UV, utilizând p-nitrofenil butirat (pNPB), respectiv laurat de p-nitrofenil (pNPL) [30]. S-au dizolvat câte 10 mM de pNPB şi pNPL în 2-propanol ca soluţie substrat. Soluţia tampon a fost preparată în apă pură şi s-au adăugat 100 mM Tris HCl, 0,5% Triton X-100, 2 M NaCl la pH 7,5. Amestecul de substrat a fost preparat prin adăugarea a 1 ml soluţie substrat în 9 ml de soluţie tampon (1:9, v/v) şi s-a preîncălzit la 37°C timp de 5 minute. Soluţia a fost preparată proaspăt de fiecare dată.

În primul rând, reacţiile esterazei şi lipazei au fost efectuate cu 0,8 ml amestec de substrat pNP şi 0,2 ml sursă de enzimă timp de 10 minute la 37°C. În al doilea rând, s-a utilizat 0,5 ml de Na_2CO_3 (0,5 M) pentru a inhiba reacţia şi în final, probele au fost centrifugate la 10,000 x g timp de 10 min. S-a aplicat aceeaşi procedură pentru tubul martor fără sursă de enzimă. Cantitatea de enzimă care produce 1 µmol p-nitrofenol pe minut în condiţiile de reacţie menţionate mai sus a fost identificată ca fiind 1 unitate de mililitru (U/ml) activitate enzimatică [30, 31]. S-au variat temperaturile (4-60°C), pH-ul (3,0-12,0 pH) şi NaCl (0,5-5M) în reacţii pentru a determina efectele acestor factori asupra activităţilor enzimatice. În reacţiile acide, s-a utilizat ca tampon acetat de sodiu în loc de Tris HCl.

RESULTS AND DISCUSSION

Gram stain, antibiotic susceptibility testing and 16S rRNA sequence analysis method were applied to isolates. Then, their hydrolytic enzyme activities were determined qualitatively and quantitatively. Esterase and lipase activities of isolates were also determined quantitatively according to qualitative findings. In the meantime, the effects of enzyme amount, temperature, pH and salt variables on esterase and lipase activities were measured spectrophotometrically.

Morphological and Microscopic Characteristics of the Isolates

Both isolates used in the current research were observed with the cream colored colonies on SW 25 agar after 7 days incubation at 37°C. Both of isolates have been found to be rod shape and Gram negative [Gr (-)](Figure 1).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

S-au aplicat coloraţia Gram, testarea sensibilităţii la antibiotice şi metoda de analiză a secvenţei ARNr 16S. Apoi s-au determinat calitativ şi cantitativ activităţile enzimatice hidrolitice. Activităţile esterazei şi lipazei din izolate au fost, de asemenea, determinate cantitativ conform constatărilor calitative. Între timp, s-au măsurat spectrofotometric efectele cantităţii de enzimă, temperaturii, pH-ului şi cantității variabile de sare asupra activităţilor esterazei şi lipazei.

Caracteristici morfologice şi microscopice ale izolatelor

În cazul ambelor izolate folosite în cercetările de față s-au observat colonii de culoare crem pe agar SW 25 după 7 zile de la incubare la temperatura de 37°C. Ambele izolate au avut formă de tijă şi colorație Gram negativă [Gr (-)] (Figura 1).

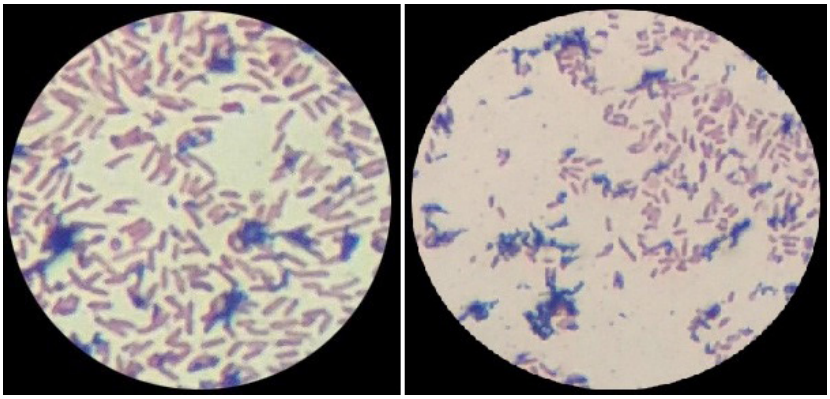

Figure 1. Gram stain images of isolate 1 (left) and isolate 2 (right)
Figura 1. Imagini cu coloraţie Gram ale izolatului 1 (stânga) şi izolatului 2 (dreapta)

Distinction between Bacteria and Archaea

According to the findings of antibiotic susceptibility test, both isolates were sensitive to bacitracin and novobiocin antibiotics, while they were resistant to other antibiotics used in the study. Holmes and Dyall-Smith [32] expressed that most halophilic Archaea are susceptible to novobiocin and bacitracin, which are DNA gyrase inhibitors. Çetinkuş [33] identified the isolated halophilic microorganisms as Archaea or Bacteria via 16S rRNA analysis and found that the isolates were susceptible to bacitracin and novobiocin and resistant to penicillin G. Yıldız *et al*. [34] reported that halophilic Archaea isolates were gram-negative and gram-variable features and were sensitive to novobiocin and bacitracin antibiotics in their study.

Distincţia dintre Bacteria şi Archaea

Conform rezultatelor testului de sensibilitate la antibiotice, ambele izolate au fost sensibile la bacitracină şi novobiocină şi rezistente la alte antibiotice utilizate în studiu. Holmes şi Dyall-Smith [32] au afirmat că majoritatea Archaea halofile sunt sensibile la novobiocină şi bacitracină, care sunt inhibitori ai girazei ADN. Çetinkuş [33] a identificat microorganismele halofile izolate ca Archaea sau bacterii prin analiza ARNr 16S şi a constatat că tulpinile au prezentat sensibilitate la bacitracină şi novobiocină şi rezistenţă la penicilina G. Yıldız şi colab. [34] au raportat în studiul lor că izolatele Archaea halofile sunt gram-negative şi gram-variabile şi prezintă sensibilitate la novobiocină şi bacitracină.

In this study, the features of isolate 1 and 2 have been found to be similar to the general characteristics of the domain Archaea. The findings of the present and previous studies indicate that the isolates might be Archaea. The results of PCR performed with Archaea and Bacteria primers disclosed that isolate 1 and 2 belong to the Archaea domain (Figure 2).

În acest studiu, caracteristicile izolatelor 1 şi 2 s-au dovedit a fi similare cu caracteristicile generale ale domeniului Archaea. Constatările studiilor anterioare şi actuale indică faptul că izolatele ar putea face parte din domeniul Archaea. Rezultatele tehnicii PCR efectuate cu primeri Archaea şi Bacteria au arătat că izolatele 1 şi 2 aparţin domeniului Archaea (Figura 2).

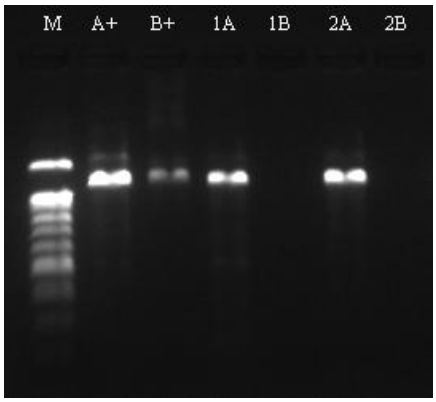

Figure 2. Agarose gel image of PCR products of isolates. M: Marker, A +: Archaea positive control, B +: Bacterial positive control, 1A: isolates 1 with Archaea primers, 1B: isolates 1 with Bacteria Primer, 2A: isolates 2 with Archaea Primer, 2B: isolate 2 with Bacteria Primer

Figura 2. Imaginea obţinută cu ajutorul gelului de agaroză a produselor PCR ale izolatelor. M: marker, A+: martor pozitiv Archaea, B+: martor pozitiv bacterian, 1A: izolate 1 cu primeri Archaea, 1B: izolate 1 cu primeri bacterii, 2A: izolate 2 cu primeri Archaea, 2B: izolate 2 cu primeri bacterii

In our study, 16S rRNA sequence analysis method was used for molecular diagnostics of isolate 1 and 2. As a result, it was found that isolate 1 was similar to *Halomicrobium zhouii* strain 144 and isolate 2 was similar to *Haloarchaeon* strain 129 according to the gene bank database. 16S rRNA gene sequences of *Halomicrobium zhouii* strain 144 and *Haloarchaeon* strain 129 were determined by Bilgi *et al*. [14] In their study, *Haloarchaeon* strain 129 was isolated from salted raw hide and cultivated for the first time. Considering first identified regions for these strains, *Halomicrobium zhouii* [35] and uncultured haloarchaeon clone YA32 [36] were determined in Jiangsu sea saltern (China). Our findings were found to support the haloarchaeal diversity noted in previous studies.

Qualitative Findings of Hydrolytic Enzyme Activity

In the present research, esterase and lipase enzyme activities were investigated. Tween-80 for esterase activity and 1% olive oil for lipase activity were used in enzyme activation. In experiments of quantitative enzyme activity,

În studiul nostru, metoda analizei de secvenţă ARNr 16S a fost utilizată pentru diagnostic molecular al izolatelor 1 şi 2. Ca urmare, s-a constatat că izolatul 1 este similar cu tulpina *Halomicrobium zhouii* 144, iar izolatul 2 a fost similar cu tulpina *Haloarchaeon* 129 conform bazei de date a băncii de gene. Secvenţele de gene ARNr 16S ale tulpinii *Halomicrobium zhouii* 144 şi ale tulpinii *Haloarchaeon* 129 au fost determinate de Bilgi şi colab. [14]. În studiul acestora, tulpina *Haloarchaeon* 129 a fost izolată din piele crudă sărată şi cultivată pentru prima dată. Luând în considerare mai întâi regiunile identificate pentru aceste tulpini, *Halomicrobium zhouii* [35] şi clona *Haloarchaeon* YA32 necultivată [36] au fost determinate în salina Jiangsu (China). Descoperirile noastre au sprijinit diversitatea haloarchaea observată în studiile anterioare.

Rezultate calitative ale activităţii enzimei hidrolitice

În cercetarea de faţă, s-au investigat activităţile enzimatice ale lipazei şi esterazei. Pentru activarea enzimei s-au utilizat Tween-80

p-NPB (for esterase test) and p-NPL (for lipase) substrates were used according to the procedure in experimental. Camacho *et al*. [30] produced esterase and lipase from *Haloarcula marismortui* and then have carried out their characterization. The researchers declared that p-nitrophenyl butyrate (pNPB), p-nitrophenyl valerate (pNPV) for esterase activity and p-nitrophenyl laurate (pNPL) for lipase activity were used as substrates.

Esterase and lipase activities were measured quantitatively for 10 days. Growth curve was generated for each isolate and the results were compared with activity findings. According to the research findings, the highest esterase (4 U/ml), and lipase (1 U/ml) activity values of isolate 1 was determined in supernatant on the 4th day of growth. The highest esterase (2.7 U/ ml) and lipase (1.9 U/ml) activity values of isolate 2 were determined in supernatant on the 3rd day of growth. These supernatants were used as raw enzyme source in the subsequent enzyme analyses. Enzyme amount was detected as 0.2 ml for the highest esterase activity of both isolates. In such conditions, esterase activity of isolate 1 and 2 were found to be 0.45 U/ml and 0.54 U/ml, respectively. Optimal temperature was determined as 35°C for the highest esterase activity of both isolates. Esterase activity was determined at a wide temperature range of 4-55°C (Figure 3). This finding was considered as an important result for industrial esterase production.

pentru activitatea esterazei şi ulei de măsline 1% pentru activitatea lipazei. În experimentele de activitate enzimatică cantitativă, s-au utilizat substraturile p-NPB (pentru testul esterazei) şi p-NPL (pentru testul lipazei), în conformitate cu procedura menționată în partea experimentală. Camacho şi colab. [30] au produs esteraza şi lipaza din *Haloarcula marismortui* şi apoi le-au caracterizat. Cercetătorii au raportat utilizarea substanțelor p-nitrofenil butirat (pNPB) și valerat de p-nitrofenil (pNPV) ca substraturi pentru activitatea esterazei şi laurat p-nitrofenil (pNPL) ca substrat pentru activitatea lipazei.

Activităţile esterazei şi lipazei au fost măsurate cantitativ timp de 10 zile. S-a generat curba de creştere pentru fiecare izolat, iar rezultatele au fost comparate cu rezultatele activităţii. Conform rezultatelor cercetării, cele mai mari valori ale activităţii esterazei (4 U/ml) şi lipazei (1 U/ml) pentru izolatul 1 au fost determinate în supernatant în patra zi de creştere. Cele mai mari valori ale activităţii esterazei (2,7 U/ml) şi lipazei (1,9 U/ml) pentru izolatul 2 au fost determinate în supernatant în treia zi de creştere. Aceşti supernatanţi au fost utilizaţi ca sursă primară de enzimă în analizele enzimatice ulterioare. S-a detectat cantitatea de enzimă la 0,2 ml pentru cea mai mare activitate a esterazei din ambele izolate. În aceste condiţii, activitatea esterazei a izolatelor 1 şi 2 s-a dovedit a fi de 0,45 U/ml, respectiv 0,54 U/ml. Temperatura optimă a fost determinată la 35°C pentru cea mai mare activitate a esterazei din ambele izolate. Activitatea esterazei a fost determinată în cadrul unei game largi de temperaturi, 4-55°C (Figura 3). Această constatare a fost considerată un rezultat important pentru producţia industrială de esterază.

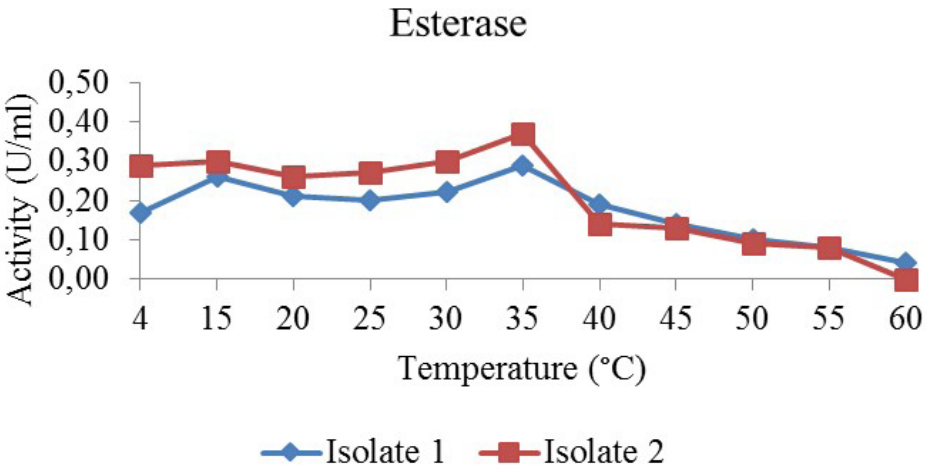

Figure 3. The graph of temperature changes of esterase activity
Figura 3. Graficul modificărilor de temperatură ale activităţii esterazei

The highest activity of lipase was detected at 40°C for isolate 1 and at 35°C for isolate 2. Lipase activity of isolate 2 was observed to be higher than that of isolate 1 (Figure 4).

Cea mai mare activitate a lipazei a fost detectată la 40°C pentru izolatul 1 şi la 35°C pentru izolatul 2. S-a observat că activitatea lipazei în cazul izolatului 2 este mai mare decât cea a izolatului 1 (Figura 4).

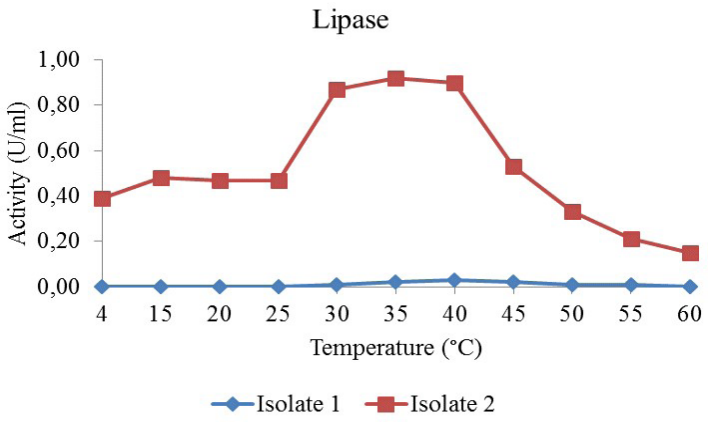

Figure 4. The graph of temperature changes of lipase activity
Figura 4. Graficul modificărilor de temperatură ale activităţii lipazei

The highest activity of esterase was detected at pH 8 for isolate 1 and at pH 7 for isolate 2. It was observed that isolate 2 was active at pH 4.5-9 range, while isolate 1 was active at pH 6.5-9.5 range. According to the obtained data, it was determined that isolate 2 had esterase activity in more acidic conditions than isolate 1 did (Figure 5).

Cea mai mare activitate a esterazei a fost detectată la pH 8 pentru izolatul 1 şi la pH 7 pentru izolatul 2. S-a observat că izolatul 2 a fost activ în intervalul de pH 4,5-9, iar izolatul 1 a fost activ în intervalul de pH 6,5-9,5. Conform datelor obţinute, s-a constatat că la izolatul 2 activitatea esterazei a avut loc în condiţii mai acide decât în cazul izolatului 1 (Figura 5).

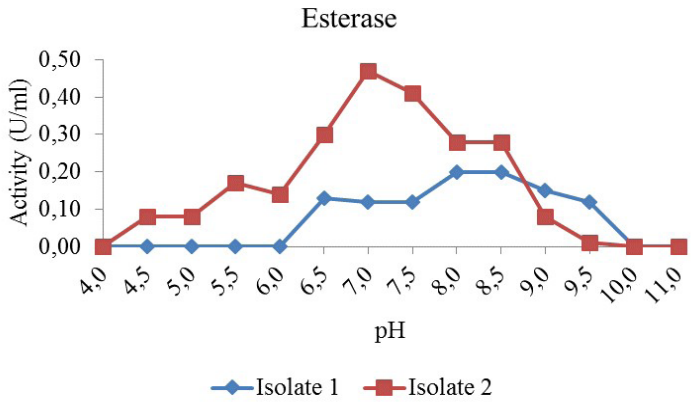

Figure 5. The graph of pH changes of esterase activity
Figura 5. Graficul modificărilor de pH ale activităţii esterazei

The highest activity of lipase was detected at pH 7.0 for isolate 1 and at pH 7.5 for isolate 2. It was observed that isolate 2 was active at pH 5.0-9.0 range, while isolate 1 was active at pH 5.0-7.5 range. Therefore, it was determined that isolate 1 had lipase activity in acidic, neutral and alkaline conditions (Figure 6).

Cea mai mare activitate a lipazei a fost detectată la pH 7,0 pentru izolatul 1 şi la pH 7,5 pentru izolatul 2. S-a observat că izolatul 2 a fost activ în intervalul de pH 5,0-9,0, iar izolatul 1 a fost activ în intervalul de pH 5,0-7,5. Prin urmare, s-a stabilit că la izolatul 1 activitatea lipazei a avut loc în condiţii acide, neutre şi alcaline (Figura 6).

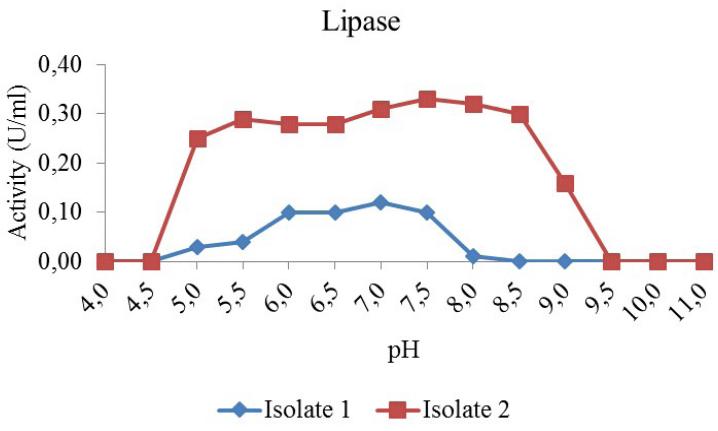

Figure 6. The graph of pH changes of lipase activity
Figura 6. Graficul modificărilor de pH ale activităţii lipazei

The highest activity of esterase was detected in 2.5 M NaCl for isolate 1 and in 3 M NaCl for isolate 2. Both isolates were determined to have no esterase activity in 1 M NaCl (Figure 7).

Cea mai mare activitate a esterazei a fost detectată la 2,5 M NaCl pentru izolatul 1 şi la 3 M NaCl pentru izolatul 2. Niciunul dintre izolate nu au avut activitate a esterazei la 1 M NaCl (Figura 7).

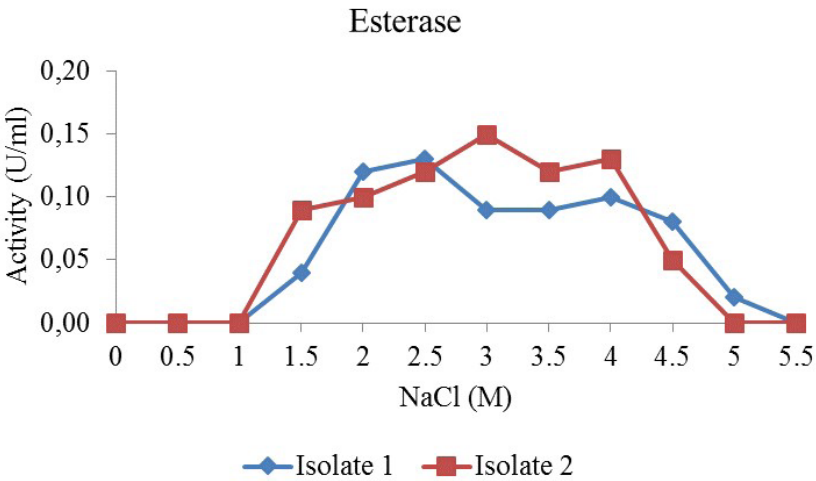

Figure 7. The graph of NaCl changes of esterase activity
Figura 7. Graficul modificărilor de NaCl ale activităţii esterazei

The highest activity of lipase was detected in 2-3.5 M for isolate 1 and 2 M for isolate 2. Isolates 1 and 2 were found to exhibit lipase activity in 1.5-4 M and 0.5-4.5 M NaCl, respectively. It was observed that isolate 2 had slight lipase activity in low concentrations of salts such as in 0.5 M, 1.0 M and 1.5 M NaCl (Figure 8).

Thus, optimal esterase activity was detected at 35°C, pH 8, 2.5 M NaCl for isolate 1 and at 35°C, pH 7, 3 M NaCl for isolate 2. Additionally, the optimal lipase activity was detected at 40°C, pH 7.0, 2 M-3.5 M NaCl for isolate 1 and at 35°C, pH 7.5, 2 M NaCl for isolate 2.

Cea mai mare activitate a lipazei a fost detectată la 2-3,5 M pentru izolatul 1 şi la 2 M pentru izolatul 2. Izolatele 1 şi 2 au prezentat activitate a lipazei la 1,5-4 M şi respectiv 0,5-4,5 M NaCl. S-a observat că izolatul 2 a prezentat o uşoară activitate a lipazei la concentraţii scăzute de săruri, cum ar fi la 0,5 M, 1,0 M şi 1,5 M NaCl (Figura 8).

Astfel, activitatea optimă a esterazei a fost detectată la 35°C, pH 8, 2,5 M NaCl pentru izolatul 1 şi la 35°C, pH 7, 3 M NaCl pentru izolatul 2. În plus, activitatea optimă a lipazei a fost detectată la 40°C, pH 7,0, 2 M-3,5 M NaCl pentru izolatul 1 şi la 35°C, pH 7,5, 2 M NaCl pentru izolatul 2.

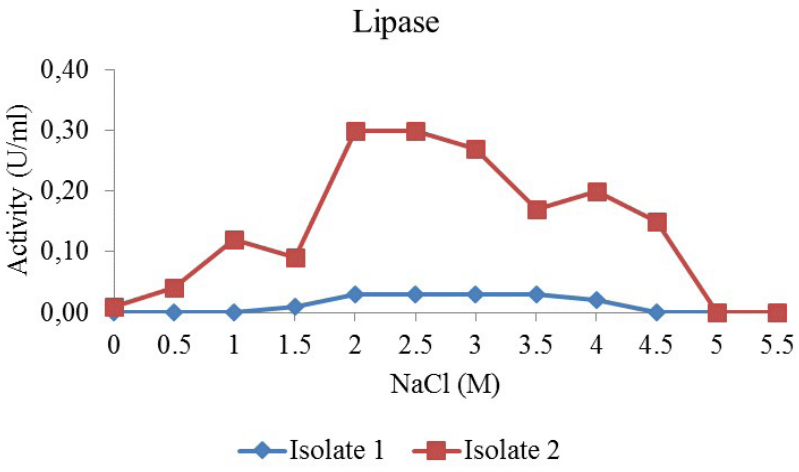

Figure 8. The graph of NaCl changes of lipase activity
Figura 8. Graficul modificărilor de NaCl ale activităţii lipazei

In the study which investigates the esterase and lipase activities of 5 halophilic archaeal strains, p-Nitrophenyl butyrate (pNPB) for esterase and p-nitrophenyl palmitate (pNPP) for lipase were used as substrates [37]. In the mentioned study, the maximum esterase activity was observed in reaction conditions of 3–4.5 M NaCl, pH 8-8.5 and 60-65°C, and maximum lipase activity in 3.5-4 M NaCl and at pH 8 and 45-60°C. Moreover, it was also detected that the values of esterase activity were higher than those of lipase activity. It was found that our results related to optimal conditions were different from the above reported research results.

Bhatnagar *et al*. [26] examined lipolytic activity of halobacteria strain using similar substrates. The study showed that optimal conditions of Halobacteria strain were 3.5 M NaCl, pH 8, 40°C for esterase and 4 M NaCl, pH 7.5 40°C for lipase. They also suggest that esterase activity occurs faster than the lipase activity. Ozcan *et al*. [38] reported that optimal esterase and lipase activity of halophilic archaeal isolates were identified at pH 8.5 in 3-4.5 M NaCl. In addition, optimal temperature was stated as 50-55°C for esterase and as 60-65°C for lipase. Boutaiba *et al*. [39] investigated lipolytic activity of extremely halophilic Archaea *Natronococcus* sp. p-nitrophenyl palmitate (pNPP) was used as a substrate. They reported that optimal lipolytic activity was detected in 4 M NaCl, pH 7, at 50°C. Thus, our research findings were found to be compatible with these results.

În cadrul unui studiu care investighează activitatea esterazei şi lipazei la 5 tulpini Archaea halofile, s-au utilizat ca substraturi p-nitrofenil butirat (pNPB) pentru esterază şi palmitat p-nitrofenil (pNPP) pentru lipază [37]. În cadrul studiului menţionat, activitatea maximă a esterazei a fost observată în condiţii de reacţie de 3-4,5 M NaCl, pH 8-8,5 şi 60-65°C, iar activitatea maximă a lipazei la 3,5-4 M NaCl, la pH 8 şi 45-60°C. Mai mult decât atât, s-a observat, de asemenea, că valorile activităţii esterazei au fost mai mari decât cele ale activităţii lipazei. S-a constatat că rezultatele noastre legate de condiţiile optime au fost diferite de rezultatele cercetării prezentate mai sus.

Bhatnagar şi colab. [26] au examinat activitatea lipolitică a tulpinilor halobacteriilor folosind substraturi similare. Studiul a demonstrat că condiţiile optime ale tulpinilor halobacteriilor au fost de 3,5 M NaCl, pH 8, 40°C pentru esterază şi 4 M NaCl, pH 7,5, 40°C pentru lipază. De asemenea, aceştia sugerează că activitatea esterazei are loc mai rapid decât activitatea lipazei. Ozcan şi colab. [38] au raportat că activitatea optimă a esterazei şi a lipazei la izolatele Archaea halofile s-a identificat la pH 8,5 în 3-4,5 M NaCl. În plus, temperatura optimă a fost raportată la 50-55°C pentru esterază şi la 60-65°C pentru lipază. Boutaiba şi colab. [39] au investigat activitatea lipolitică a unei Archaea extrem halofilă, *Natronococcus* sp. S-a utilizat ca substrat palmitat p-nitrofenil (pNPP). Autorii au raportat că activitatea lipolitică optimă a fost detectată la 4 M NaCl, pH 7, 50°C. Astfel, rezultatele cercetării noastre s-au dovedit a fi compatibile cu aceste rezultate.

CONCLUSIONS

In the study, firstly, it was found that isolate 1 was similar to *Halomicrobium zhouii* strain 144 and isolate 2 to *Haloarchaeon* strain 129 by 16S rRNA gene sequence analysis. It was determined that both isolates were Gram negative and susceptible to novobiocin and bacitracin antibiotics. Thus, our research findings supported that isolates belong to the Archaea domain. It was revealed that two extremely halophilic Archaea also have lipolytic activity. Extremely Halophilic Archaea with lipolytic enzyme activities may cause fat migration which is undesirable on the raw hide and skin. If Archaea causing damage to the skin by lipolytic activities were identified, ad hoc chemicals could be used to control them.

Secondly, optimal esterase and lipase activity conditions of the two Extreme Halophilic Archaea were quantitatively determined. According to the research findings, the highest esterase (4 U/ml) and lipase (1 U/ml) activity values of isolate 1 were observed in supernatant on the 4th day of growth. The highest esterase (2.7 U/ml) and lipase (1.9 U/ml) activity values of isolate 2 were determined in supernatant on the 3rd day of growth. Optimal esterase activity was detected at 35°C, pH 8, and in 2.5 M NaCl for isolate 1 and at 35°C, pH 7, and in 3 M NaCl for isolate 2. The optimal lipase activity was also determined at 40°C, pH 7.5, and in 2 M NaCl for isolate 1 and at 35°C, pH 7, and in 2 M NaCl for isolate 2.

It was detected that esterase and lipase enzymes of isolate 2 were active at a wide pH range of 4.5-9.0 and 5.0-9.0, respectively. Thus, it was considered as an important finding that both esterase and lipase activity of isolate 2 have a wide pH range. Besides, it was also recorded as an important finding that isolate 2 exhibits lipase activity in a high salt concentration, e.g. in 4.5 M NaCl, as well as in low salt concentration, e.g. in 0.5 M NaCl. Esterase activity of isolate 2 was determined at a wide temperature range of 4-55°C. Thus, these findings were considered important for industrial esterase and lipase production.

Finally, it was thought that the investigation of esterase and lipase enzymes of isolate 2 by advanced research methods and of their usability in industry would be useful. It should not be ignored that these isolates can be used as a source of lipolytic enzyme in several areas of the industry.

CONCLUZII

În cadrul studiului, s-a constatat, în primul rând, că izolatul 1 a fost similar tulpinii *Halomicrobium zhouii* 144 şi izolatul 2 similar tulpinii *Haloarchaeon* 129 în urma analizei secvenţei genei ARNr 16S. S-a stabilit că ambele izolate sunt Gram negative şi sensibile la novobiocină şi bacitracină. Astfel, rezultatele cercetării noastre sprijină faptul că izolatele aparţin domeniului Archaea. S-a demonstrat că cele două Archaea extrem halofile au, de asemenea, activitate lipolitică. Archaea extrem halofile cu activităţi enzimatice lipolitice pot provoca migraţia grăsimii, de nedorit la pielea brută. În cazul în care se identifică Archaea ce provoacă leziuni pe piele prin activităţile lipolitice, se pot folosi produse chimice ad-hoc pentru a le controla.

În al doilea rând, s-au determinat cantitativ condiţiile optime pentru activitatea lipazei şi esterazei în cazul celor două Archaea extrem halofile. În conformitate cu rezultatele cercetărilor, cele mai mari valori ale activităţii esterazei (4 U/ml) şi lipazei (1 U/ml) pentru izolatul 1 au fost observate în supernatant în patra zi de creştere. Cele mai mari valori ale activităţii esterazei (2,7 U/ml) şi lipazei (1,9 U/ml) pentru izolatul 2 au fost detectate în supernatant în treia zi de creştere. Activitatea optimă a esterazei a fost detectată la 35°C, pH 8, 2,5M NaCl pentru izolatul 1 şi la 35°C, pH 7, 3 M NaCl pentru izolatul 2. Activitatea optimă a lipazei a fost determinată la 40°C, pH 7,5, 2 M NaCl pentru izolatul 1 şi la 35°C, pH 7, 2 M NaCl pentru izolatul 2.

S-a observat că enzimele esterază şi lipază din izolatul 2 au fost active într-o gamă largă de pH de 4,5-9,0, respectiv 5,0-9,0. Astfel, o constatare importantă a fost faptul că activităţile esterazei şi lipazei la izolatul 2 au avut loc într-o gamă largă de pH. În plus, o altă constatare importantă a fost faptul că izolatul 2 prezintă o activitate a lipazei într-o concentraţie mare de sare, de exemplu, la 4,5 M NaCl, precum şi într-o concentraţie scăzută de sare, de ex. la 0,5 M NaCl. Activitatea esterazei la izolatul 2 a fost determinată într-o gamă largă de temperaturi, 4-55°C. Astfel, aceste descoperiri au fost considerate importante pentru producţia industrială de esterază şi lipază.

În cele din urmă, s-a considerat utilă investigarea enzimelor esterază şi lipază ale izolatului 2 prin metode avansate de cercetare şi a gradului de utilizare a acestora în industrie. Nu trebuie ignorat faptul că aceste izolate pot fi utilizate ca sursă de enzime lipolitice în mai multe domenii ale industriei.

REFERENCES

1. Bilgi, S.T., Meriçli Yapıcı, B., Yapici, A.N., Determination of Bacterial and Fungal Numbers in Floats of Pre-Tanning Operations, *Afr J Biotechnol*, **2009**, 8, 8, 1602–1607.
2. Kanagaraj, J., John Sundar, V., Muralidharan, C., Sadulla, S., Alternatives to sodium chloride in prevention of skin protein degradation-a case study, *J Clean Prod*, **2004**, 13, 825-831.
3. Rao, B.R., Henrickson L., Short-term preservation of cattle hide, *J Am Leather Chem As*, **1983**, 78, 48-53.
4. Vankar, P.S., Dwivedi, A.K., Raw Skin Preservation Through Sodium Salts-A Comparative Analysis, *Desalination*, **2009**, 249, 158-162.
5. Yapici, A.N., The Effect of Using a Fungicide along with Bactericide in the Main Soaking Float on Microbial Load, *Afr J Biotechnol*, **2008**, 7, 21, 3922-3926.
6. Yapıcı, A.N., Meriçli Yapıcı, B., Karaboz I., Tozan, M., An in vitro Assessment of the Effectiveness of Some Bactericides on Bacteria Isolated from Soaking Float, *Asian J Chem*, **2009**, 21, 2, 1521–1525.
7. Thorstensen, T.C., Practical Leather Technology (4th.ed.). Kriger Publishing Company Krigerdrive, Malabar, Florida, **1993**, 340p.
8. Türkan, M.F., Aslan, A., Yapıcı, A.N., Meriçli Yapıcı, B., Bilgi, S.T., Assessment of Antimicrobial Activity of Natural Leathers Treated with Pseudevernia furfuracea (L.) Zopf Exstracts, *Tekstil ve Konfeksiyon*, **2013**, 23, 2, 176-180.
9. Ulaş, G., Meriçli Yapıcı, B., Yapıcı, A.N., Evaluation of the Antimicrobial Activity of Some Commercial Vegetable Extracts Used in Tanneries, *Ekoloji*, **2014**, 92, 45-50.
10. Menteş Çolak, S., Meriçli Yapıcı, B., Yapıcı, A.N., Determination of Antimicrobial Activity of Tannic Acid in Pickling Process, *Rom Biotech Lett*, **2010**, 15, 3, 5325-5330.
11. Meriçli Yapıcı, B., Yapıcı, A.N. and Keçici, E., The Effect of Reuse of Unhairing-Liming Residual Floats Through Regeneration on the Microorganisms Number, *Afr J Biotechnol*, **2008**, 7, 17, 3077-3081.
12. DasSarma, S., Coker, J.A., ve DasSarma, P., Archaea - Overview, in: Schaechter, M. (Ed.), Desk Encyclopedia of Microbiology (2nd ed), Academic Press, **2010**, 118-139.
13. Kushner, D.J., The Halobacteriaceae, in: Woese, C.R., Wolfe R.S. (Ed.), The bacteria. A treatise on structure and function. Archaebacteria. Vol 8. Academic Press, London, **1985**, 171-214.
14. Bilgi, S.T., Mericli Yapici, B., Karaboz, İ., Determination of Hydrolytic Enzyme Capabilities of Halophilic Archaea Isolated from Hides and Skins and Their Phenotypic and Phylogenetic Identification, *J Am Leather Chem As*, **2015**, 110, 2, 33-42.
15. Wiseman, A., Introduction to Principles, in: Handbook of Enzyme Biotechnology, Wiseman, A. (Ed.) 3rd Edn., Ellis Horwood Ltd., T.J. Press Ltd., Padstow, Cornwall, UK, **1995**, 3-8.
16. Eren Kıran, Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları (in Turkish), KSÜ, Fen ve Mühendislik Dergisi, Kahramanmaraş, **2006**, 9, 2-19.
17. Afendra, A.S., Vargas, C., Nieto, J.J., Drainas, C., Gene Transfer and Expression of Recombinant Proteins in Moderately Halophilic Bacteria, *Methods Mol Biol*, **2004**, 267, 209-223.
18. Dussault, H.P., An Improved Technique For Stainin Red Halophilic Bacteria, *J Bacteriol*, **1955**, 70, 484-485.
19. Montalvo-Rodriguez, R., Vreeland, R.H., Oren, A., Kessel, M., Betancourt, C., Lopez-Gariga, J., Halogeometricum borinquense gen. nov., sp. nov., A Novel Halophilic Archaeon From Puerto Rico. *Int J Syst Bacteriol*, **1998**, 48, 1305-1312.
20. Birbir, M., Sesal, C., Extremely Halophilic Bacterial Communities in Serflikoçhisar Salt Lake in Turkey, *Turk J Biol*, **2003**, 27, 7-22.
21. Birbir, M., Cali, B., Mertoglu, B., Bardavid, R.E., Oren, A., Ogmen, M.R., Ogan, A., Extremely Halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the Adjacent Kaldirim and Kayacik salterns, *World J Microbiol Biotechnol*, **2007**, 23, 309–316.
22. Dyall-Smith, M., The Halohandbook-Protocols for Haloarchaeal Genetics. Version 7. **2008**, 144p.
23. Lane, D.J., 16S/23S rRNA Sequencing, in Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, John Wiley and Sons, New York, **1991**, 115–175.

24. Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M.W., Enhanced Sensitivity of DNA- and rRNA-Based Stable Isotope Probing by Fractionation and Quantitative Analysis Of Isopycnic Centrifugation Gradients, *Environ Microbiol*, **2004**, 6, 73–78.
25. Elevi, R., Assa, P., Birbir, M., Ogan, A., Oren, A., Characterization of Extremely Halophilic Archaea Isolated from the Ayvalik Saltern, Turkey, *World J Microbiol Biotechnol*, **2004**, 20, 719–725.
26. Bhatnagar, T., Boutaiba, S., Hacene, H., Cayol, J.L., Fardeau, M.L., Ollivier, B., Baratti, J.C., Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and hydrolase production, *FEMS Microbiol Lett*, **2005**, 248, 133-140.
27. Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A., Diversity of Moderately Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes, *J Appl Microbiol*, **2003**, 94, 295–300.
28. Kouker, G., Jaeger, K.E., Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases, *Appl Environ Microbiol*, **1987**, 53, 1, 211-213.
29. Anonymous, Rhodamine B Agar Preparation Procedure (b.t.). Access August 7, 2009, from http://www.alken-murray.com/lipase.html, **2009**.
30. Camacho, R.M., Mateos, J.C., Gonzalez-Reynoso Orfil., Prado L.A., Cordova, J., Production and Characterization of Esterase and Lipase from Haloarcula marismortui, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **2009**, 36, 901–909.
31. Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C., Verger, R., Methods for Lipase Detection and Assay: a critical Review, *Eur J Lipid Sci Technol*, **2000**, 133–153.
32. Holmes, M.L., Dyall-Smith, M.L., Mutations in DNA gyrase Results in Novobiocin Resistance in Halophilic Archaebacteria, *J Bacteriol*, **1991**, 173, 642–648.
33. Çetinkuş, K., Çamaltı Tuzlası Halofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Karakterizasyonu (in Turkish), MSc Dissertation, Anadolu University. Eskişehir, Turkey, **2007**.
34. Yıldız, E., Özcan, B., Çalışkan, M., Isolation, Characterization and Phylogenetic Analysis of Halophilic Archaea from a Salt Mine in Central Anatolia (Turkey), *Pol J Microbiol*, **2012**, 61, 2, 111–117.
35. Yang, X., Cui, H.L., Halomicrobium zhouii sp. nov., A Halophilic Archaeon from a Marine Solar Saltern, *Int J Syst Evol Microbiol*, **2012**, 62, 1235–1240.
36. He, M., Zou, Z., Cai, L., Wang, G., Haloarchaea and Halophilic Bacteria in Two Hypersaline Soils of Jiangsu Province, China, http://www.ncbi.nlm.nih.gov, **2007**.
37. Ozcan, B., Ozyilmaz, G., Cokmus, C., Caliskan, M., Characterization of Extracellular Esterase and Lipase Activities from Five Halophilic Archaeal Strains, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **2009**, 36, 105–110.
38. Özcan, B., Özyılmaz, G., Cihan, A., Çökmüş, C., Çalışkan, M., Phylogenetic Analysis and Characterization of Lipolytic Activity of Halophilic Archaeal Isolates, *Microbiology*, **2012**, 81, 2, 186-194.
39. Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D.A., Baratti, J.C., Preliminary Characterisation of a Lipolytic Activity from an Extremely Halophilic Archaeon, Natronococcus sp., *J Mol Catal B-Enzym*, **2006**, 41, 21–26.

Article received/Data primirii articolului: 16.10.2016
Accepted/Acceptat la data: 18.11.2016

INFLUENCE OF WALKING DIRECTION ON THE INTRA-LIMB COORDINATION OF HEALTHY CHILDREN AGED BETWEEN THREE AND SIX

INFLUENŢA DIRECŢIEI DE MERS ASUPRA COORDONĂRII MEMBRELOR INFERIOARE LA COPIII SĂNĂTOŞI CU VÂRSTE ÎNTRE TREI ŞI ŞASE ANI

Jinghui ZHANG[1,2], Jinlong LIU[1,2], Bo XU[1,2], Wuyong CHEN[1,2], Jianxin WU[3], Jin ZHOU[1,2*]

[1]National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu 610065, P.R. China

[2]Key Laboratory for Leather Chemistry and Engineering of the Education Ministry, Chengdu 610065, P.R. China

[3]Science Lab, Zhejiang Red Dragonfly Footwear Co., Ltd., Wenzhou 325105, P.R. China

INFLUENCE OF WALKING DIRECTION ON THE INTRA-LIMB COORDINATION OF HEALTHY CHILDREN AGED BETWEEN THREE AND SIX

ABSTRACT. The aim of this study was first to compare the differences of coordination between forward walking (FW) and reversed backward walking (RevBW) in 40 healthy children aged between three and six; and then to explore interaction effects of age and direction of motion on intra-limb coordination. Kinematics of FW and RevBW of those subjects were measured by Coda motion system. Based on the Euler angle (EA) and angle velocity in knee (OAB), ankle (ABD) and metatarsophalangeal joint (MTH)(BDF), continuous relative phase (CRP) between knee-ankle (θ_{CRP} (**K-A**)) and ankle-metatarsophalangeal (θ_{CRP} (**A-M**)) were calculated. Coefficient of variance between FW and RevBW in each EA and CRP variable were figured out. Statistical model of independent T test and paired T test, as well as univariate analysis were applied with significant level of 0.05 and confidence interval of 95%. Our results show that RevBW significantly increased the amplitude of knee, ankle and MTH joint; while majority of inter-age CoV-EA variables were found less prominent, with exception of CoV-EA (OAB) between ages of five to six. Amplitude-EA variables were recorded with significant differences between FW and RevBW in each age group. In terms of interaction effects, only walking direction showed significant impact on the variables of amplitude-EA. Overall, although BW increased amplitude of motion in knee, ankle and MTH joint, children aged between three and six have already achieved a mechanism that central nervous system could switch their gait control freely.

KEY WORDS: walking direction, coordination, continuous relative phase, children

INFLUENȚA DIRECȚIEI DE MERS ASUPRA COORDONĂRII MEMBRELOR INFERIOARE LA COPIII SĂNĂTOȘI CU VÂRSTE ÎNTRE TREI ȘI ȘASE ANI

REZUMAT. Scopul acestui studiu a fost în primul rând de a compara diferențele de coordonare dintre mersul înainte (FW) și mersul înapoi inversat (RevBW), la 40 de copii sănătoși, cu vârstele cuprinse între trei și șase ani și apoi de a explora efectele interacțiunii dintre vârstă și direcția de mișcare asupra coordonării membrelor. S-a măsurat cinematica mersului înainte și a mersului înapoi inversat al acestor subiecți utilizând sistemul Coda motion. Pornind de la unghiul lui Euler (EA) și viteza unghiului la articulațiile genunchilor (OAB), gleznelor (ABD) și metatarsienelor (BDF), s-a calculat faza continuă relativă (CRP) între genunchi și glezină (θ_{CRP} (**K-A**)) și între gleznă și metatarsiene (θ_{CRP} (**A-M**)). S-a determinat coeficientul de variație între mersul înainte și mersul înapoi inversat pentru fiecare variabilă EA și CRP. S-au aplicat modelele statistice ale testului t independent și testului t cu eșantioane pereche, precum și analiza univariată cu un nivel de semnificație de 0,05 și un interval de încredere de 95%. Rezultatele noastre arată că mersul înapoi inversat a crescut în mod semnificativ amplitudinea articulațiilor genunchiului, gleznei și metatarsienelor, iar majoritatea variabilelor CoV-EA inter-vârstă au fost mai puțin proeminente, cu excepția CoV-EA (OAB), între vârsta de cinci și șase ani. Variabilele amplitudine-EA au prezentat diferențe semnificative între mersul înainte și mersul înapoi inversat în fiecare grupă de vârstă. În ceea ce privește efectele interacțiunii, doar direcția de mers a avut un impact semnificativ asupra variabilelor amplitudine-EA. În general, cu toate că mersul înapoi a crescut amplitudinea mișcării în zona articulațiilor genunchiului, gleznei și metatarsienelor, copiii cu vârste cuprinse între trei și șase ani au dezvoltat un mecanism care permite sistemului nervos central să-și controleze mersul în orice direcție.

CUVINTE CHEIE: direcție de mers, coordonare, fază relativă continuă, copii

L'INFLUENCE DE L'ORIENTATION DE MARCHE SUR LA COORDINATION ENTRE LES MEMBRES CHEZ LES ENFANTS SAINS ÂGÉS ENTRE TROIS ET SIX ANS

RÉSUMÉ. Le but de cette étude a été d'abord de comparer les différences de coordination entre la marche avant (FW) et la marche arrière inversée (RevBW) chez 40 enfants en bonne santé âgés de trois à six ans et puis d'explorer les effets de l'interaction entre l'âge et la direction du mouvement sur la coordination intra-membre. La cinématique de la marche avant et de la marche arrière inversée de ces sujets a été mesurée par le système Coda motion. À partir de l'angle d'Euler (EA) et de la vitesse angulaire dans les articulations du genou (OAB), de la cheville (ABD) et des métatarsophalangiennes (BDF), on a calculé la phase relative continue (CRP) entre le genou et la cheville (θ_{CRP} (**K-A**)) et entre la cheville et les métatarsophalangiennes (θ_{CRP} (**A-M**)). On a calculé le coefficient de variance entre la marche avant et la marche arrière inversée pour chaque variable EA et CRP. Le modèle statistique du test T indépendant et du test T apparié, ainsi que l'analyse univariée ont été appliqués avec un niveau de signification de 0,05 et un intervalle de confiance de 95%. Nos résultats montrent que la marche arrière inversée a augmenté significativement l'amplitude des articulations du genou, de la cheville et des métatarsophalangiennes, tandis que la majorité des variables inter-âge CoV-EA ont été moins importantes, à l'exception de CoV-EA (OAB) entre les âges cinq et six. Les variables amplitude-EA ont été enregistrées avec des différences significatives entre la marche avant et la marche arrière inversée dans chaque groupe d'âge. En termes d'effets d'interaction, seulement la direction de marche a montré un impact significatif sur les variables amplitude-EA. Dans l'ensemble, bien que la marche arrière ait augmenté l'amplitude du mouvement dans les articulations du genou, de la cheville et des métatarsophalangiennes, les enfants âgés entre trois et six ans ont déjà développé un mécanisme par lequel le système nerveux central peut contrôler leur marche dans toute direction.

MOTS CLÉS : direction de marche, coordination, phase relative continue, enfants

Correspondence to: Jin ZHOU, National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu 610065, P.R. China, e-mail: zj_scu@qq.com

INTRODUCTION

Human development of motion is a complex process, especially in the age since independent walking to six years old. During this period, not only independent walking is performed, but also 'Neuro-musculo-skeletal' system develops dramatically. After one year of independent walking, their gait pattern transferred from foot flat to heel contact one [1]; while, gait coordination was still developing within period of three to six years old [2]. Since feet are the only parts of the human body contacting with the ground and they play a major role in acceptance of loading during the stance phase and then transfer loading to other parts of the lower limbs. However, activities such as walking, running etc. are under control of 'Neuro-musculo-skeletal' system. Thereby, by assessing the performance of children completing various gait tasks, their development in 'Neuro-musculo-skeletal' system could be comprehended.

Current research suggested that neural control of forward walking (FW) and backward walking (BW) might largely originate from the same basic neural circuitry [3] and it could be observed from that BW often presented a contrary motion cycle from that of FW. Thereby, gait cycle of BW could be reversed and transferred into reverse backward walking (RevBW) [4] and by comparing with that of FW, degree of children's development in motion could be interpreted. Pieter Meyns [3] contrasted differences of the upper and lower limbs between FW and BW in school-aged children, so as to understand at what age of development they gained the ability of gait control in terms of orientation. In aspect of upper limbs [5], children initially fixed their arms in a high guard position (external rotation in the shoulder, flexed elbows and hands at height of shoulder) and it then gradually changed to a low guard position as age increased (arms extend along the body without active swing). In aspect of lower limbs [6], features of heel strike were considered as a variable assessing the extent of their gait maturation. Phase of heel strike was divided into two stages, one was a very short heel contact, after which knee joint kept the status of

INTRODUCERE

Dezvoltarea funcției motorii la om este un proces complex, mai ales din momentul în care copilul începe să meargă independent și până la vârsta de șase ani. În această perioadă, pe lângă mersul independent, sistemul neuromuscular se dezvoltă dramatic. După un an de mers independent, tiparul de mers se modifică de la atingerea solului cu toată talpa la contactul cu călcâiul [1], iar coordonarea mersului continuă să se dezvolte în perioada de la trei la șase ani [2]. Întrucât labele picioarelor reprezintă singura parte a corpului uman care intră în contact cu solul, acestea joacă un rol important în susținerea greutății în faza de pășire și apoi transferă această greutate în alte părți ale membrelor inferioare. Cu toate acestea, activități precum mersul, alergarea etc. sunt subordonate sistemului neuromuscular. Prin urmare, evaluarea performanțelor copiilor la îndeplinirea anumitor cerințe legate de mers ajută la înțelegerea dezvoltării sistemului neuromuscular al acestora.

Studiile actuale sugerează că, atât mersul înainte (FW), cât și mersul înapoi (BW) își au originea în același circuit neuronal [3] și se poate observa că mersul înapoi a prezentat deseori un ciclu de mișcare contrar celui specific mersului înainte. Prin urmare, ciclul de mers înapoi a putut fi inversat și transformat în mers înapoi inversat (RevBW) [4] și s-a putut interpreta gradul de dezvoltare a funcției motorie a copiilor în comparație cu mersul înainte. Pieter Meyns [3] a comparat diferențele la nivelul membrelor superioare și inferioare între mersul înainte și mersul înapoi la copiii de vârstă școlară, pentru a înțelege la ce vârstă apare capacitatea de a-și controla mersul în ceea ce privește orientarea. În cazul membrelor superioare [5], copiii își fixează inițial brațele într-o poziție de gardă (rotația exterioară a umerilor, coatele îndoite și mâinile ridicate la nivelul umerilor) apoi se modifică treptat pe măsură ce înaintează în vârstă (brațele întinse de-a lungul corpului fără balans activ). În cazul membrelor inferioare [6], caracteristicile atacului cu călcâiul au fost considerate variabile în evaluarea nivelului de maturitate al mersului copiilor. Etapa atacului cu călcâiul a fost împărțită în două sub-etape: prima reprezentată de un contact foarte scurt al călcâiului, după care articulația genunchiului s-a menținut în extensie, iar cea de a doua reprezentată de contactul

extension; another was overall contacting of the heel. Whereas, in child population, Hallemans [1] suggested that gait pattern of heel-strike was found in the age of 1.5 years; but other literatures implied that adult-like length, width and frequency of gait were obtained after the age of 13 [7]. Moreover, Fritz [8] explored the correlation between FW and BW in order to interpret the maturation of the gait.

Mathematical model for coordination assessment was recommended to be composed with the factors such as time, angle and velocity at key segments or joints. According to those factors, Miller *et al*. [9] built a continuous relative phase (CRP) model to quantify the coordination in human walking; besides, they also compared effectiveness and sensitivity of CRP with those of vector coding. Further, by utilizing the CRP model, Chang [10] and Leardini [11] evaluated coordination of rear-foot, mid-foot and fore-foot during the stance phase; while Shiu-Ling Chiu *et al*. [12] contrasted differences of coordination between young and elder adult in walking with varied velocity. Moreover, distinctions of coordination in various sports [13] or foot deformity groups [14] were also evaluated in current literature. However, there were deviations between FW and RevBW in terms of intra-limb coordination in stance phase of walking of healthy children aged between three and six has not been studied.

Therefore, the aim of this study was first to compare the differences of coordination existed between FW and RevBW in healthy children aged between three and six; and then to explore interaction effects of age and direction of motion on intra-limb coordination. Two hypotheses were proposed: (1) as the age increased, correlation between FW and RevBW promoted gradually; (2) interaction effects of age and direction on coordination were significant.

METHODS

Subjects

Totally, 40 healthy children aged between three and six were recruited in this study and four age groups were classified by one-year

integral al călcâiului. Hallemans [1] a sugerat că, în rândul copiilor, tiparul de mers care include atacul călcâiului a fost observat la vârsta de un an și jumătate, însă alte studii au arătat că lungimea, lățimea și frecvența mersului se dezvoltă după vârsta de 13 ani [7]. Mai mult decât atât, Fritz [8] a explorat corelația dintre mersul înainte și mersul înapoi pentru a interpreta dezvoltarea mersului.

Se recomandă ca modelul matematic pentru evaluarea coordonării să fie compus din factori precum timpul, unghiul și viteza la articulații sau segmente cheie. Pe baza acestor factori, Miller și colab. [9] au construit un model cu fază continuă relativă (CRP) pentru a cuantifica coordonarea în mersul uman; pe lângă aceasta, autorii au comparat eficiența și sensibilitatea CRP cu cele ale modelelor cu codificare pe bază de vectori. Mai mult, prin utilizarea modelului CRP, Chang [10] și Leardini [11] au evaluat coordonarea retropiciorului, zonei centrale și antepiciorului în timpul fazei de pășire; în timp ce Shiu-Ling Chiu și colab. [12] au comparat diferențele de coordonare dintre adulții tineri și cei mai în vârstă în timpul mersului cu viteze variabile. Mai mult decât atât, în studiile actuale s-au evaluat diferențele de coordonare în cadrul diferitelor sporturi [13] sau în cadrul grupurilor ce prezintă deformări ale picioarelor [14]. Cu toate acestea, nu s-au studiat variațiile dintre mersul înainte și mersul înapoi inversat în ceea ce privește coordonarea membrelor în faza de pășire a mersului la copiii sănătoși cu vârsta între trei și șase ani.

Prin urmare, scopul acestui studiu a fost mai întâi de a compara diferențele de coordonare dintre mersul înainte și mersul înapoi inversat la copiii sănătoși cu vârsta între trei și șase ani și apoi de a explora efectele interacțiunii dintre vârstă și direcția de mișcare asupra coordonării membrelor. S-au propus două ipoteze: (1) pe măsură ce înaintează în vârstă, corelația dintre mersul înainte și mersul înapoi inversat crește treptat; (2) efectele interacțiunii dintre vârstă și direcție asupra coordonării sunt semnificative.

METODE

Subiecți

Pentru acest studiu s-au recrutat în total 40 de copii sănătoși cu vârsta între trei și șase ani, clasificându-se în patru grupe de vârstă

interval. Criterion of inclusion was shown below: (1) without abnormal gait pattern, such as crouch gait; (2) walking independently; (3) without foot deformities or injuries; (4) the range of body weight index (BMI) was consistent with the BMI standard for normal weight of Chinese children [15]. All the measures were carried out after introducing methods and procedures of this study to their parents and receiving their formal approval. All the measurements and procedures followed the principles of Helsinki declaration.

Three-dimensional Motion Captures

Coda motion system (Coda motion cx1, Charnwood Dynamics Ltd., United Kingdom) was used in this study to obtain the temporal-spatial parameters of children's lower limbs while normal walking. Twenty key positions were first marked (Figure 1) and details of those markers were shown below: marker 'O' was a point of anterior superior iliac spine; marker 'A1' and 'A2' represented the medial and lateral prominence of the distal of thigh; 'B1' and 'B2' indicated the medial and lateral prominence of ankle; 'C1' and 'C2' are the medial and lateral swell of heel; 'D1' and 'D2' implied the 1st and 5th metatarsophalangeal (MTH); 'F' was the tip point of the hallux. Based on the mathematical model of virtual points of Odin software (V1.02, Charnwood Dynamics Ltd., United Kingdom), virtual markers of 'A' (central point of knee), 'B' (central point of ankle), 'C' (central point of heel), 'D' (central point of forefoot) and 'E' (rear point of heel) were generated. Two collectors were aligned on the two side of the six-meter-long walking track and they were facing with angle of 120 degrees.

All subjects were asked to change their clothes into a tight one when they arrived; and then markers were set by the same researcher. A three to five minute warm-up was provided for their familiarization. Afterwards, subjects walked in their own selected speed on the track and simultaneously the data recording was open; FW and BW were measured randomly. At least five successful trails would be required for each side of foot.

la un interval de un an. Criteriile de includere au fost următoarele: (1) lipsa unui tipar de mers anormal, cum ar fi mersul ghemuit; (2) mers independent; (3) lipsa deformărilor și a leziunilor; (4) intervalul indicelui de masă corporală (IMC) în conformitate cu standardul IMC pentru copiii din China cu greutate normală [15]. Toate măsurătorile au fost efectuate după prezentarea metodelor și procedurilor din acest studiu părinților și primirea aprobării oficiale a acestora. Toate măsurătorile și procedurile au respectat principiile Declarației de la Helsinki.

Captarea mișcării tridimensionale

În acest studiu s-a utilizat sistemul Coda motion (Coda motion cx1, Charnwood Dynamics Ltd., Marea Britanie) pentru a obține parametrii temporali și spațiali ai membrelor inferioare ale copiilor în timpul mersului normal. S-au marcat mai întâi 20 de poziții-cheie (Figura 1), cu următoarele detalii: markerul 'O' a reprezentat un punct al coloanei vertebrale iliace antero-superioare; markerii 'A1' și 'A2' au reprezentat proeminența interioară și exterioară a segmentului distal al coapsei; 'B1' și 'B2' au indicat proeminența interioară și exterioară a gleznei; 'C1' și 'C2' au reprezentat proeminența interioară și exterioară a călcâiului; 'D1' și 'D2' au indicat primul și al cincilea metatarsian; 'F' a reprezentat vârful halucelui. Pe baza modelului matematic cu puncte virtuale realizat cu programul Odin (V1.02, Charnwood Dynamics Ltd., Marea Britanie), s-au generat markerii virtuali ai punctelor 'A' (punctul central al genunchiului), 'B' (punctul central al gleznei), 'C' (punctul central al călcâiului), 'D' (punctul central al antepiciorului) și 'E' (punctul posterior extrem al călcâiului). S-au plasat două unități de colectare, câte una pe fiecare parte a pistei de mers cu lungime de șase metri, poziționate la un unghi de 120 de grade.

Tuturor subiecților li s-a cerut să se schimbe în haine mai strâmte, apoi s-au poziționat markerii de către aceeași persoană. Subiecților li s-au acordat trei-cinci minute pentru familiarizare. După aceea, subiecții au mers cu o viteză la alegere pe pistă, înregistrându-se datele simultan. Mersul înainte și mersul înapoi au fost măsurate aleatoriu. Au fost necesare cel puțin cinci încercări reușite pentru fiecare parte a piciorului.

Data Processing

At first, complete stance phases of each side of foot were filtered out; and then they were normalized to 100% modified gait cycle (MGC); while, time axis of backward walking were reversed and its gait cycle was modified as reversed MGC (RevMGC). Euler angle (EA) (θ) and angular velocity (ω) in zxy coordination sequence were calculated in the Odin software and flexion/extension and dorsiflexion/plantarflexion of knee (θ(OAB) / ω(OAB)), ankle (θ(ABD) / ω(ABD)) and MTH (θ(BDF) / ω(BDF)) were chosen for further analysis. Mathematical model of CRP was utilized (EQ 1-4) for coordination analysis between knee-ankle (θ_{CRP}(**K-A**)) and ankle-MTH (θ_{CRP}(**A-M**)). The procedure of calculation was shown below: θ and ω were first normalized into $\overline{\theta}$ and $\overline{\omega}$ (EQ 1 and EQ 2); and then φ(OAB), φ(ABD) and φ(BDF) were figured out according to EQ 3; at last, θ_{CRP}(**K-A**) and θ_{CRP}(**A-M**) were resolved (EQ 4). In-phase indicated that θ_{CRP} was within the range between 0 and 30 degrees; while that of anti-phase was 150 and 180 degrees; further, other angle was classified into out-phase [16].

Statistical Analysis

Intra-subject's data was first averaged and then inter subjects'. One sample K-S model was used to test normal distribution and all data were approved to be following with the normal distribution; meanwhile distinctions

Prelucrarea datelor

Mai întâi s-au selectat fazele de pășire complete pentru fiecare parte a piciorului, apoi s-au normalizat la un ciclu de mers modificat 100% (MGC). Axa timpului pentru mersul înapoi a fost inversată și ciclul de mers a fost modificat, rezultând MGC inversat (RevMGC). Unghiul lui Euler (EA) (θ) și viteza unghiulară (ω) în secvența de coordonare zxy au fost calculate cu programul Odin, iar flexiunea/extensia și flexiunea dorsală/flexiunea plantară ale genunchiului (θ(OAB)/ω(OAB)), gleznei (θ(ABD)/ω(ABD)) și metatarsienelor (θ(BDF) / ω(BDF)) au fost selectate pentru analiză suplimentară. Modelul matematic CRP a fost utilizat (Ec. 1-4) pentru analiza coordonării dintre genunchi și gleznă (θ_{CRP}(**K-A**)) și gleznă-metatarsiene (θ (**A-M**)). Procedura de calcul a fost următoarea: θ și ω au fost mai întâi normalizate în $\overline{\theta}$ și $\overline{\omega}$ (Ec. 1 și Ec. 2); apoi φ(OAB), φ(ABD) și φ(BDF) au fost determinate conform Ec. 3; în cele din urmă, θ_{CRP}(**K-A**) și θ_{CRP}(**A-M**) au fost rezolvate (Ec. 4). Atunci când θ_{CRP} s-a situat în intervalul dintre 0 și 30 de grade, oscilația a fost în fază, când s-a situat între 150 și 180 de grade, oscilația a fost în antifază, iar când s-a situat în alte unghiuri, oscilația a fost considerată în cuadratură [16].

Analiza statistică

S-a făcut mai întâi o medie a datelor intra-subiect și apoi a datelor inter-subiect. S-a utilizat modelul K-S cu un eșantion, care a

$$\overline{\theta} = 2\left[\frac{\theta - \min(\theta)}{\max(\theta) - \min(\theta)}\right] - 1 \qquad (1)$$

$$\overline{\omega} = \left[\frac{\omega}{\max(\omega)}\right] \qquad (2)$$

$$\varphi(i) = \tan^{-1}\left[\frac{\overline{\omega}(i)}{\overline{\theta}(i)}\right], \quad i = 1,2,\ldots,n \qquad (3)$$

$$\theta_{CRP}(i) = \left|\varphi_1(i) - \varphi_2(i)\right| \qquad (4)$$

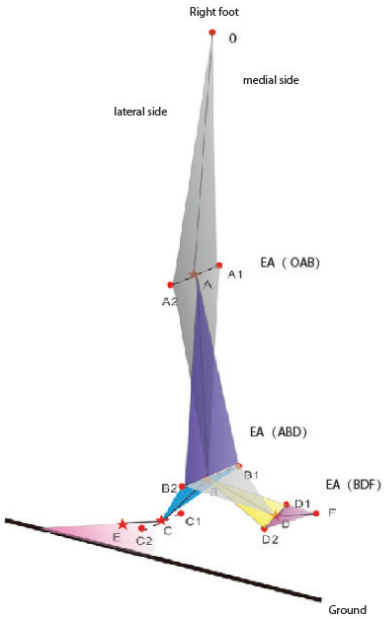

Figure 1. Markers set in the lower limb
Figura 1. Markeri poziţionaţi pe membrul inferior

between left and right foot were examined by independent T test and only right side of lower limbs were considered. Afterwards, according to the EA of (OAB), (ABD) and (BDF) in the Z axis, coefficient of variance (CoV) was calculated in order to assess the correlation between FW and BW, where CoV= (typical error) / (mean value of FW and RevBW). Inter-age differences of variable of CoV were evaluated by independent T test; while intra-age differences of amplitude of EA and CRP were assessed by paired-T test. At last, interaction effects of the age (age 3, 4, 5, 6) and walking direction (FW and RevBW) on the lower limb coordination of healthy children were analyzed by General linear model with repeated measure; where age and walking were considered as the fix factors. All the statistical models were executed under SPSS with significant level of 0.05 and confidence interval of 95%.

RESULTS AND DISCUSSION

Anthropometrical information of subjects was shown in Table 1.

In terms of inter-age variations, there were significant differences of CoV in EA (OAB) between age of five and six ($p=0.004<0.05$); while other inter-age deviations were not significant. Moreover, significant intra-age differences also existed in amplitude-EA (OAB)($p=0.004<0.05$ for age 3; $p=0.000<0.05$ for age 4; $p=0.001<0.05$ for

confirmat distribuția normală a tuturor datelor. Diferențele dintre piciorul stâng și cel drept au fost examinate cu ajutorul testului t independent și s-a luat în considerare doar partea dreaptă a membrelor inferioare. După aceea, s-a calculat coeficientul de variație (CoV) pe baza punctelor EA al (OAB), (ABD) și (BDF) pe axa Z, pentru a evalua corelația dintre mersul înainte și mersul înapoi, unde CoV = (eroare tipică) / (valoare medie a mersului înainte și mersului înapoi). Diferențele inter-vârstă ale variabilelor CoV au fost evaluate cu ajutorul testului t independent; în timp ce diferențele intra-vârstă ale amplitudinii EA și CRP au fost evaluate cu ajutorul testului t cu eșantioane pereche. În cele din urmă, efectele interacțiunii dintre vârstă (3, 4, 5, 6 ani) și direcția de mers (mers înainte și mers înapoi inversat) asupra coordonării membrelor inferioare la copiii sănătoși au fost analizate utilizând modelul liniar general cu măsurători repetate; unde vârsta și mersul sunt considerate factori invariabili. Toate modelele statistice au fost executate cu programul SPSS cu un nivel de semnificație de 0,05 și interval de încredere de 95%.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Datele antropometrice ale subiecților sunt prezentate în Tabelul 1.

În ceea ce privește variațiile inter-vârstă, au existat diferențe semnificative ale CoV în punctul EA (OAB) între vârstele cinci și șase ani ($p=0,004<0,05$); în timp ce alte variații inter-vârstă nu au fost semnificative. Mai mult decât atât, au existat diferențe semnificative intra-

Table 1: Anthropometry of the subjects
Tabelul 1: Datele antropometrice ale subiecţilor

Variables *Variabile*	Age 3 *3 ani*	Age 4 *4 ani*	Age 5 *5 ani*	Age 6 *6 ani*
N	10	10	10	10
Gender (M/F) *Sex (M/F)*	1/1	1/1	1/1	1/1
Age (ys) *Vârsta (ani)*	3.1ys±0.2ys	4.1ys±0.2ys	5.0 ys±0.2 ys	5.9 ys±0.2 ys
Weight (kg) *Greutatea (kg)*	14.8±1.6	17.2±1.7	17.4±1.6	19.7±2.1
Height (cm) *Înălţimea (cm)*	96.4±4.7	105.1±4.2	107.2±1.5	112.5±5.7
BMI *IMC*	15.9±1.3	15.5±1	15.1±1.2	15.6±1.0

age 5; p=0.020<0.05 for age 6), amplitude-EA (ABD)(p=0.000<0.05 for age 3; p=0.000<0.05 for age 4; p=0.005<0.05 for age 5 p=0.000<0.05 for age 6) and amplitude-EA (BDF) (p=0.001<0.05 for age 3;p=0.003<0.05 for age 4;p=0.002<0.05 for age 5;p=0.000<0.05 for age 6) between FW and RevBW, where RevBW was recorded with a higher value than that of FW.

Univariate analysis show that age has no significant effect on the gait coordination; whereas, the walking direction significantly affected the amplitude of EA (OAB) (p=0.000<0.001), EA (ABD) (p=0.000<0.001) and EA (BDF) (p=0.000<0.001); meanwhile, interaction effects from age and walking direction were obtained with less significant impact on the coordination.

Discussion

In this study, kinematic data while FW and BW of 40 healthy children aged between three and six were first measured; and then their intra-limb coordination was calculated. By exploring the variations between FW and RevBW, the effect of walking direction on the motion of healthy children could be interpreted. Our results show that RevBW significantly increased the amplitude of knee, ankle and MTH joint; while majority of inter-age CoV-EA variables were found less prominent, with exception of CoV-EA (OAB) between ages of five to six. Amplitude-EA variables were recorded with significant differences between FW and RevBW in each age group. In terms of interaction effects, only walking direction showed significant impact

vârstă la amplitudine-EA (OAB) (p=0,004<0,05 pentru vârsta de 3 ani; p=0,000<0,05 pentru vârsta de 4 ani; p=0,001<0,05 pentru vârsta de 5 ani; p=0,020<0,05 pentru vârsta de 6 ani), amplitudine-EA (ABD) (p=0,000<0,05 pentru vârsta de 3 ani; p=0,000<0,05 pentru vârsta de 4 ani; p=0,005<0,05 pentru vârsta de 5 ani; p=0,000<0,05 pentru vârsta de 6 ani) și amplitudine-EA (BDF) (p=0,001<0,05 pentru vârsta de 3 ani; p=0,003<0,05 pentru vârsta de 4 ani; p=0,002<0,05 pentru vârsta de 5 ani; p=0,000<0,05 pentru vârsta de 6 ani) între mersul înainte și mersul înapoi inversat, unde pentru mersul înapoi inversat s-a înregistrat o valoare mai mare decât cea pentru mersul înainte.

Analiza univariată indică faptul că vârsta nu are niciun efect semnificativ asupra coordonării mersului; în timp ce direcția de mers a afectat semnificativ amplitudinea EA (OAB) (p=0,000<0,001), EA (ABD) (p=0,000<0,001) și EA (BDF) (p=0,000<0,001). Efectele interacțiunii vârstei și direcției de mers au avut un impact mai puțin semnificativ asupra coordonării.

Discuții

În acest studiu, s-au măsurat mai întâi datele cinematice în timpul mersului înainte și înapoi la 40 de copii sănătoși cu vârsta între trei și șase ani, apoi s-a calculat coordonarea membrelor acestora. Prin explorarea variațiilor dintre mersul înainte și mersul înapoi inversat, s-a putut interpreta efectul direcției de mers asupra mișcării copiilor sănătoși. Rezultatele noastre arată că mersul înapoi inversat a crescut semnificativ amplitudinea articulațiilor genunchilor, gleznelor și metatarsienelor, iar majoritatea variabilelor CoV-EA inter-vârstă au fost mai puțin semnificative, cu excepția

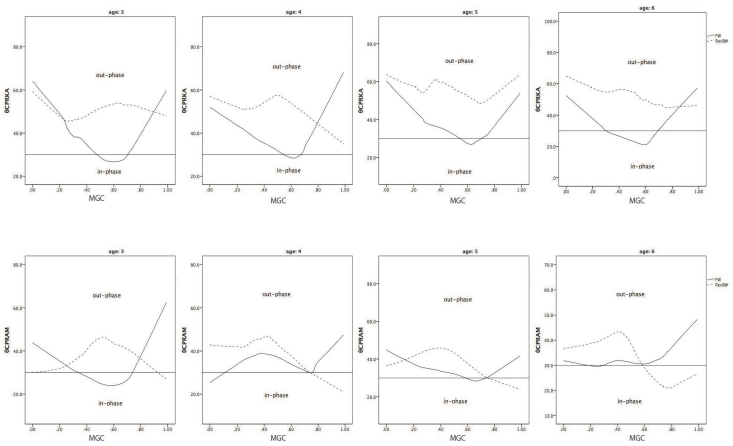

Figure 2. Tracks of continuous relative phase of FW and RevBW
Figura 2. Diagramele fazelor continue relative în mersul înainte și mersul înapoi inversat

on the variables of amplitude-EA.

Results of Myens [3] suggested that most of the gait mechanism in normal walking were limited in that of RevBW; meanwhile, they reported reduced gait coordination stability when walking backwards. However, other researchers showed that differences between FW and RevBW were small, which could also be confirmed by outcomes of CoV in our study. Similar with the vision being artificially blinded [17], walking speed of RevBW was lowered, as the information after back was unknown. Reduced walking speed could cause a larger range of joint motion. It was the reason that all variables of amplitude in knee, ankle and MTH joints were obtained with significant higher value than that of FW. Jansen [18] implied that since the heel contact in RevBW, the main cushion occurred in the forefoot; thereby a more muscle of anterior tibia actions were required.

Myens [3] further indicated that age exhibited mild effects on a few specific kinematic gait characteristics measured in a group of primary school-aged children, such as amplitude of lower leg, foot elevation angles, timing of the first peak or valley of the upper leg and lower leg elevation angles. In the viewpoint of Sutherland [6], gait features such as step length, width and frequency were full-filled between age of four and seven. Our finding confirmed that develop of children's gait control in RevBW was earlier than the existing research. In contrast between FW and RewBW, only variable of CoV-EA (OAB) was recorded with significant differences between age of five and six. Moreover, interaction effects

CoV-EA (OAB) între vârstele de cinci și șase ani. S-au înregistrat variabilele amplitudine-EA cu diferențe semnificative între mersul înainte și mersul înapoi inversat în fiecare grupă de vârstă. În ceea ce privește efectele de interacțiune, doar direcția de mers a prezentat un impact semnificativ asupra variabilelor amplitudine-EA.

Rezultatele lui Myens și colab. [3] au sugerat că, în mare parte, mecanismul de mers a fost limitat în mersul înapoi inversat; totodată, aceștia au raportat o stabilitate redusă a coordonării în timpul mersului înapoi. Cu toate acestea, alți cercetători au arătat că diferențele dintre mersul înainte și mersul înapoi inversat au fost mici, ceea ce poate fi confirmat și de rezultatele CoV din studiul nostru. În mod asemănător cu orbirea artificială [17], viteza de mers în mersul înapoi inversat a scăzut, întrucât nu au existat informații. Viteza redusă de mers a dus la o mișcare a articulației mai amplă. Acesta a fost motivul pentru care toate variabilele amplitudinii la articulațiile genunchilor, gleznelor și metatarsienelor au avut o valoare semnificativ mai mare decât cea obținută în cazul mersului înainte. Jansen [18] a sugerat că, întrucât în mersul înapoi inversat contactul se face cu călcâiul, antepiciorul devine principala zonă de amortizare; prin urmare, este necesar un efort muscular mai mare pentru antrenarea marginii anterioare a tibiei.

Myens [3] a mers mai departe indicând că, într-o măsură mică, vârsta influențează câteva caracteristici cinematice ale mersului măsurate la un grup de copii de vârstă școlară, precum amplitudinea părții inferioare a piciorului, unghiurile de elevație ale labei piciorului, momentul primului punct maxim sau punctul minim al unghiurilor de elevație ale părților superioară și inferioară ale piciorului. Din

Table 2: Differences analysis between FW and RevBW of CoV, amplitude of EA and CRP variables within age of three to six (mean (SD))

Tabelul 2: Analiza diferenţelor dintre mersul înainte şi mersul înapoi inversat privind CoV, amplitudinea EA şi variabilele CRP între trei şi şase ani ((SD) medie)

	3 ys ***3 ani***			**4 ys** ***4 ani***			**5 ys** ***5 ani***			**6 ys** ***6 ani***					
Variable *Variabile*	FW-RevBW *Mers înainte-mers înapoi inversat*			FW-RevBW *Mers înainte-mers înapoi inversat*	*P* inter-age (3ys vs 4ys) P *inter-vârstă (3 ani vs. 4 ani)*		FW-RevBW *Mers înainte-mers înapoi inversat*	*P* inter-age (4ys vs 5ys) P *inter-vârstă (4 ani vs. 5 ani)*		FW-RevBW *Mers înainte-mers înapoi inversat*	*P* inter-age (5ys vs 6ys) P *inter-vârstă (5 ani vs. 6 ani)*				
CoV-EA(OAB)	0.253(0.086)			0.201(0.071)	0.364		0.242(0.081)	0.650		0.155(0.066)	***0.004****				
CoV-EA(ABD)	0.234(0.062)			0.192(0.057)	0.070		0.171(0.051)	0.705		0.174(0.069)	1.000				
CoV-EA(BDF)	0.076(0.059)			0.092(0.034)	0.151		0.119(0.112)	0.940		0.077(0.043)	0.174				
CoV-θ_{CRP} (K-A)	0.034(0.006)			0.039(0.008)	0.112		0.034(0.005)	0.199		0.036(0.006)	0.597				
CoV- θ_{CRP} (A-M)	0.041(0.006)			0.041(0.006)	1.000		0.042(0.009)	0.762		0.046(0.008)	0.406				
	FW *Mers înainte*	RevBW *Mers înapoi inversat*	*P* intra-age P *intra-vârstă*	FW *Mers înainte*	RevBW *Mers înapoi inversat*	*P* intra-age P *intra-vârstă*	FW *Mers înainte*	RevBW *Mers înapoi inversat*	*P* intra-age P *intra-vârstă*	FW *Mers înainte*	RevBW *Mers înapoi inversat*	*P* intra-age P *intra-vârstă*	*P* Age P *vârstă*	*P* Direction P *direcţie*	*P* Direction*Age P *direcţie*vârstă*
Amplitude-EA(OAB) *Amplitudine-EA(OAB)*	69.1(9.7)	93.2(7.2)	***0.004****	69.9(12.4)	99.1(10.2)	***0.000*****	71.5(12.0)	94.7(4.7)	***0.001****	84.0(10.9)	94.7(7.3)	***0.020****	0.125	***0.000*****	0.356
Amplitude-EA(ABD) *Amplitudine-EA(ABD)*	149.8(15.2)	178.6(9.4)	***0.000*****	140.6(9.3)	164.2(52.2)	***0.000*****	133.6(24.0)	174.2(15.5)	***0.005****	144.9(13.8)	179.5(8.5)	***0.000*****	0.162	***0.000*****	0.179
Amplitude-EA(BDF) *Amplitudine-EA(BDF)*	93.2(25.9)	107.9(31.2)	***0.001****	83.7(26.4)	100.3(16.0)	***0.003****	84.9(31.4)	97.8(19.6)	***0.002****	73.6(25.3)	97.1(12.3)	***0.000*****	0.968	***0.000*****	0.412
θ_{CRP} (K-A)	39.9(6.4)	49.6(12.7)	0.477	41.8(5.1)	50.6(15.7)	0.97	39.2(7.3)	56.0(12.6)	0.664	35.1(8.6)	53.2(8.1)	***0.004****	0.451	0.190	0.190
θ_{CRP} (A-M)	34.1(4.0)	37.0(13.9)	0.806	36.2(5.9)	38.2(10.8)	0.298	34.7(8.2)	39.1(7.0)	0.958	33.9(7.1)	33.0(7.5)	0.759	0.594	0.161	0.830

* significant differences lower than 0.05;
** diferenţe semnificative mai mici decât 0,05;*
** significant differences lower than 0.001.
*** diferenţe semnificative mai mici decât 0,001.*

of age and walking direction were showed no significant impact on the coordination variables. Hence, we implied that children aged between three and six have mastered the gait control when walking backwards. Our finding could be explained by Dietz [19], who reported that in humans basic neural control could be simply transferred between the mode of walking forwards and backwards.

CONCLUSION

Overall, although BW increased amplitude of motion in knee, ankle and MTH joint, children aged between three and six have already achieved a mechanism that central nervous system could switch their gait control freely.

perspectiva lui Sutherland [6], caracteristici ale mersului precum lungimea, lățimea și frecvența pașilor se dezvoltă complet între vârstele de patru și șapte ani. Rezultatele noastre au confirmat că dezvoltarea controlului asupra mersului în mersul înapoi inversat a avut loc mai devreme decât în alte studii existente. Comparând mersul înainte și mersul înapoi inversat, doar variabila CoV-EA (OAB) a prezentat diferențe semnificative între vârstele cinci și șase. Mai mult decât atât, efectele interacțiunii dintre vârstă și direcția de mers nu au prezentat un impact semnificativ asupra variabilelor de coordonare. Prin urmare, am dedus că copiii cu vârste între trei și șase ani au dobândit control în mersul înapoi. Rezultatul nostru poate fi explicat de Dietz [19], care a raportat că, la oameni, controlul neuronal de bază poate fi pur și simplu transferat între modurile de mers înainte și înapoi.

CONCLUZII

Per ansamblu, deși în situația mersului înapoi a crescut amplitudinea mișcării în zona articulațiilor genunchilor, gleznelor și metatarsienelor, copiii cu vârste între trei și șase ani au dezvoltat un mecanism care permite sistemului nervos central să-și controleze mersul în orice direcție.

REFERENCES

1. Hallemans, A., D'Août, K., De Clercq, D., Aerts, P., *Foot and Ankle International*, **2003**, 24, 444-453.
2. Bosch, K., Gerss, J., Rosenbaum, D., *Gait Posture*, **2010**, 32, 564-71.
3. Meyns, P., Desloovere, K., Molenaers, G., Swinnen, S.P., Duysens, J., *PLOS ONE*, **2013**, 8, e62747-e62747.
4. Duysens, J., Tax, A.A., Murrer, L., Dietz, V., *J Neurophysiol*, **1996**, 76, 301–310.
5. Ledebt, A., *Infant Behav Dev*, **2000**, 23, 79–89.
6. Sutherland, D.H., Olshen, R., Cooper, L., Woo, S.L., *J Bone Joint Surg Am*, **1980**, 62, 3, 336–353.
7. Lythgo, N., Wilson, C., Galea, M., *Gait Posture*, **2009**, 30, 502–506.
8. Fritz, N.E., Worstell, A.M., Kloos, A.D., Siles, A.B., White, S.E., Kegelmeyer, D.A., *Gait Posture*, **2013**, 37, 4, 593-597.
9. Miller, R.H., Chang, R., Baird, J.L., Van Emmerik, R.E.A., Hamill, J., *J Biomech*, **2010**, 43, 13, 2554-2560.
10. Chang, R., Van Emmerik, R., Hamill, J., *J Biomech*, **2008**, 41, 3101-3105.
11. Leardini, A., Benedetti, M.G., Berti, L., Bettinelli, D., Nativo, R., Giannini, S., *Gait Posture*, **2007**, 25, 3, 453–462.
12. Chiu, S.L., Chou, L.S., *J Biomech*, **2012**, 45, 275-280.
13. Krasovsky, T., Lamontagne, A., Feldman, A.G., Levin, M.F., *Gait Posture*, **2014**, 39, 378-385.
14. Wilson, C., Simpson, S.E., Van Emmerik, R.E.A., Hamill, J., *Sports Biomech*, **2008**, 7, 1, 2-9.
15. Chinese Obesity Working Group, *Chinese Journal of Epidemiology*, **2004**, 25, 2, 97-102.
16. Rose, J., Wolff, D.R., Jones, V.K., Bloch, D.A., Oehlert, J.W., Gamble, J.G., *Dev Med Child Neurol*, **2002**, 44, 1, 58-63.
17. Eva, D.H. et al., *Gait Posture*, **2011**, 33, 42-42.
18. Jansen, K., De Groote, F., Massaad, F., Meyns, P., Duysens, J., Jonkers, I., *J Neurophysiol*, **2012**, 107, 3385–3396.
19. Dietz, V., *Trends Neurosci*, **2002**, 25, 9, 462–467.

Article received/Data primirii articolului: 08.07.2016
Accepted/Acceptat la data: 12.09.2016

HISTOLOGICAL, HISTOCHEMICAL AND CHEMICAL STUDY ON *KATSUWONUS PELAMIS* FISH SKINS

STUDIU HISTOLOGIC, HISTOCHIMIC ŞI CHIMIC AL PIELII DE PEŞTE DIN SPECIA *KATSUWONUS PELAMIS*

Eylül KÜÇÜKAKIN[1], Arife Candaş ADIGÜZEL ZENGIN[1], Remziye DEVECI[2], Nilay ÖRK[1], Gökhan ZENGIN[1], Behzat Oral BITLISLI[1*]

[1]Ege University, Faculty of Engineering, Leather Engineering Department, 35100, Bornova, Izmir, Turkey, b.o.bitlisli@gmail.com

[2]Ege University, Faculty of Science, Biology Department, Molecular Biology Division, 35100, Bornova, Izmir, Turkey

HISTOLOGICAL, HISTOCHEMICAL AND CHEMICAL STUDY ON *KATSUWONUS PELAMIS* FISH SKINS

ABSTRACT. In this study, possibility of using Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) fish skins as a new and alternative raw material source for leather industry was investigated. The structural and chemical properties of fish skins have a high impact on the preparation of special production recipes and the manufacturing of high performance valuable fish leathers. For this purpose, characteristic properties of Skipjack Tuna fish skins were evaluated by histological, histochemical and chemical methods. The chemical characteristics of fish skins were determined by analyzing fat content (%), total Kjeldahl nitrogen (%), hide substance (%), volatile matter (%), total ash (%) and fatty acid methyl esters and total amino acid content through instrumental analysis. Histological and histochemical analyses were carried out by Hematoxylin-Eosin and Van Gieson staining techniques. As a result of histological and histochemical investigations, fish skins were found thin and tough due to their surface characteristics, had less collagen content compared to other raw materials commonly used in leather industry and the fibers were orientated in parallel but opposite to striated muscles differently from the other skins. Besides, the fat content, Kjeldahl nitrogen, hide substance, volatile matter and total ash of *Katsuwonus pelamis* fish skins were found 24.47±1.76%, 10.20±0.28%, 57.32±1.55%, 37.33±4.01% and 1.23±0.0002% respectively. The results of the study revealed that *Katsuwonus pelamis* fish skins could be an alternative raw material to be used in the production of high value added luxury leathers.

KEY WORDS: *Katsuwonus pelamis*, histological, histochemical, chemical, fish skins

STUDIU HISTOLOGIC, HISTOCHIMIC ŞI CHIMIC AL PIELII DE PEŞTE DIN SPECIA *KATSUWONUS PELAMIS*

REZUMAT. În acest studiu s-a investigat posibilitatea de a utiliza pielea de ton dungat (*Katsuwonus pelamis*) ca o sursă nouă şi alternativă de materie primă pentru industria de pielărie. Proprietăţile structurale şi chimice ale pieilor de peşte au un impact mare asupra pregătirii reţetelor speciale de producţie şi fabricării de înaltă performanţă a pieilor de peşte valoroase. În acest scop, proprietăţile specifice ale pieilor de ton dungat au fost evaluate prin metode histologice, histochimice şi chimice. Caracteristicile chimice ale pieilor de peşte au fost determinate prin analize instrumentale privind conţinutul de grăsime (%), azotul total Kjeldahl (%), substanţa dermică (%), materiile volatile (%), cenuşa totală (%), esterii metilici ai acizilor graşi şi conţinutul total de aminoacizi. Analizele histologice şi histochimice au fost realizate prin tehnicile de colorare hematoxilină-eozină şi Van Gieson. Ca rezultat al investigaţiilor histologice şi histochimice, pieile de peşte s-au dovedit a fi subţiri şi rezistente datorită caracteristicilor de suprafaţă, au avut un conţinut mai mic de colagen, comparativ cu alte materii prime utilizate în mod obişnuit în industria de pielărie, iar fibrele au fost orientate paralel, dar opus muşchilor striaţi, spre deosebire de alte tipuri de piei. În plus, conţinutul de grăsimi, azot Kjeldahl, substanţă dermică, materii volatile şi cenuşă totală al pieilor de peşte *Katsuwonus pelamis* au fost 24,47±1,76%, 10,20±0,28%, 57,32±1,55%, 37,33±4,01%, respectiv 1,23±0,0002%. Rezultatele studiului au arătat că pieile de peşte *Katsuwonus pelamis* pot reprezenta o materie primă alternativă utilizată în producţia de piei de lux cu valoare adăugată mare.

CUVINTE CHEIE: *Katsuwonus pelamis*, histologic, histochimic, chimic, piei de peşte

L'ÉTUDE HISTOLOGIQUE, HISTOCHIMIQUE ET CHIMIQUE SUR LES PEAUX DE POISSONS *KATSUWONUS PELAMIS*

RÉSUMÉ. Dans cette étude, on a étudié la possibilité d'utiliser la peau de la bonite à ventre rayé (*Katsuwonus pelamis*) comme une nouvelle source de matières premières pour l'industrie du cuir. Les propriétés structurales et chimiques des peaux de poisson ont un grand impact sur la préparation des recettes spéciales pour la production et la fabrication de haute performance des peaux de poissons précieux. À cette fin, les propriétés spécifiques des cuirs de bonites à ventre rayé ont été évaluées par des analyses histologiques, histochimiques et chimiques. Les caractéristiques chimiques des peaux de poissons ont été déterminées par l'analyse de la teneur en matières grasses (%), de l'azote total Kjeldahl (%), de la substance dermique (%), de la matière volatile (%), des cendres totales (%) et des esters méthyliques d'acides gras et le total acide aminé par l'analyse instrumentale. Les analyses histochimiques et histologiques ont été réalisées par des techniques de coloration hématoxyline-éosine et Van Gieson. À la suite des études histologiques et histochimiques les cuirs de poissons se sont révélés minces et élastiques en raison des caractéristiques de la surface, ils ont eu une plus faible teneur en collagène, par rapport à d'autres matériaux couramment utilisés dans l'industrie du cuir et les fibres ont été orientés parallèles mais opposées au muscles striés, contrairement à d'autres peaux. En outre, la teneur en matières grasses, l'azote Kjeldahl, la substance dermique, la matière volatile et les cendres totales des peaux de poissons *Katsuwonus pelamis* ont été 24,47±1,76%, 10,20±0,28%, 57,32±1,55% 37,33±4,01% et 1,23±0,0002%. Les résultats des études ont montré que les peaux de poissons *Katsuwonus pelamis* pourraient représenter une matière première alternative pour l'utilisation dans la production de cuir de luxe à forte valeur ajoutée.

MOTS-CLÉS: *Katsuwonus pelamis*, analyses histologiques, histochimiques, chimiques, peaux de poissons

* *Correspondence to: Behzat Oral BITLISLI, Ege University, Faculty of Engineering, Leather Engineering Department, 35100, Bornova, Izmir, Turkey, b.o.bitlisli@gmail.com*

INTRODUCTION

In international seafood market, members of the *Scombridae* (*Thunnidae*) family have an important and significant value. These family members are responsible for 4-5% of the world fisheries production acquired by hunting and aquaculture and the estimate amount of this production is claimed to be 4 million tones. Tuna members that have high economic value are represented by almost five species in the production: *Katsuwonus pelamis* – 2 million tons; *Thunnus albacares* – 1.3 million tons; *Thunnus obesus* – 400 thousand tons; *Thunnus alalunga* – 252 thousand tons and *Thunnus thynnus* – 80 thousand tons [1-3].

Fishing industry generates considerably huge amount of fish skins, described as by-products of the industry. Considering this important amount of production, fish skins become an important source of raw materials for leather industry. Fish skins have different structural characteristics and vary from species to species. The production of valuable materials [3, 4] and value added products like gelatin [5] from these skins is seemed to be possible, considering bones and skins of the fishes are approximately the 30% of the total fish waste [6].

Fish skins consist of three layers: epidermis (upper skin) outer, dermis (lower skin) middle and hypodermis inner [7]. Epithelial, goblet, clavate, club, granular, thread, poison, sensory, sacciform, rodlet and merkel cells are present in the fish epidermis [8]. The upper layer of fish skin is covered by mucus secreted by the cells located at the outer skin (epidermis) that makes the outer layer slippery, helps to move easily in the water and prevents the skin from the microorganisms [9]. The mucin, the major component of mucus, composed of glycoproteins can absorb a large amount of water [10]. This carbohydrate component can be changed under stress and environmental conditions [11] and glycoproteins have a wide range of functions such as mechanical, antiviral, antimicrobial, osmotic and ionic transport [12-14].

The Skipjack Tuna, *Katsuwonus pelamis*, is a medium-sized perciform fish in the tuna family, *Scombridae*. It grows up to 1m (3ft) in length. It is a cosmopolitan pelagic fish found in tropical and warm-temperate waters absent from the Black Sea [15, 16]. This pelagic and oceanodromous

INTRODUCERE

Membrii familiei *Scombridae* (*Thunidae*) au o valoare importantă și semnificativă pe piața internațională a fructelor de mare. Aceștia reprezintă 4-5% din producția mondială de peşte rezultată prin vânătoare și acvacultură, iar valoarea estimată a acestei producții este de 4 milioane de tone. Speciile de ton cu o valoare economică ridicată în producție sunt în număr de cinci: *Katsuwonus pelamis* – 2 milioane de tone; *Thunnus albacares* – 1,3 milioane de tone; *Thunnus obesus* – 400 mii de tone; *Thunnus alalunga* – 252 mii de tone și *Thunnus thynnus* – 80 mii de tone [1-3].

Industria pescuitului generează cantități considerabile de piei de pește, considerate produse secundare ale industriei. Având în vedere această cantitate semnificativă, pieile de pește devin o sursă importantă de materii prime pentru industria de pielărie. Pieile de pește au diferite caracteristici structurale și variază de la o specie la alta. Din aceste piei se pot produce materiale valoroase [3, 4] şi produse cu valoare adăugată, cum ar fi gelatina [5], având în vedere faptul că oasele și pieile de pește reprezintă aproximativ 30% din totalul deșeurilor de pește [6].

Pieile de pește constau din trei straturi: epiderma (stratul exterior), derma (stratul interior) și hipoderma [7]. În epiderma peștilor sunt prezente celulele epiteliale, caliciforme, claviforme, granulare, în formă de fir, secretoare de otravă, senzoriale, în formă de sac, în formă de bastonaş și celulele Merkel [8]. Stratul superior al pielii de pește este acoperit de mucus secretat de celulele situate în stratul exterior (epidermă), care face stratul exterior alunecos, ajutând la deplasarea cu ușurință în apă și protejând pielea de microorganisme [9]. Mucina, componenta majoră a mucoasei, compusă din glicoproteine, poate absorbi o cantitate mare de apă [10]. Această componentă din categoria carbohidraților se poate modifica în condiții de stres și de mediu [11], iar glicoproteinele au o gamă largă de funcții mecanice, antivirale, antimicrobiene, osmotice și de transport ionic [12-14].

Tonul dungat, *Katsuwonus pelamis*, este un pește perciform mijlociu din familia tonului, *Scombridae*. Acesta crește până la 1 m în lungime. Este un pește pelagic cosmopolit ce se găsește în apele tropicale și cald-temperate absente din Marea Neagră [15, 16]. Această specie pelagică și oceanodromă crește foarte repede, trăiește puțin și este foarte fecundă.

species is very fast-growing, short-lived, and very fecund. Maximum size recorded is 111 cm fork length (FL) [17] and 34.5 kg. Longevity is estimated to be between 6–8 years, and age of first maturity is estimated to be 1.5 years. Skipjack Tuna make up 60% of the worldwide commercial tuna catch and is mostly used for canning [16].

Fish skins have gained an increased interest in leather industry for producing leathers with attractive and unique grain structure, due to their high potential as an additional raw material source of leather industry. The authors of this paper previously conducted some preliminary structural analyses on Skipjack Tuna [18] and to the best of our knowledge; this is the first study about *Katsuwonus pelamis* fish skin assessment in terms of histological, histochemical and chemical methods.

In this study, histological, histochemical and chemical characterization of *Katsuwonus pelamis* (Skipjack Tuna) fish skin was investigated to reveal the skin structure of Skipjack Tuna for its applicability in leather industry. Consequently, the skin structure of *Katsuwonus pelamis* especially in terms of elastin and collagen structure was examined and the utilization possibilities of the fish skin in leather industry were evaluated.

MATERIAL AND METHOD

Material

In this study, fifteen frozen *Katsuwonus pelamis* fish skins were used for the histological, histochemical and chemical characterization. Skipjack Tuna skins were supplied from Kerevitaş Food Company in Bursa, Turkey. After defrosting the fish skins, wet-salted conservation method was performed and stored at -20°C till the analysis of the raw skins. The average length of the skins excluding the head and tail parts was 30±2 cm. All chemicals used in the analysis were in analytical grade (Merck, Darmstadt, Germany).

Method

Histological and Histochemical Analysis

Two kind of sectioning methods such as paraffin embedding and frozen microtome were used. Tissue samples were taken from different body locations (dorsum, pelvic cavity, lateral line and near caudal) of each fish skin. The skin

Dimensiunea maximă înregistrată este de 111 cm, măsurată de la vârful botului până la bifurcarea înotătoarei caudale [17], iar greutatea, de 34,5 kg. Longevitatea este estimată a fi între 6-8 ani, iar vârsta primei maturități este estimată la 1,5 ani. Tonul dungat reprezintă 60% din captura comercială de ton la nivel mondial și este folosit în principal în industria conservelor [16].

Pieile de pește au suscitat un interes sporit în industria de pielărie în vederea producerii pieilor cu o structură a feţei atractivă și unică, datorită potențialului lor ridicat ca sursă suplimentară de materie primă pentru pielărie. Autorii acestei lucrări au efectuat anterior câteva analize structurale preliminare pe pielea de ton dungat [18] și din câte știm, acesta este primul studiu privind evaluarea pielii de pește *Katsuwonus pelamis* prin metode histologice, histochimice și chimice.

În acest studiu s-a realizat caracterizarea histologică, histochimică și chimică a pielii de *Katsuwonus pelamis* (ton dungat) pentru a pune în evidență structura pielii tonului dungat şi aplicabilitatea acesteia în industria de pielărie. În consecință, s-a examinat pielea de *Katsuwonus pelamis* în special în ceea ce privește structura elastinei și a colagenului și s-au evaluat posibilitățile de utilizare a pielii de pește în industria de pielărie.

MATERIAL ȘI METODĂ

Material

În acest studiu, s-au utilizat cincisprezece piei de pește *Katsuwonus pelamis* congelate pentru caracterizarea histologică, histochimică și chimică. Pieile de ton dungat au fost furnizate de Kerevitaş Food Company din Bursa, Turcia. După decongelarea pieilor de pește, s-a aplicat metoda de conservare cu sare și pieile s-au depozitat la -20°C până la efectuarea analizei. Lungimea medie a pieilor, cu excepția capului și a cozii, a fost de 30±2 cm. Toate substanțele chimice utilizate în studiu au fost de calitate analitică (Merck, Darmstadt, Germania).

Metodă

Analize histologice și histochimice

S-au utilizat două tipuri de metode de secționare, şi anume: încorporarea în parafină și microtomul cu congelare. S-au prelevat

samples fixed in Bouin solution for 48 hours were embedded in paraffin and five µm thick vertical sections were stained by Hematoxylin-Eosin and Van Gieson staining techniques [19]. The same techniques were also applied to the second group skin tissues that were cut by frozen microtome at environment -80°C. All tissues were examined under the Leica DM 4000B model microscope and displayed by Olympus DP71 digital camera.

Chemical Composition of Fish Skins

The fat content [20, 21], total Kjeldahl nitrogen [22], hide substance [23], total sulphated ash [24] and Azeotropic distillation [25] analyzes of raw fish skins were performed for chemical characterization as well as fatty acid methyl esters [26, 27] and total amino acid content as instrumental analysis.

For the total amino acid content, 0.2 g fish skin samples were treated with 5ml 6N HCL and kept in condenser for 24h. The sample weighing was performed between 0.6 and 2g depending on the amino acid content of the samples in 100 ml volumetric flask including the 5 ml Norvalin standard. After the filtration the amino acid content of the fish skins were determined with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). In the study, triplicate analyses were performed for each analysis and mean values were given with standard deviations.

RESULTS AND DISCUSSION

Histological and Histochemical Characteristics

The images of epidermis (Figure 1-4), dermis (Figure 5-8) and hypodermis (Figure 9-12) layers of *Katsuwonus pelamis* fish skin are displayed as below.

The epidermis of Skipjack Tuna skin consists of 3 layers as Outer layer, Inner layer and *Stratum germinativum*. Outer layer has mucosa and 1-5 layer Stratified squamous epithelium cells. Inner layer has melanocyte, club, cubic epithelial and mucus cells. *Stratum germinativum* has also cubic long epithelial cells, mucus glands, pigment cells and lymphocytes [28-30]. The keratin layer on the top is formed by dead cells and right after the Stratified squamous layer epithelium cells are found that both create the epidermis layer of the fish skin (Figure 1-4).

Dermis of the fish skin has three layers as *Stratum spongiosum*, *Stratum laxum* and *Stratum*

probe de țesut din diferite regiuni ale corpului (spate, cavitatea pelviană, linia laterală și în zona înotătoarei caudale) din fiecare piele de pește. Probele de piele fixate în soluție Bouin timp de 48 de ore au fost înglobate în parafină și s-au colorat secțiuni verticale groase de cinci µm prin tehnicile de colorare hematoxilină-eozină și Van Gieson [19]. Aceleași tehnici au fost aplicate la cel de al doilea grup de țesuturi ale pielii secționate cu microtomul cu congelare la temperatura de -80°C. Toate țesuturile au fost examinate la microscopul Leica DM 4000B, iar imaginile au fost preluate cu ajutorul camerei digitale Olympus DP71.

Compoziția chimică a pieilor de pește

S-au efectuat analize privind conținutul de grăsime [20, 21], azotul Kjeldahl total [22], substanța dermică [23], cenușa sulfatată totală [24] și distilarea azeotropă [25] ale pieilor de pește brute pentru caracterizarea chimică și determinarea conținutului de esteri metilici ai acizilor grași [26, 27] și a conținutului total de aminoacizi prin analiză instrumentală.

Pentru conținutul total de aminoacizi, s-au tratat 0,2 g mostre de piele de pește cu 5 ml HCI 6N și s-au menținut în condensator timp de 24 h. Proba s-a cântărit, obținând valori între 0,6 și 2 g, în funcție de conținutul de aminoacizi din probe, într-un balon cotat de 100 ml incluzând 5 ml norvalină standard. După filtrare s-a determinat conținutul de aminoacizi din pieile de pește prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC). În cadrul studiului, fiecare analiză s-a efectuat în triplicat, iar valorile medii sunt prezentate cu abateri standard.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Caracteristici histologice și histochimice

Imaginile epidermei (Figurile 1-4), dermei (Figurile 5-8) și hipodermei (Figurile 9-12) pieilor de pește *Katsuwonus pelamis* sunt redate mai jos.

Epiderma pielii tonului dungat este formată din 3 straturi, și anume: stratul exterior, stratul interior și stratul germinativ. Stratul exterior cuprinde mucoasa și 1-5 straturi de celule epiteliale stratificate scuamoase. Stratul interior cuprinde celule melanocite, claviforme, epiteliale cubice și secretoare de mucus. Stratul germinativ are, de asemenea, celule epiteliale cubice lungi, glande producătoare de mucus,

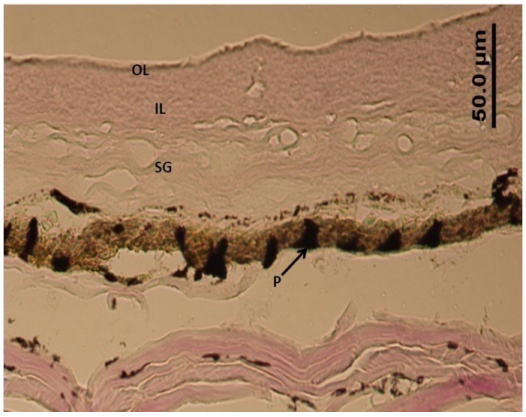

Figure 1. OL: Outer layer, IL: Inner layer, SG: Stratum germinativum, P: Pigment cells
Figura 1. OL: strat exterior, IL: strat interior, SG: stratul germinativ, P: celule pigmentare

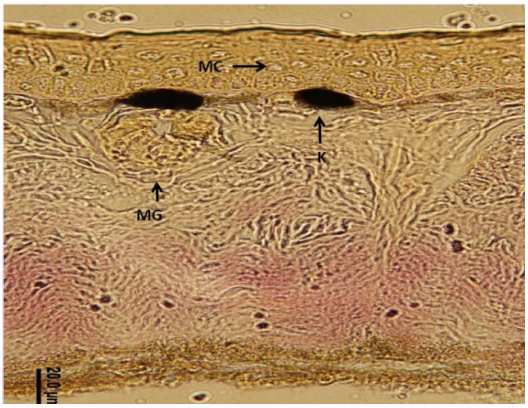

Figure 2. MG: Mucus glands, MC: Mucus cells, K: chromatophore
Figura 2. MG: glande producătoare de mucus, MC: celule secretoare de mucus, K: celule cromatofore

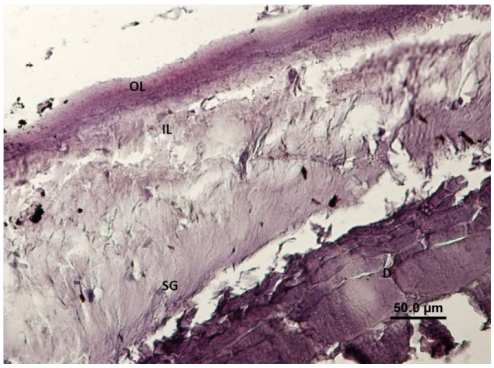

Figure 3. Van Gieson's stained tissue of SJT, Layers of epidermis, OL: Outer layer, IL: Inner layer, SG: Stratum germinativum, D: Dermis
Figura 3. Ţesut cu coloraţie Van Gieson, straturi de epidermă, OL: strat exterior, IL: strat interior, SG: stratul germinativ, D: Dermă

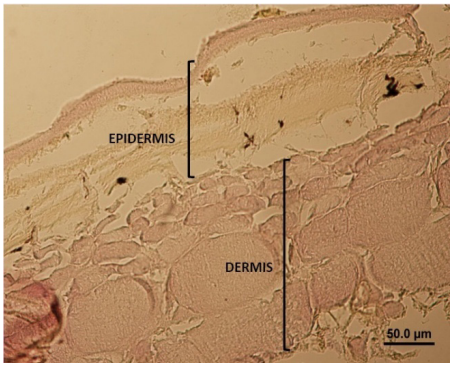

Figure 4. Hematoxylene-Eosin Stained SJT tissue, differences of epidermis and dermis
Figura 4. Ţesut cu coloraţie hematoxilină-eozină, diferenţe între epidermă şi dermă

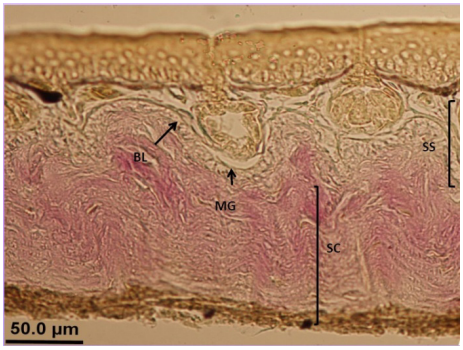

Figure 5. The layers of dermis, SS: Stratum spongiosum, SC: Stratum compactum, MG: MG: Mucus glands, BL: Basal layer
Figura 5. Straturile dermei, SS: stratul spongios, SC: stratul compact, MG: MG: glande producătoare de mucus, BL: strat de bază

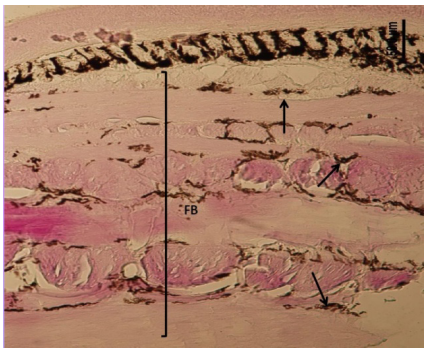

Figure 6. Chromatophore (arrow) cells unequally distributed inside the collagen fiber bundles
Figura 6. Celule cromatofore (săgeată) distribuite inegal în fasciculele de fibre de colagen

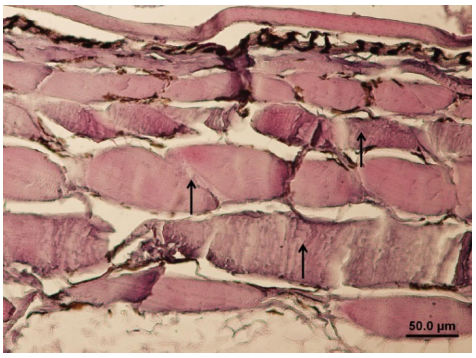

Figure 7. SC layer of dermis include high amounts of collagenous fibers or fiber bundles (arrow)
Figura 7. Stratul SC al dermei cuprinde cantităţi mari de fibre sau fascicule de fibre colagenice (săgeată)

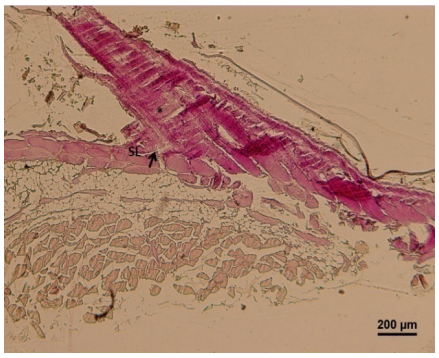

Figure 8. The root of scales (*) located on dermis layer, so that, this part of dermis called Stratum laxum
Figura 8. Rădăcina solzilor (*) localizaţi pe stratul dermic, aşadar această parte se numeşte strat lax

compactum. The *Stratum spongiosum*, *Stratum laxum* layers depend on what dermis outer layer includes like scales, nerves, melanocytes etc. But *Stratum compactum* layer includes high amount of collagen fiber bundles, capillary vessels etc. [28-30].

In the Figures 5-8, it can be clearly seen that the top layer of dermis (*Stratum spongiosum*) includes chromatophores and mucous glands while the bottom layer of the dermis (*Stratum compactum*) consists of collagen fibers.

The collagen fibers stained pink-red by Van Gieson's are located parallel and showed regular structure in contrast to other raw skins used in leather industry [31]. Besides, the collagen fibers are usually orientated like quartet fibers for all the body locations (dorsum, pelvic cavity, lateral line and near caudal) of the fish skins. The thickness of collagen fiber bundles are determined approximately 130 µm to 180 µm values. However, different thickness values are observed for the collagen bundles such as thicker *Stratum compactum* layer compared to *Stratum spongiosum*. The ratio of elastin fibers to collagen is found as 0.4232 µm.

Like other mammals, fish skin hypodermis has mostly fat cells and loose connective tissue between the fat cells [28-30]. Besides, fibers like elastin are determined between the muscle tissues as a result of this study (Figure 11). The location of adipose and striated muscle tissues are found under the dermis layer and different thickness values for adipose tissues are determined. Striated muscle tissues are placed

celule pigmentare şi limfocite [28-30]. Stratul de cheratină de la suprafață este format din celule moarte și, imediat după epiteliul stratificat scuamos, se regăsesc celulele epiteliale care formează epiderma pielii de pește (Figurile 1-4).

Derma pielii de pește are trei straturi, și anume stratul spongios, stratul lax și stratul compact. Stratul spongios și stratul lax depind de ceea ce cuprinde stratul exterior al dermei, și anume solzi, nervi, melanocite etc. Stratul compact include o cantitate mare de fascicule de fibre de colagen, vase capilare etc. [28-30].

În Figurile 5-8, se poate vedea clar că stratul superior al dermei (stratul spongios) include celule cromatofore și glande producătoare de mucus, în timp ce stratul inferior al dermei (stratul compact) este constituit din fibre de colagen.

Fibrele de colagen colorate roșu-roz în urma tehnicii Van Gieson sunt situate paralel și prezintă o structură regulată, spre deosebire de alte piei brute utilizate în industria de pielărie [31]. În plus, fibrele de colagen sunt de obicei dispuse câte patru în toate regiunile corpului (spate, cavitatea pelviană, linia laterală și în apropierea înotătoarei caudale) în cazul pieilor de pește. Valorile grosimii fasciculelor de fibre colagenice sunt determinate în intervalul de aproximativ 130-180 µm. Cu toate acestea, se observă diferite grosimi pentru fasciculele de colagen, de ex. stratul compact este mai gros comparativ cu stratul spongios. Raportul dintre fibrele de elastină şi cele de colagen este de 0,4232 µm.

Ca și la alte mamifere, hipoderma pielii de pește cuprinde în mare parte celule de grăsime și țesut conjunctiv lax între acestea [28-30]. În plus, studiul arată că între ţesuturile musculare se regăsesc fibre precum elastina (Figura 11). Ţesuturile adipoase și musculare striate se găsesc sub stratul dermei, observându-se grosimi

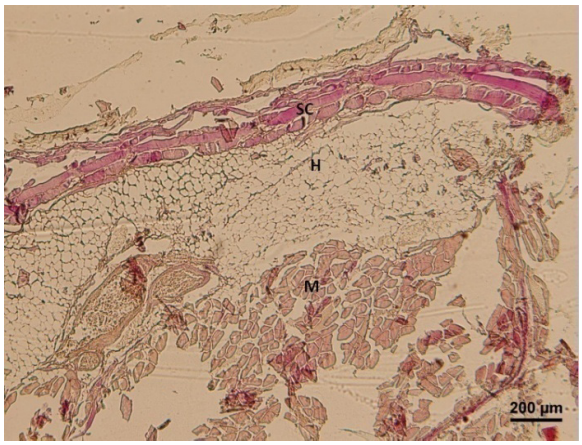

Figure 9. The hypodermis (H), lying between the stratum compactum (SC) and body musculature (M)
Figura 9. Hipoderma (H), ce se regăseşte între stratul compact (SC) şi musculatura corpului (M)

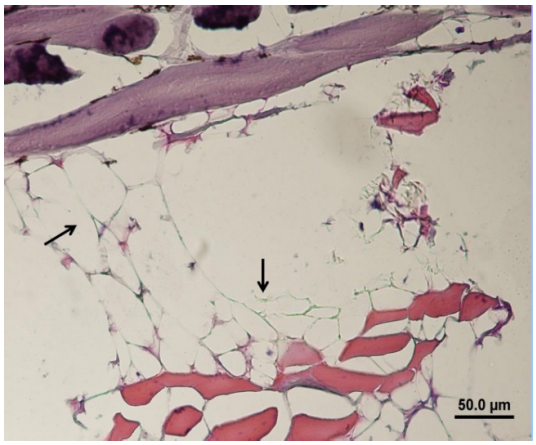

Figure 10. Hypodermis is recognizable by varying numbers of fat cells (arrow) interspersed with loose connective tissue
Figura 10. Hipoderma se poate recunoaşte cu ajutorul numărului variabil de celule de grăsime (săgeată) cu ţesut conjunctiv lax intercalat

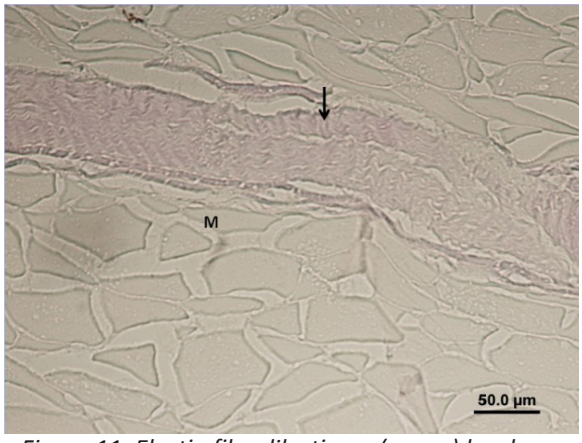

Figure 11. Elastin fiber like tissue (arrow) has been determined inside the muscle bundles
Figura 11. S-a observat ţesut asemănător fibrelor de elastină (săgeată) în fasciculele musculare

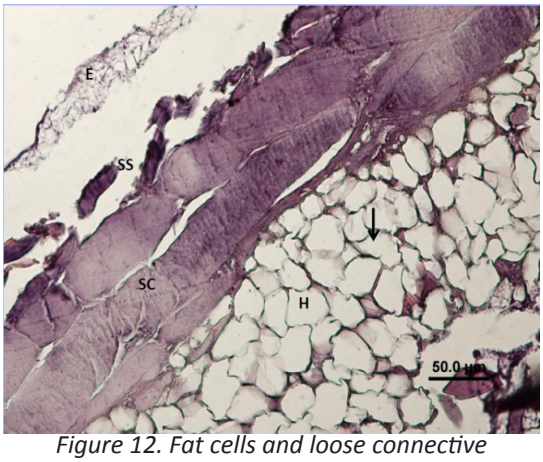

Figure 12. Fat cells and loose connective tissue of hypodermis
Figura 12. Celule de grăsime şi ţesut conjunctiv lax în hipodermă

vertical to collagen fibers and transversely to the fish length.

As a result of histological and histochemical studies, fish skins were found thin and tough, had less collagen content and their fibers were oriented in parallel but opposite to striated muscles differently from the other skins. In the light of these collected results, leather engineers will be able to design suitable process for the skins of sea animals.

Chemical Composition of Fish Skins

The chemical characterization results of raw Skipjack Tuna fish skin are presented in Table 1. The fat content and volatile matter of Skipjack Tuna were determined as 24.47±1.76%

diferite pentru țesuturile adipoase. Țesuturile musculare striate sunt situate vertical față de fibrele de colagen și transversal pe lungimea peștelui.

În urma studiilor histologice și histochimice, s-a constatat că pieile de pește sunt subțiri şi dure, au un conținut mai mic de colagen, iar fibrele sunt orientate paralel, dar opus mușchilor striați, spre deosebire de alte tipuri de piei. Pe baza acestor rezultate, inginerii pielari vor fi capabili să proiecteze un proces adecvat pentru prelucrarea pieilor de animale marine.

Compoziția chimică a pieilor de pește

Rezultatele caracterizării chimice a pielii de ton dungat sunt prezentate în Tabelul 1. În

and 37.33±4.01% respectively for this study. In the previously published studies, the fat content of Sturgeon, Carp and Conger fish skins were determined between 39.71%-44.07% [31, 32]. Besides, the fat content of Sturgeon raw skin was found as 35.45% that shows similar results with the studies indicated above [33]. In addition to these types of fish skins, the fat content of *Sardinella maderensis*, *Sardinella aurita* and *Cephalopholis taeniops* fish skins were reported as 26.0±0.6 (%), 24.0±0.8 (%) and 2.4±0.3 (%), respectively [34]. The fat and volatile matter contents of *Katsuwonus pelamis* (Skipjack Tuna) were found 18.3±0.11 and 56.5±0.09 (%) by Shyni *et al*. [35] respectively. In addition, the fat content of Skipjack Tuna (18.3±0.11%), Dog Shark (0.16±0.02%) and Rohu (2.93±0.05%) fish skins was compared and the highest fat content was determined from Skipjack Tuna fish skin due to its subcutaneous fat that could be attributed to the different lipid storage organs like liver for shark and skin and viscera for tuna. Lastly, the authors indicated that the fat and moisture content was in reverse order for these three different kinds of fish skins [35]. The fat and volatile matter results of the study are compatible with the other findings mentioned above and the differences were attributed to the different types as well as the different fish skins.

The total sulphated ash content of Skipjack Tuna fish skin was determined as 1.23±0.0002 (%) and this result was found higher than the Red tilapia (0.51%), Walking catfish (0.52%) and Striped catfish (0.46%) [36] and lower than the Skipjack Tuna (4.39%) [35].

The fatty acid methyl esters (FAME) and amino acid composition of *Katsuwonus pelamis* are presented in Table 2 and 3. The polyunsaturated fatty acid (PUFA) ratio in raw fat was determined as 43.06%. The arachidonic and oleic acid had the highest proportions in the fatty acid composition of *Katsuwonus pelamis* fish skin (Table 2).

The fatty acid composition of 5 different fish skins showed that arachidonic, oleic, eiocosadienoic and behenic acid has the highest proportion in the composition of *Katsuwonus pelamis* fish skin although eiocosadienoic acid could not be detected in the fatty acid composition of the other fish skins (Table 2). Arachidonic and behenic acid have the highest

acest studiu s-a determinat conținutul de grăsime și de materii volatile al pielii de ton dungat, obținându-se valorile 24,47±1,76%, respectiv 37,33±4,01%. În studiile publicate anterior, conținutul de grăsime al pieilor de sturion, crap și țipar de mare a fost determinat între 39,71% şi 44,07% [31, 32]. În plus, conținutul de grăsime al pielii brute de sturion a fost determinat la 35,45%, similar rezultatelor studiilor indicate mai sus [33]. Pe lângă aceste tipuri de piei de pește, conținutul de grăsime al pieilor de *Sardinella maderensis*, *Sardinella aurita* şi *Cephalopholis taeniops* a fost determinat la 26,0±0,6 (%) 24,0±0,8 (%), respectiv 2,4±0,3 (%) [34]. Conținutul de grăsime și de materii volatile al pieilor de *Katsuwonus pelamis* (ton dungat) au fost determinate la 18,3±0,11, respectiv 56,5±0,09 (%) de Shyni și colab. [35]. În plus, s-a comparat conținutul de grăsime al pieilor de ton dungat (18,3±0,11%), câine de mare (0,16±0,02%) și crap indian (2,93±0,05%) şi cel mai mare conţinut de grăsime a fost găsit la pielea de ton dungat datorită grăsimii subcutanate ce poate fi atribuită diferitelor organe de stocare a lipidelor cum ar fi ficatul la rechini și pielea și viscerele la ton. În cele din urmă, autorii au indicat ordinea inversă a conținutului de grăsime și de umiditate la aceste trei tipuri diferite de piei de pește [35]. Valorile grăsimii și ale materiilor volatile obținute în acest studiu sunt compatibile cu celelalte constatări menționate mai sus, iar diferențele au fost atribuite diferitelor tipuri, precum și diferitelor piei de pește.

Conținutul total de cenușă sulfatată al pielii de ton dungat s-a determinat la 1,23±0,0002 (%), iar această valoare a fost mai mare decât cea obținută pentru tilapia roșu (0,51%), somn migrator (0,52%) și somn striat (0,46%) [36] și mai mică decât cea pentru tonul dungat (4,39%) [35].

Esterii metilici ai acizilor grași (FAME) și compoziția de aminoacizi ale *Katsuwonus pelamis* sunt prezentate în Tabelele 2 și 3. Raportul acizilor grași polinesaturați (PUFA) în grăsimea brută a fost determinat la 43,06%. Acidul arahidonic și cel oleic au avut cele mai mari procente din compoziția în acizi grași a pielii de *Katsuwonus pelamis* (Tabelul 2).

Compoziția de acizi grași din cinci piei diferite de pește a arătat că cea mai mare proporție a acizilor arahidonic, oleic, eiocosenoic și behenic se regăsește în compoziția pielii de *Katsuwonus pelamis*, deși acidul eiocosenoic nu a putut fi detectat în compoziția acizilor grași

Table 1: Chemical characteristics of Katsuwonus pelamis fish skin
Tabelul 1: Caracteristicile chimice ale pielii de peşte Katsuwonus pelamis

Analysis *Analiză*	Results (%) *Rezultate (%)*
Fat Content *Conţinut grăsime*	24.47±1.76
Kjeldahl Nitrogen *Azot Kjeldahl*	10.20±0.28
Hide Substance *Substanţă dermică*	57.32±1.55
Volatile matter *Materie volatilă*	37.33±4.01
Total sulphated ash *Cenuşă sulfatată totală*	1.23±0.0002

Table 2: Fatty acid composition of Katsuwonus pelamis fish skin in comparison to other fish skins
Tabelul 2: Compoziţia de acizi graşi ai pielii de peşte Katsuwonus pelamis comparativ cu alte piei de peşte

Fatty acid *Acid gras*		*Katsuwonus pelamis* FAME (%)	*Rastrelliger kanagurta* [37]	*S. maderensis* [34]	*S. aurita* [34]	*Cephalopholis taeniops* [34]
Myristic acid *Acid miristic*	C14:0	0.05	2.58	8.1	7.8	5.0
Palmitic acid *Acid palmitic*	C16:0	2.20	9.42	0.5	20.5	28.4
Palmitoleic acid *Acid palmitoleic*	C16:1	0.05	0.26	-	-	-
Linolenic acid *Acid linolenic*	C18:2n6t	4.80	13.71	1.2	0.7	0.8
Alpha-Linolenic acid(ALA) *Acid alfa-linolenic*	C18:3n3	0.6	1.74	0.3	0.3	0.3
Oleic acid *Acid oleic*	C18:1n9c	18.90	4.32	8.2	15.5	12.5
Eiocosadienoic acid *Acid eicosenoic*	C20:3n6	14.95	-	-	-	-
Arachidonic acid *Acid arahidonic*	C20:4n6	23.31	2.42	1.0	ND	ND
Behenic acid *Acid behenic*	C22:0	14.80	-	2.3	2.5	0.3
Unidentified *Acid neidentificat*		21.34	-	1.7	3.2	2.5

amount compared to other fish skins while comparable result is found for the oleic acid in the composition of *Sardinella aurita* fish skin [34, 37]. This different lipid and fatty acid composition of fish skins could be related to season and the effects of storage and processing [34].

The highest content of glycine in amino acid composition of Skipjack tuna fish skin is followed by lysine, glutamate and alanine amino acids, respectively (Table 3). The hydroxyproline content was found 2.56 g/100g in contrast to Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fish skin (11.27 g/100g) [38].

The difference in the amino acid composition of *Katsuwonus pelamis* and *Ctenopharyngodon idella* fish skins is attributed to the different skin characteristics of the fish skins. The glycine (19.60 g/100g) and alanine

din celelalte piei de pește (Tabelul 2). Acidul arahidonic și cel behenic au cea mai mare cantitate în comparație cu alte piei de pește, în timp ce pentru acidul oleic se constată un rezultat comparabil în compoziția pielii de *Sardinella aurita* [34, 37]. Această compoziție diferită de lipide și acizi grași din pieile de pește ar putea fi legată de sezon și influențată de modul de depozitare și de prelucrare [34].

Cel mai mare conținut de glicină în compoziția de aminoacizi a pielii de ton dungat este urmat de lizină, glutamat, respectiv alanină (Tabelul 3). Conținutul de hidroxiprolină a fost de 2,56 g/100 g, spre deosebire de pielea de cosaș (*Ctenopharyngodon idella*) (11,27 g/100 g) [38].

Diferența de compoziție de aminoacizi dintre pielea de *Katsuwonus pelamis* și cea de *Ctenopharyngodon idella* este atribuită

Table 3: Amino acid composition of Katsuwonus pelamis fish skin compared to Ctenopharyngodon idella fish skin

Tabelul 3: Compoziţia de aminoacizi a pielii de Katsuwonus pelamis comparativ cu pielea de Ctenopharyngodon idella

Amino acid type *Aminoacid*	*Katsuwonus pelamis* (g/100g)	*Ctenopharyngodon idella* (g/100g) [38]
Cystine *Cistină*	0.11	-
Aspartate *Aspartat*	5.13	4.84
Glutamate *Glutamat*	8.17	9.11
Asparagine *Asparagină*	-	-
Serine *Serină*	2.65	2.79
Glutamine *Glutamină*	-	-
Histidine *Histidină*	-	0.45
Glycine *Glicină*	7.26	19.60
Threonine *Treonină*	-	2.29
Arginine *Arginină*	4.16	6.95
Alanine *Alanină*	6.79	8.25
Tyrosine *Tirozină*	1.45	0.42
Valine *Valină*	2.82	1.84

Methionine *Metionină*	2.31	1.51
Norvaline (ISTD) *Norvalină*	0.03	-
Tryptophan *Triptofan*	1.72	-
Phenylalanine *Fenilalanină*	3.94	1.96
Isoleucine *Izoleucină*	1.02	1.16
Leucine *Leucină*	1.40	2.07
Lysine *Lizină*	8.13	3.20
Hydroxyproline *Hidroxiprolină*	2.56	11.27
Sarcosine *Sarcozină*	0.46	-
Proline *Prolină*	3.35	8.20

(8.25 g/100g) amino acid amounts are found higher than the Skipjack Tuna fish skin while the lysine amount is lower. Only the glutamate amino acid amount is found comparable for these two kinds of fish skin when the highest four amino acid ratio of the Skipjack Tuna fish skin is considered [38].

CONCLUSION

The histological, histochemical and chemical characterization of Katsuwonus pelamis (Skipjack Tuna) fish skin was investigated in the study and following conclusions have been drawn:

a. *Katsuwonus pelamis* skins are thin and tough due to their special surface characteristics.

b. It contains less collagen content in comparison to hides and skins mostly used in leather industry.

c. The collagen fibers are orientated in parallel but opposite to striated muscles different than the other hides and skins.

d. The fat and volatile matter contents of *Katsuwonus pelamis* skins were found compatible with the other studies, however variable ash content results were found from the different types of fish skin.

e. The different amino acid and fatty acid composition could be mostly related to the fish skin types.

Fish skins, known as an economic and valuable by-product of fish industry, could be an

diferitelor caracteristici ale pieilor de pește. Cantitățile de glicină (19,60 g/100 g) și alanină (8,25 g/100 g) sunt mai mari decât la pielea de ton dungat, în timp ce cantitatea de lizină este mai mică. Numai cantitatea de glutamat este comparabilă pentru aceste două tipuri de piele de pește, atunci când se iau în considerare primii patru aminoacizi cu cele mai mari cantități din pielea de ton dungat [38].

CONCLUZII

În acest studiu s-a efectuat caracterizarea histologică, histochimică și chimică a pielii de *Katsuwonus pelamis* (ton dungat), cu următoarele concluzii:

A. Pieile de *Katsuwonus pelamis* sunt subţiri şi dure datorită caracteristicilor specifice de suprafață.

b. Acestea conțin mai puțin colagen, în comparație cu pieile utilizate frecvent în industria de pielărie.

c. Fibrele de colagen sunt orientate paralel, dar opus mușchilor striați, spre deosebire de alte tipuri de piei.

d. Conținutul de grăsime și de materii volatile ale pieilor de *Katsuwonus pelamis* a fost compatibil cu celelalte studii, însă conținutul de cenușă a fost variabil, comparativ cu alte tipuri de piele de pește.

e. Compoziția diferită de aminoacizi și acizi grași se datorează în mare parte tipurilor diferite de piele de pește.

important and new source of raw materials for the leather industry. Fish industry may provide a huge capacity for the production of alternative leather products, considering the difficulty of leather industry in finding raw material due to scarcity of sources. Besides, converting an organic waste to a high added value product has a great importance from the economical point of view.

The information on histological, histochemical and chemical structure of fish skins provided by this study is essential to design special production recipes for utilization of this special by-product in different industrial areas like leather manufacturing. Thus, manufacturing of luxury products from different kinds of fish skins and increasing the market share of fish leathers in exotic leathers section will be possible.

Acknowledgement

The authors would like to thank Ege University Research Project Department Directorate for financial support (Project Number: 2013MUH010) and the State Planning Organization (DPT) for the instrumental support (Project number 2007-DPT- 001).

Pieile de pește, cunoscute ca produs secundar economic și valoros al industriei piscicole, pot reprezenta o nouă şi importantă sursă de materii prime pentru industria de pielărie. Industria piscicolă poate oferi o mare capacitate pentru producția unor produse alternative din piele, având în vedere dificultatea industriei de pielărie de a găsi materii prime din cauza surselor insuficiente. În plus, transformarea unor deșeuri organice în produse cu mare valoare adăugată are o mare importanță din punct de vedere economic.

Informațiile cu privire la structura histologică, histochimică și chimică a pieilor de pește oferite în acest studiu sunt esențiale pentru conceperea unor rețete speciale de producție pentru utilizarea acestui produs secundar în diferite domenii industriale, cum ar fi fabricarea pielii. Astfel, vor fi posibile fabricarea unor produse de lux din diferite tipuri de piei de pește și creșterea cotei de piață a pieilor de pește în sectorul de piei exotice.

Mulțumiri

Autorii doresc să mulțumească Direcției Departamentului de Proiecte de Cercetare din cadrul Universității Ege pentru sprijin financiar (Nr. proiect: 2013MUH010) și Organizației de Planificare de Stat (DPT) pentru sprijinul considerabil (Nr. proiect: 2007-DPT- 001).

REFERENCES

1. FAO, Fishery Statistics. Food and Agriculture Organization, **1999**, http://apps.fao.org/fishery/fprod1-e.htm.

2. Paquotte, P., Tuna in the International Market for Seafood, First International Symposium Domectication of The Bluefin Tuna, 3-8 February, **2002**, Cartagena - Spain.

3. Basaran, F., Ozden, O., Mavi Yüzgeçli Orkinos (Thunnus thynnus L., 1758) Balığı Yetiştiriciliğinin Kültür Koşullarında İncelenmesi, *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **2004**, 21 (3:4), 343–348.

4. Gaidau, C., Maereanu, M., Foiasi, T., Adiguzel Zengin, C., Karavana, H.A., Mutlu, M.M., Bitlisli, B.O., Basaran, B., Sturgeon Skins – A Valuable Resource for Luxury Leather Industry, *Revista de Pielărie Încălţăminte* (*Leather and Footwear Journal*), **2013**, 13, 4, 311-320.

5. Choi, S., Regenstein, J.M., Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin, *J Food Sci*, **2000**, 65, 2, 194-199.

6. Gómez-Guillén, M.C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A., Montero, P., Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study, *Food Hydrocoll*, **2002**, 16, 1, 25-34.

7. Zaccone, G., Histochemical studies of acid proteoglycans and glycoproteins and activities of hydrolytic and oxidoreductive enzymes in the skin epidermis of the fish Blennius sanguinolentus pallas, *Histochem Cell Bio*, **1983**, 78, 2, 163-175p.

8. Whitear, M., The skin of fishes including cyclostomes In: Bereiter-Hahn J,Matoltsy AG, Richards KS (Editors), Biology of the Integument, 2, Vertebrates, **1986**, 8-64, Berlin: Springer-Verlag.

9. Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A., Atlas of fish histology, **2009**, New Hampshire, USA: Enfield, 75.

10. Demir, N., *İhtiyoloji*, **2009**, 4, 424, Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.

11. Zaccone, G., Kapoor, B.G., Fasulo, S., Ainis, L., Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes, *Adv Mar Biol*, **2001**, 40, 253-348.

12. Allen, A., Structure and function of gastrointestinal mucus, in: Johnson LR (Editor), Physiology of the gastrointestinal tract, **1981**, New York: Raven Press, 617-639.

13. Shephard, K.L., Functions for fish mucus, *Rev Fish Biol Fish*, **1994**, 4, 401-429.

14. Kelek, S., Çimenoğlu, N., Çınar, K., Kadife Balığı (Tinca Tinca L. 1758) Derisinde Mukus Hücrelerin Histokimyasal Yapısı, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, **2011**, 25, 3, 129-132.

15. Collette, B.B., Nauen, C.E., FAO species catalogue, Scombrids of the world, An annotated and illustrated catalogue of Tunas, Mackerels, Bonitos and other related species known to date, FAO Fisheries Synopsis, **1983**, 2, 41-137, Rome.

16. http://www.iucnredlist.org/details/170310/0; 25.05.2013.

17. Bayliff, W.H., Growth of skipjack Katsuwonus pelamis and yellowfin Thunnusal bacares tunas in the eastern Pacific Ocean as estimated from tagging data, *Inter-American Tropical Tuna Commission Bulletin*, **1988**, 19, 4, 307-385.

18. Küçükakin, E., Bitlisli, B.O., Deveci, R., Adıgüzel Zengin, A.C., Histological and Histochemical Study of a Fish Skin: Katsuwonus Pelamis, XXXII. Congress of IULTCS, **2013**, Istanbul - Turkey.

19. Drury, R.A.B., Wallington, E.A., Cameron, S.R., Carleton's Histological Technique, 4th Edition, Oxford University Press, Ely House, **1967**, London.

20. Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, Gh., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J Biol Chem*, **1957**, 226, 1, 497-509.

21. Bligh, E.G., Dyer, W.J., A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, *Can J Biochem Phys*, **1959**, 37, 8, 911-917.

22. Bradstreet, R.B., Kjeldahl Method for Organic Nitrogen, *Anal Chem*, **1954**, 26, 1, 185–187.

23. TS 4134, Leather-Determination of Nitrogen Content and "Hide Substance" - Titrimetric Method, **1985**, Ankara, Turkey.

24. TS 4125 EN ISO 4047, Leather - Determination of sulphated total ash and sulphated water-Insoluble ash, **2000**, Ankara- Turkey.

25. TS 1129 ISO 1026, Fruit and vegetable products - Determination of dry matter content by drying under reduced pressure and water content by Azeotropic distillation, **1998**, Ankara, Turkey.

26. TS 4504 EN ISO 5509, Animal and vegetable fats and oils- Preparation of methyl esters of fatty acids, **2002**, Ankara- Turkey.

27. TS 4664 EN ISO 5508, Animal and Vegetable Fats and Oils-Analysis by Gas Chromatography of Methyl Esters of Fatty Acids, **1996**, Ankara- Turkey.

28. Arellano, J.M., Storch, V., Sarasquete, C., Ultrastructural and histochemical study on gills and skin of the Senegal sole, Solea senegalensis, *J Appl Ichthyol*, **2004**, 20, 452–460.

29. Park, J.Y., Structure of the skin of an air-breathing mudskipper, Periophthalmus magnuspinnatus, *J Fish Biol*, **2002**, 60, 1543–1550.

30. Guerra, R.R., Santos, N.P., Cecarelli, P., Mangetti, A.J., Silvaand, J.R.M.C., Hernandez-Blazquez, F.J., Stratum adiposum, a special structure of the African Catfish skin (Clarias gariepinus, Burchell 1822), *Anat Histol Embryol*, **2006**, 35, 144–146.

31. Başaran, B., Bitlisli, B.O., Mutlu, M.M., Karavana, H.A., Adıgüzel Zengin, A.C., Karadeniz Kıyılarında Çevre Koruması için Balık Derilerinden Katma Değeri Yüksek Ürünler Eldesi, 112M393 TUBITAK project, **2015**.

32. Adıgüzel Zengin, A.C., Başaran, B., Karavana, H.A., Mutlu, M.M., Bitlisli, B., Gaidau, C., Niculescu, M., Maereanu, M., Fish Skins: Valuable Resources for Leather Industry, XXXIII IULTCS Congress, 24–27 November **2015**, Novo Hamburgo, Brazil, 116.

33. Qiang, T., Bu, Q., Ren, L., Tanning Technique of Sturgeon Skin, *J Soc Leath Tech Ch*, **2014**, 98, 5, 229-235.

34. Njinkoué, J., Barnathan, G., Miralles, J., Gaydou, E., Samb, A., Lipids and fatty acids in muscle, liver and skin of three edible fish from the Senegalese coast: Sardinella maderensis, Sardinella aurita and Cephalopholis taeniops, *Comp Biochem Physiol*, Part B, **2002**, 131, 395–402.

35. Shyni, K., Hema, G.S., Ninan, G., Mathew, S., Joshy, C.G., Lakshmanan, P.T., Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (Katsuwonus pelamis), dog shark (Scoliodon sorrakowah), and rohu (Labeo rohita), *Food Hydrocoll*, **2014**, 39, 68-76.

36. Jamilah, B., Tan, K.W., Umi Hartina, M.R., Azizah, A., Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process, *Food Hydrocoll*, **2011**, 25, 1256-1260.

37. Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Yazid, A.M., Khatib, A., Norulaini, N.A.N., Fatty acid compositions of fish oil extracted from different parts of Indian mackerel (Rastrelliger kanagurta) using various techniques of supercritical CO_2 extraction, *Food Chem*, **2010**, 120, 879–885.

38. Kasankala, L.M., Xue, Y., Weilong, Y., Hong, S.D., He, Q., Optimization of gelatine extraction from grass carp (Catenopharyngodon idella) fish skin by response surface methodology, *Bioresource Technol*, **2007**, 98, 3338–3343.

Article received/Data primirii articolului: 05.12.2016
Accepted/Acceptat la data: 20.12.2016

EVENIMENTE INTERNE ȘI INTERNAȚIONALE

FOLLOW-UP OF THE 6TH EDITION OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCED MATERIALS AND SYSTEMS (ICAMS 2016) 20-22 OCTOBER 2016, BUCHAREST

PREZENTAREA CELEI DE-A ȘASEA EDIŢII A CONFERINŢEI INTERNAŢIONALE A MATERIALELOR ŞI SISTEMELOR AVANSATE (ICAMS 2016) 20-22 OCTOMBRIE 2016, BUCUREȘTI

The International Conference on Advanced Materials and Systems has become a traditional multi- and inter-disciplinary event that facilitates the exchange of knowledge in the area of advanced experimental or computational environmental technologies to structurally characterize materials and technological systems.

The sixth edition of ICAMS Conference was held on October 20th-22nd, 2016, at Capital Plaza Hotel, Bucharest, featuring in total 98 scientific papers from 240 authors and co-authors from 12 countries (Austria, Bangladesh, Bulgaria, China, Greece, India, Italy, Lithuania, Portugal, Turkey, Ukraine and Romania).

Conferința Internațională a Materialelor și Sistemelor Avansate a devenit un eveniment multi- și inter-disciplinar tradițional care facilitează schimbul de cunoștințe în domeniul tehnologiilor ecologice avansate experimentale sau computaționale pentru caracterizarea materialelor și sistemelor tehnologice la nivel structural.

A șasea ediție a Conferinței ICAMS a avut loc în perioada 20-22 octombrie 2016 la Hotelul Capital Plaza, București, unde s-au prezentat în total 98 de lucrări științifice de la 240 de autori și co-autori din 12 țări (Austria, Bangladesh, Bulgaria, China, Grecia, India, Italia, Lituania, Portugalia, Turcia, Ucraina și România).

The two plenary presentations raised the interest of the participants through their importance and high degree of innovation. Thus, the presentation of Prof. Dr. Sandra Carvalho, from the University of Minho, Portugal, entitled "Thin Films as Electrodes for Biosensors" addressed the development of multifunctional antibacterial coatings applied onto polymeric substrates to make biosensors with medical applications, fits in the topical thematic of smart materials. Mrs. Petya Gancheva, Expert in International Programs and Projects at the Ruse Chamber of Commerce and Industry of Bulgaria, illustrated, in her presentation entitled "Responsible Research and Innovation - A Concept Shaping the New Understanding of Science and Technology Development", the need to involve society in the decision-making process regarding research and innovation directions for its sustainable and inclusive development. The presentation is based on the European project Responsible Research and Innovation Tools (RRI Tools), whose objective is to develop training and dissemination tools regarding responsible research and innovation that contribute to aligning research results with the needs of society, also an issue of interest in the European Horizon 2020 program.

Cele două prezentări în plen au suscitat interesul participanților prin importanța lor și gradul ridicat de inovare. Astfel, prezentarea Prof. Dr. Sandra Carvalho, de la Universitatea Minho din Portugalia, intitulată "Thin Films as Electrodes for Biosensors" a abordat dezvoltarea unor pelicule multifuncționale antibacteriene aplicate pe substrat polimeric pentru realizarea biosenzorilor utilizați în domeniul medical, înscriindu-se în tematica de actualitate a materialelor inteligente. De asemenea, doamna Petya Gancheva, expert în programe și proiecte internaționale în cadrul Camerei de Comerț și Industrie din Ruse, Bulgaria, a ilustrat, în prezentarea intitulată "Responsible Research and Innovation - A Concept Shaping the New Understanding of Science and Technology Development", nevoia de a implica societatea în deciziile privind direcțiile de cercetare și inovare în vederea dezvoltării sustenabile și incluzive a acesteia. Prezentarea are la bază proiectul european Responsible Research and Innovation Tools (RRI Tools), care are ca obiectiv dezvoltarea unor instrumente de formare și diseminare privind cercetarea și inovarea responsabile care să contribuie la alinierea rezultatelor cercetării cu valorile și nevoile societății, numărându-se, de asemenea printre problemele de interes în programul european Horizon 2020.

Participants also had the opportunity of assisting to presentations of two of the most prestigious events in the leather and footwear field, namely a follow-up of the 2016 edition of Simac Tanning Tech fair for state-of-the-art leather and footwear manufacturing systems and technologies, held by Dr. Maria Furfaro from ASSOMAC, Italy, and an invitation to the XXXIV IULTCS Congress to be held in 2017 in India, from Dr. Sengoda Gounder Rajamani, Chair of the

Tot în plen, participanții au avut ocazia de a asista la prezentarea unora dintre cele mai prestigioase evenimente din domeniul pielăriei și încălțămintei, și anume prezentarea doamnei Dr. Maria Furfaro de la ASSOMAC, Italia, referitoare la ediția din 2016 a târgului de sisteme și tehnologii de ultimă oră pentru prelucrarea pielii și fabricarea încălțămintei, Simac Tanning Tech, precum și invitația lansată de Dr. Sengoda Gounder Rajamani, Președintele comisiei Asian International Union of Environment (AIUE) din

Asian International Union of Environment (AIUE) Commission.

The program of this year's edition included six thematic sessions of oral presentations, each section being chaired by one national and one international expert in the respective areas, and six poster sessions (Advanced Materials, Innovative Technologies, Cultural Heritage, Industrial Ecology & Circular Economy, Economics, Management & Marketing, Biomaterials).

Participants in the International Conference ICAMS had the opportunity to attend three workshops held on the second day of the conference. The workshop dedicated to ERASMUS+ projects presented the aim, objectives and results of Knowledge4Foot and Fit to Comfort projects focusing on transferring research and innovation to footwear manufacturing and introduced a new project, "Manager in an Efficient and Innovative Leather Company - LEAMAN". The second workshop focused on results obtained in the ongoing NANO_SAFE_LEATHER project, whose aim is to study the effect of applying materials with advanced functions for leather surface finishing on human health and the environment.

India la cel de-al XXXIV-lea Congres IULTCS care va fi organizat în India în 2017.

Programul ediției din acest an a cuprins șase sesiuni tematice de prezentări orale, fiecare secțiune fiind prezidată de câte un specialist național și unul internațional în domeniile respective, și șase sesiuni de postere (Materiale avansate, Tehnologii inovatoare, Patrimoniu cultural, Ecologie industrială și economie circulară, Economie, Management și Marketing, Biomateriale).

Participanții la Conferința Internațională ICAMS au avut oportunitatea de a asista la trei workshopuri organizate în cea de a doua zi a conferinței. În cadrul workshopului dedicat proiectelor ERASMUS+ s-au prezentat scopul, obiectivele și rezultatele proiectelor Knowledge4Foot și Fit to Comfort, cu accentul pe transferul cercetării și inovării în procesul de fabricare a încălțămintei și s-a prezentat un nou proiect, "Manager in an Efficient and Innovative Leather Company - LEAMAN". Al doilea workshop s-a concentrat pe rezultatele obținute până în prezent în proiectul NANO_SAFE_LEATHER, al cărui scop este studierea impactului aplicării materialelor cu funcții avansate la finisarea suprafeței pieii asupra sănătății umane și mediului.

This year's Conference also served as an excellent setting for celebrating *"65 years of scientific research on textiles and leather"*, an anniversary workshop presenting the main achievements in the textile and leather processing field that ended with a small ceremony of awarding plaques to former and current directors and notable employees of INCDTP-ICPI, as well as to partners and collaborators.

Recognition and celebrations continued with awards for the best oral and poster presentations by young scientists (aged under 35), selected by a special committee and sponsored by CHEMSPEED.

The sixth edition of ICAMS was one of the most important biennial meetings dedicated to research, development and innovation and has constantly offered the latest advances to the 157 top delegates and specialists, as well as associated events, such as: networking events, visits to laboratories and research departments, technical-scientific exhibition.

The Proceedings of the current edition (ICAMS 2016) is published by CERTEX under ISSN 2068-0783; the volume contains 95 full papers in English, 600 pages, and was submitted for indexing in databases such as SCOPUS, Chemical Abstracts Service, Web of Science and other international databases.

Ediția din acest an a Conferinței a reprezentat o ocazie excelentă de a sărbători *„65 de ani de cercetare științifică în domeniul textile-pielărie"* în cadrul unui workshop aniversar în care s-au prezentat principalele realizări în domeniul prelucrării textilelor și pielii și la finalul căruia a avut loc o ceremonie de acordare a unor plachete foștilor și actualilor directori ai Sucursalei ICPI, precum și celor mai importanți parteneri și colaboratori.

Conferința a continuat cu premii acordate pentru cea mai bună prezentare orală și cea mai bună prezentare poster ale tinerilor cercetători (sub 35 de ani), aleși de către o comisie specială, sub sponsorizarea oferită de CHEMSPEED.

Ediția a șasea a conferinței ICAMS a constituit una dintre cele mai importante reuniuni bienale dedicată cercetării, dezvoltării și inovării și a oferit în mod constant o agendă de ultimă oră celor 157 de delegați și specialiști de înalt nivel, precum și evenimente asociate ca: evenimente de căutare de parteneri, vizite în laboratoare și departamente de cercetare, expoziție tehnico-științifică.

Volumul ediției prezente (ICAMS 2016) este publicat de editura CERTEX, sub ISSN 2068-0783, conține 95 lucrări *in extenso* în limba engleză, are 600 de pagini și a fost transmis spre indexare în baze de date precum SCOPUS, Chemical Abstracts Service, Web of Science și alte baze de date internaționale.

THE 4TH INTERNATIONAL LEATHER ENGINEERING CONGRESS - IAFLI 2017
OCTOBER 19-20, 2017, IZMIR, TURKEY

AL 4-LEA CONGRES INTERNAȚIONAL AL INGINERIEI PIEII - IAFLI 2017
19-20 OCTOMBRIE 2017, IZMIR, TURCIA

IAFLI 2017
The 4th International
Leather Engineering Congress

The 4th Leather Engineering Congress (IAFLI 2017) will be held on 19-20 October 2017 in İzmir, a perfect platform to discuss the "Innovative Aspects for Leather Industry".

While the recent advances in product development and technology has changed our lives, the leather as the oldest dress of mankind has also been changed into an article designed by fashion and high technology. The aspects of current perspective push us to create advanced and functional leather materials with the collective work of different branches of science and industry. Remarkable developments on tanning-processing technology, machinery, chemicals, environmental management of the waste and wastewaters, leather design and fashion have been achieved so far. However, we all know that there is still a long way ahead to go through many challenges related with the technology, environment and competition with other sectors. To achieve this, the exchange of new ideas and to increase the awareness and knowledge on recent developments both in theoretical and practical points of leather making are crucial.

Submission of Abstracts & Pre-registration Form is open until May 12th, 2017.

More information: http://www.iafli.ege.edu.tr

Cel de-al 4-lea Congres Internațional al Ingineriei Pielii (IAFLI 2017) va avea loc în perioada 19-20 octombrie 2017 în Izmir, fiind un cadru excelent pentru a discuta „Aspecte inovatoare pentru industria de pielărie".

Progresele recente în dezvoltarea de produse și tehnologii ne-au schimbat viața, iar pielea, cel mai vechi material pentru îmbrăcăminte, s-a transformat, de asemenea, într-un articol influențat de modă și de tehnologia de vârf. Aspectele legate de perspectiva actuală ne motivează să creăm piei cu proprietăți avansate și funcționale, combinând diferitele ramuri ale științei și industriei. Până în prezent s-au realizat progrese remarcabile privind tehnologia de tăbăcire, utilajele, produsele chimice, gestionarea deșeurilor și a apelor uzate, designul și moda articolelor din piele. Cu toate acestea, știm cu toții că mai există multe provocări legate de tehnologie, mediu și concurența cu alte sectoare. Pentru a le depăși, sunt importante schimbul de idei noi, creșterea gradului de conștientizare și dobândirea cunoștințelor cu privire la evoluțiile recente, din perspectivă teoretică și practică, în domeniul fabricării pielii.

Termenul limită pentru trimiterea rezumatelor și a formularelor de pre-înregistrare este 12 mai 2017.

Mai multe informaţii: http://www.iafli.ege.edu.tr

"INNOVATIVE SOLUTIONS FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT OF TEXTILES AND LEATHER INDUSTRY" INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE MAY 26-27, 2017, ORADEA, ROMANIA

CONFERINȚA ȘTIINȚIFICĂ INTERNAȚIONALĂ „SOLUȚII INOVATOARE PENTRU DEZVOLTAREA SUSTENABILĂ A INDUSTRIEI DE TEXTILE ȘI PIELĂRIE" 26-27 MAI 2017, ORADEA, ROMÂNIA

The Department of Engineering and Industrial Management in Textiles and Leatherwork from University of Oradea, Romania organizes the International Conference "Innovative solutions for sustainable development of textiles and leather industry" on May 26th and 27th, 2017, in Oradea, Romania.

The deadline for submission of the abstracts and full papers: 7.04.2017.

More information: http://textile.webhost.uoradea.ro/Conferinta/2017/index.html

Departamentul de Textile-Pielărie și Management Industrial al Universității din Oradea, România organizează Conferința Internațională „Soluții inovatoare pentru dezvoltarea sustenabilă a industriei de textile și pielărie" în perioada 26-27 mai 2017, la Oradea.

Termenul limită pentru trimiterea rezumatelor și a lucrărilor integrale: 7.04.2017.

Mai multe informații: http://textile.webhost.uoradea.ro/Conferinta/2017/index.html

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Presentation of papers

The scientific papers should be presented for publishing in Romanian and English by the Romanian authors, and in English by the foreign authors.

The text of the article should be clear and precise, as short as possible to make it understandable. As a rule, the paper should not contain more than fifteen pages, including figures, drawings and tables. The paper should be divided into heads and chapters in a logical sequence. Decimal classification is recommended. Manuscripts must meet high scientific and technical standards. All manuscripts must be typewritten using MS Office facilities, single spaced on white A4 standard paper (210 x 297 mm) in 11-point Times New Roman (TNR) font. Please note that the content of the articles is the sole responsibility of the authors.

Format. Title. Title (Centered, **12 pt.TNR** font) should be short and informative. It should describe the contents fully but concisely without the use of abbreviations.

Authors. The complete, unabbreviated names should be given (Centered, font TNR 10), along with the affiliation (institution), city, country and email address (Centered, **9 pt.TNR** font). The author to whom the correspondence should be addressed should be indicated, as well as email and full postal address.

Abstract: A brief abstract of no more than 200-250 words must accompany each manuscript (**8 pt. TNR** font). The abstract should describe the content and results of the paper.

Keywords. Authors should give 3-5 keywords.

Text. Introduction. Should include the aims of the study and results from previous notable studies.

Materials and Methods. Experimental methods should be described clearly and briefly.

Results and Discussions. This section may be separated into two parts. Unnecessary repetition should be avoided.

Conclusions. The general results of the research are discussed in this section.

Acknowledgements. Should be as short as possible.

References. Must be numbered in the paper, and listed in the order in which they appear.

***Diagrams,* Figures and Photographs** should be constructed so as to be easy to understand and should be named "Figures"; their titles should be given below the Figure itself. The figures should be placed immediately near (after or before) the reference that is being made to them in the text. Figures should be referred to by numbers, and not by the expressions „below" or „above". The number of figures should be kept to minimum (maximum 10 figures per paper).

Tables. Should be numbered consecutively throughout the paper. Their titles must be centered at the top of the tables (**12 pt. TNR** font). The tables text should be 9 **pt. TNR** font. Their dimensions should correspond to the format of the Journal page. Tables will hold only the horizontal lines defining the row heading and the final table line. The tables should be placed immediately near (after or before) the reference that is being made to them in the text. Tables should be referred to by numbers, and not by the expressions „below" or „above". The measure units (expressed in International Measuring Systems) must be explicitly presented.

Formulas, Equations and Chemical Reactions should be numbered by Arabic numbers in round brackets, in order of appearance, and should be centered. The literal part of formulas should be in Italics. Formulas should be referred to by Arabic numbers in round brackets.

Nomenclature. Should be adequate and consistent throughout the paper, should conform as much as possible to the rules for Chemistry nomenclature. It is preferable to use the name of the substances instead of the chemical formulas in the text.

References should be numbered consecutively throughout the paper in order of citation in square brackets; the references should list recent literature also. Footnotes are not allowed. If the cited literature is in other language than English, the English translation of the title should be provided, followed by the original language in round brackets. Example: Handbook of Chemical Engineer (in Romanian), vol. 2, Technical Press, Bucharest, **1951**, 87.

Citation of journal articles: all authors' names (surname, name initials), *abbreviated journal title*, article title,**year**, volume number, issue number, full page reference. Ex: Helissey, P., Giorgi–Renault, S., Renault J., *Chem. Pharm. Bull.,* **1989**, **37**, 9, 2413-2425.

In case the reference is not cited in original, the author(s) should also list the original paper that has been consulted.

Citation of texts from books: *authors' full name and name (initials)*, title of the book, issue number in Arabic numbers, publishing house, editors name (if present), city where the book has been published, **year of publication,** the page(s) containing the text that has been cited.

Citation of patents: all authors' names (surname, name initials), or company's name, country and patent number, **date of issuance.**

Manuscripts should be submitted in electronic format by email to the following address:

Dr. Viorica DESELNICU, *Editor-in-chief*
INCDTP - Leather and Footwear Research Institute (ICPI)
93 Ion Minulescu Street, code 030215, Bucharest, Romania
Phone: +4021-323.50.60; Fax: +4021-323.52.80.
E-mail: jlfjournal@gmail.com

INSTRUCŢIUNI PENTRU AUTORI

Prezentarea lucrărilor

Lucrările ştiinţifice se vor prezenta redacţiei spre publicare în limba română şi în limba engleză de către autorii români, şi în limba engleză de către autorii străini.

Conţinutul lucrării trebuie să fie clar şi cât mai concis posibil. Articolele nu vor depăşi 15 pagini, inclusiv figurile şi tabelele. Lucrarea va fi împărţită în paragrafe şi capitole într-o succesiune logică. Este recomandată clasificarea zecimală. Articolele vor întruni un înalt standard ştiinţific şi tehnic. Toate manuscrisele vor fi editate utilizând facilităţile MS Office (Word '97 sau ulterioare) pe hârtie albă A4 standard (210 x 297 mm) cu font Times New Roman (TNR) 11, spaţiere la un rând. Conţinutul articolelor este responsabilitatea autorilor.

Formatul lucrărilor. Titlu. Titlul trebuie să descrie concis conţinutul lucrării fără a folosi abrevieri. Titlul va fi centrat, font TNR 12.

Autori. Se preferă numele complet al autorilor (Centrat, font TNR 10), împreună cu afilierea (instituţia), oraşul, ţara şi adresa de email (Centrat, font TNR 9). Se va indica autorul pentru corespondenţă cu adresa completă.

Rezumat: Un rezumat de 200-250 cuvinte va însoţi lucrarea (font TNR 8). Rezumatul trebuie să descrie conţinutul lucrării şi rezultatele obţinute.

Cuvinte cheie. Se vor prezenta 3-5 cuvinte cheie.

Textul lucrărilor. Introducere. Va include obiectivele studiului şi rezultatele studiilor relevante anterioare.

Materiale şi Metode. Metodele experimentale vor fi descrise clar şi pe scurt.

Rezultate şi Discuţii. Această secţiune poate fi separată în două părţi. Se vor evita repetiţiile care nu sunt necesare.

Concluzii. În această secţiune vor fi discutate rezultatele generale ale cercetării.

Mulţumiri. Vor fi cât mai scurte posibil.

Bibliografie. Referinţele bibliografice vor fi numerotate în lucrare şi listate în ordinea în care apar în text.

***Diagrame,* figuri şi fotografii.** Vor fi construite în aşa fel încât să fie uşor de înţeles şi vor fi denumite „Figuri"; denumirea lor va fi dată sub figura propriu-zisă. Ele vor fi plasate imediat lângă (înainte sau după) referirea care se face la ele în text. Referirile la figuri se vor face prin numere, nu prin cuvintele „mai sus" sau „mai jos". Numărul figurilor să fie cel strict necesar (maxim 10).

Tabele. Vor fi numerotate în continuare cu cifre arabe. Fiecare va avea un titlu, centrat deasupra tabelului (TNR 11). Textul tabelului va respecta fontul TNR 9. Dimensiunile tabelelor trebuie să corespundă formatului revistei. Tabelele vor prezenta numai liniile orizontale ce delimitează capul de tabel şi sfârşitul tabelului. Tabelele vor fi plasate imediat lângă (înainte sau după) referirea care se face la ele în text. Referirile la tabele se vor face prin numere, nu prin cuvintele „mai sus" sau „mai jos". Unităţile de măsură folosite (exprimate în Sistem Internaţional) trebuie prezentate explicit.

Formule, ecuaţii şi reacţii chimice. Vor fi numerotate cu cifre arabe, în paranteză mică în ordinea apariţiei, şi vor fi plasate centrat. Partea literală a formulelor trebuie să fie scrisă cu caractere italice. Referirile din text la formule se pot face prin numere arabe scrise între paranteze rotunde.

Nomenclatură. Trebuie să fie corespunzătoare şi univocă, să se conformeze pe cât posibil regulilor pentru nomenclatura în chimie, iar în text este preferabil să se folosească numele substanţelor în loc de formule chimice.

Referinţe bibliografice. Vor fi numerotate în continuare, în ordinea citării, şi notate în text prin cifre corespunzătoare, în paranteze pătrate; bibliografia va conţine şi lucrări recent publicate. Nu este permisă folosirea notelor de subsol. Dacă lucrările citate sunt în altă limbă decât limba engleză, se va oferi titlul în limba engleză, urmat de precizarea limbii originale în paranteză rotundă. Exemplu: Handbook of Chemical Engineer (in Romanian), vol. 2, Technical Press, Bucharest, **1951**, 87.

Citarea articolelor din reviste: numele tuturor autorilor (nume, iniţiale prenume), titlul articolului, *titlul abreviat al periodicului*, **anul apariţiei**, numărul volumului, numărul ediţiei, paginile de început şi sfârşit ale articolului. Ex: Helissey, P., Giorgi–Renault, S., Renault J., *Chem. Pharm. Bull.,* **1989**, **37**, 9, 2413-2425.

În cazul în care referinţa nu a fost citată în original, se va indica după ea şi lucrarea care a fost consultată.

Citarea textelor din cărţi: numele şi prenumele (iniţiala) autorilor, titlul cărţii, numărul ediţiei în cifre arabe, editura, numele editorilor (dacă este cazul), localitatea, **anul apariţiei,** pagina (sau paginile) la care se face referirea.

Citarea brevetelor: numele tuturor autorilor (nume, iniţiale prenume), sau firmei, ţara şi numărul brevetului, **data.**

Manuscrisele se vor preda în format electronic la următoarea adresă, prin email:

Dr. Viorica DESELNICU *Editor şef*

INCDTP – Sucursala Institutul de Cercetare Pielărie – Încălţăminte (ICPI)

Str. Ion Minulescu nr. **93**., cod 030215, Bucureşti, România, Tel: +4021-323.50.60, Fax: +4021-323.52.80, E-mail: jlfjournal@gmail.com

INCDTP - SUCURSALA INSTITUTUL DE CERCETĂRI PIELĂRIE ÎNCĂLȚĂMINTE

ISSN 1583-4433

LUCRARE EDITATĂ CU SPRIJINUL AUTORITĂȚII NAȚIONALE PENTRU CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ ȘI INOVARE