



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00882

(22) Data de depozit: 08/11/2018

(41) Data publicării cererii:
30/01/2020 BOPI nr. 1/2020

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE, BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• CRĂCIUNESCU OANA,
BD. NICOLAE GRIGORESCU NR. 33, BL. A 1,
SC. 3, AP. 33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;

• GASPĂR PINTILESCU ALEXANDRA,
ȘOS. COLENTINA NR. 55, BL. 83, SC. 1,
AP. 17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• MOLDOVAN LUCIA,
BD. CONSTRUCTORILOR NR. 24, BL. 19,
SC. A, ET. 2, AP. 13, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• OANCEA ANCA OLGUȚA, STR. PAȘCANI
NR. 5, BL. D7, SC. E, AP. 45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR. 5,
BL. D 7, SC. E, ET. 2, AP. 45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR PEPTIDE COLAGENICE
ANTIOXIDANTE DIN PIELE DE PEȘTE DE APĂ DULCE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor peptide antioxidante utilizate în industria cosmetică. Procedul, conform invenției, constă în extracția collagenului din piele de pește de apă dulce, având un conținut de 1...2% substanță uscată, sub formă de soluție având un conținut de collagen de 75...90% și pH 5...6,5, care este supusă hidrolizei enzimatică prin tratare cu 5...10 volume tampon Tris 0,05 M conținând clorură de sodiu, clorură de calciu și/sau SDS 0,5%, în care au fost dizolvate proteaze microbiene de tip

colagenază I, proteinază K și un amestec al acestora, în raport enzimă:substrat de 1:25...1:50, la 37...60°C, timp de 6...24 h, după care soluțiile sunt supuse ultrafiltrării, filtratul este trecut prin unitățile filtrante de 3 kDa, concentrat și liofilizat, din care rezultă o pulbere hidrosolubilă de peptide colagenice cu masă moleculară controlată de 3...10 kDa și puritate mai mare de 85%.

Revendicări: 2



PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR PEPTIDE COLAGENICE ANTIOXIDANTE DIN PIELE DE PEȘTE DE APĂ DULCE

Autori: Oana Crăciunescu, Alexandra Gaspar-Pintiliescu, Lucia Moldovan, Anca Olguța Oancea, Florin Oancea

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unor peptide bioactive cu masă moleculară între 3-10 kDa, cu activitate antioxidantă, din collagen extras din piele de pește de apă dulce, având utilizări în industria cosmetică, farmaceutică și alimentară.

Se cunoaște că, utilizarea collagenului din surse marine și din pești de apă dulce reprezintă o alternativă la sursele de origine animală, pentru a preveni astfel extinderea unor boli transmisibile, precum encefalopatia spongiformă bovină și pesta porcină, dar și pentru a răspunde unor restricții religioase privind utilizarea proteinelor animale (**Kim J-A. & Kim S-K., *Current Protein & Peptide Science*, 14, 177, 2013; Venkatesan J. et al., *Marine Drugs*, 15, 143, 2017**). Collagenul din aceste surse prezintă compoziție chimică diferită, caracteristici fizico-chimice, cum sunt temperatura de denaturare, contracția și gonflarea precum și proprietăți mecanice specifice, în funcție de condițiile climatice în care trăiesc (ape reci, ape calde, salinitate, etc.) (**Hayashi Y. et al., *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press, vol. 65, pp. 107, 2012; Barzideh Z. et al., *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 1490, 2014**).

Recent, au fost descrise procedee de obținere a collagenului din diferite surse marine, cum sunt solzii, oasele, capul, pielea, viscerele sau mușchii unor specii de pești. **Brevetul SUA 6660280 B1/dec 2003** se referă la un produs de collagen acido-solubil, obținut din piele nepigmentată de pește de origine marină (calcan), cu miros slab și proprietăți mecanice îmbunătățite prin reticulare fizică, destinat unor compoziții cosmetice și farmaceutice.

S-a demonstrat că obținerea de noi peptide cu activitate antioxidantă reprezintă o alternativă naturală la antioxidanții sintetici (BHA, BHT) utilizați în prezent și care pot avea efecte adverse asupra activității enzimatică și a ADN-ului (**Liu R. et al., *Antioxidants*, 5, 32, 2016**). De aceea, este necesar un procedeu de obținere a peptidelor bioactive din surse naturale, cum sunt sub-produsele rezultate ca deșeuri în industria piscicolă. Peptidele bioactive provenite din hidrolizate proteice de pește prezintă avantajul de a avea proprietăți

antioxidante și imunomodulatoare (De Luca C. et al., *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*, 2016, article ID 4389410, 14 pages, 2016), precum și eficiență în procesele de fotoîmbătrânire (Ngo D-H. & Kim S-J., *Journal of Functional Foods*, 2, 107, 2010) prin puterea de reducere a sintezei de melanină, ca urmare a inhibării tirozinazei (Schurink M. et al., *Peptides*, 28, 485, 2007) sau de întârziere a apariției ridurilor prin inhibarea metaloproteinazelor matriceale implicate (Zague V. et al., *Journal of Medicinal Food*, 14, 618, 2011).

Brevetul CN 104140992 (A)/nov 2014 descrie o metodă de preparare, pe scară largă, a unui produs din peptide cu masă moleculară mai mică de 1000 Da, obținut în două etape, una realizată printr-o tehnologie de hidroliză enzimatică a collagenului tip I extras din solzi de pește marin și a doua de separare prin centrifugare membranară, concentrare și uscare a soluției de peptide prin pulverizare. Cererea de **brevet US 0087220 A1/mar 2017** prezintă o compoziție de vitamina C naturală și peptide de collagen din solzi de pește, demonstrând capacitatea acestora de a proteja eficient vitamina contra oxidării și descompunerii sub acțiunea căldurii, expunerii la lumină sau contactului cu oxigenul, fără adăugarea altor aditivi. Cererile de **brevet CN 106011209 (A)/oct 2016** și **CN 106701875 (A)/mai 2017** protejează procedeele de obținere a unor hidrolizate proteice pornind de la gelatină, obținute prin degradarea unor resturi de țesut (piele sau carne) de la peștii de apă dulce, în prezența tripsinei și chimotripsinei, la temperaturi ridicate și apoi ultrafiltrare prin membrane pentru separarea peptidelor cu masă moleculară mică.

Problema tehnică pe care această invenție urmărește să o rezolve constă în obținerea unor peptide bioactive din collagen extras din piele de pește provenit din ape dulci, eficiente în tratarea bolilor de piele asociate stresului oxidativ, expunerii prelungite la radiații UV sau datorate proceselor de îmbătrânire. În plus, prin utilizarea acestei surse, se va reduce poluarea mediului cauzată de deșeurile generate de industria de prelucrare a peștelui.

Procedeul de preparare al acestor peptide, conform invenției, constă din două etape principale: extracția collagenului din piele de pește de apă dulce și obținerea peptidelor antioxidante din collagenul extras.

Obținerea collagenului

Procedeul de preparare a collagenului, conform invenției, constă din obținerea unei soluții vâscoase de collagen din 50-250 g piele de pește fitofag mărunțită, spălată cu apă în flux continuu, timp de 2...3 ore apoi cu clorură de sodiu 1M, câte 10 minute, de 2...3 ori și

apă distilată rece timp de 10...20 minute, se scurge apa, se aplică un pretratament de delipidizare prin tratare cu 200...1000 ml acetonă timp de 4...10 ore, se filtrează, se spală cu apă distilată rece și se tratează cu 500-2500 ml hidroxid de sodiu 1M, prin agitare la temperatura camerei, 3...12 ore, se filtrează și se spală apoi cu apă în flux continuu, timp de 2...3 ore și cu apă distilată rece, timp de 10...20 minute. Peste țesutul mărunțit, se adaugă pepsină din mucoasa gastrică porcină, cu activitatea de 2500...3500 unități/mg dizolvată în 20...100 ml soluție de acid acetic 0,5 M, în raport de greutate pepsină: țesut uscat de 1:5...1:10, se agită ocazional timp de 72 ore, la temperatura camerei și se adaugă treptat 380...1900 ml acid acetic 0,5 M pentru diluarea și omogenizarea soluției, apoi se separă soluția de collagen de resturile de țesut nedigerat prin filtrare și se precipită prin adăugare de sare fină de clorură de sodiu 0,7...2 M și incubare la 4 °C, timp de 20 ore, precipitatul se separă prin centrifugare la 5000 g, se dizolvă în 300...500 ml acid acetic 0,5 M, prin agitare, la 4 °C și se dializează față de apă distilată până la atingerea pH-ului acesteia, pentru obținerea de collagen nedenaturat, purificat, cu o substanță uscată de 1,0...2,0%, conținut în collagen de 75...90% și pH 5,0...6,5.

Obținerea peptidelor antioxidante

Procedeul de obținere a peptidelor antioxidante, conform invenției, constă din hidroliza enzimatică a soluției de collagen astfel obținută, prin tratare cu 5...10 volume tampon Tris 0,05 M, pH 7,4...8,3, conținând clorură de sodiu 150 mM, clorură de calciu 1 mM și/sau SDS 0,5%, în care s-au dizolvat, în prealabil, proteaze microbiene, alese dintre collagenază tip I, proteinază K și un amestec al acestora utilizat secvențial, în raport de greutate enzimă:substrat de 1:25...1:50, la 37...60 °C, timp de 6...24 ore. Pentru stoparea hidrolizei, soluția este încălzită la 90 °C, timp de 5...20 minute, răcită și centrifugată la 5000...8000 g, timp de 10 minute, după care se determină gradul de hidroliză sau capacitatea de eliberare a peptidelor bioactive. Soluțiile sunt supuse ultrafiltrării la centrifugă, utilizând unități de filtrare prevăzute cu membrane din celuloză cu limita masei moleculare de 10 kDa și, apoi, filtratul obținut se filtrează prin unitățile filtrante de 3 kDa, rezultând peptide cu masă moleculară cuprinsă între 3 și 10 kDa. Soluțiile obținute cu substanța uscată de 2...3% sunt concentrate prin centrifugare la vacuum și uscate prin liofilizare, rezultând în final o pulbere hidrosolubilă de peptide collagenice, de culoare alb-gălbuie, cu masă moleculară de 3...10 kDa și puritate mai mare de 85%.

Procedeul de obținere a peptidelor antioxidante are următoarele avantaje:

- prin utilizarea procedurii propus, se obțin peptide bioactive de greutate moleculară controlată, prin clivarea lanțului proteic la anumite situsuri specifice enzimelor folosite, spre deosebire de cel chimic, care utilizează acizi și alcalii la temperaturi ridicate;
- prezintă o eficiență mare datorită combinării a două enzime, una specifică pentru collagen și alta pentru legături peptidice ale aminoacizilor hidrofobi;
- este fezabil, nu necesită echipamente cu grad ridicat de complexitate și are un timp scurt de operare (~20 ore);
- se obține un produs cu puritate ridicată, cu un conținut mare în peptide de masă moleculară uniformă, cu activitate antioxidantă, care poate fi utilizat în industria cosmetică, farmaceutică și alimentară;
- oferă o nouă abordare pentru prelucrarea eficientă a sub-produselor rezultate prin procesarea peștilor de apă dulce.

Prezenta propunere de invenție se evidențiază prin următoarele exemple:

Exemplul 1.

Etapă I - Obținerea collagenului

Într-un vas de laborator prevăzut cu agitare, s-au introdus 100 g piele de pește fitofag care, în prealabil, a fost mărunțită mecanic, spălată cu apă comună în flux continuu, timp de 2 ore, apoi cu soluție de NaCl 1M, de 3 ori câte 10 minute fiecare și, în final, cu apă distilată, timp de 20 minute. Peste țesutul spălat, s-au adăugat 500 ml acetonă, pentru îndepărtarea lipidelor și s-a agitat amestecul format timp de 5 ore. Țesutul delipidizat a fost separat de soluția de acetonă prin filtrare, apoi spălat cu apă distilată rece și introdus într-un vas de sticlă de 3000 ml. S-au adăugat, apoi, peste țesut 1000 ml soluție NaOH 1M și s-a agitat la temperatura camerei, timp de 10 ore. După tratamentul alcalin, amestecul obținut a fost filtrat, iar țesutul mărunțit a fost spălat, într-o primă etapă cu apă în flux continuu, timp de 2 ore și, apoi, cu apă distilată, timp de 20 minute.

Într-un alt vas, s-a adăugat țesutul spălat și 100 ml soluție acid acetic 0,5 M, în care s-a dizolvat, în prealabil, pepsină cu activitatea enzimatică de 2500 UI/ mg și raport de greutate pepsină:țesut uscat de 1:6. Amestecul s-a agitat, apoi s-au mai adăugat încă 1000 ml acid acetic 0,5 M și s-a amestecat, timp de 72 de ore, la temperatura camerei. S-a obținut, astfel, soluția vâscoasă de collagen, care s-a separat prin filtrare de resturile de țesut nedigerat și s-a

purificat prin precipitare cu NaCl 0,7 M, la 4 °C, timp de 20 de ore. Precipitatul obținut s-a recuperat din soluție prin centrifugare la 5000 g, timp de 30 minute și, apoi, s-a dizolvat în 500 ml soluție de acid acetic 0,5 M, prin agitare, la 4 °C. În final, soluția acidă obținută s-a dializat extensiv față de apă distilată până la atingerea pH-ului acesteia. S-au obținut 20 ml soluție de collagen nedegradat, cu substanța uscată de 1%, conținut în collagen de 82% și pH 6,5.

Etapa II - Obținerea peptidelor

Într-un vas de inox prevăzut cu agitator, s-au introdus 20 ml soluție de collagen peste care s-au adăugat, sub agitare continuă, 125 ml tampon Tris 0,05 M, pH 7,4, ce conține clorură de sodiu 150 mM și clorură de calciu 1 mM, în care s-au dizolvat, în prealabil, 0,005 g collagenază tip I. Hidroliza enzimatică a avut loc timp de 16 ore, la temperatura de 37 °C. Stoparea reacției enzimatică s-a realizat prin fierberea soluției timp de 5 minute, după care amestecul s-a răcit și s-a centrifugat la 8000 g, timp de 10 minute. Supernatantul separat după centrifugare s-a ultrafiltrat cu ajutorul unei centrifugi, utilizând inițial unități de filtrare prevăzute cu membrane din celuloză pentru mase moleculare de 10 kDa, după care soluția rezultată s-a ultrafiltrat prin filtre pentru masa moleculară de 3 kDa. Soluția rămasă deasupra filtrului, cu concentrația de 2%, s-a recuperat, apoi s-a concentrat la minim 10% și s-a uscat prin liofilizare. În final, s-au obținut peptide cu masă moleculară cuprinsă între 3 și 10 kDa, sub formă de pulbere alb-gălbuie, solubilă în mediu apos, de puritate 85%.

Exemplul 2.

Collagenul s-a extras din pielea de fitofag mărunțită, spălată și delipidizată ca în exemplul 1, etapa 1, folosind pentru extracția lui din țesut pepsină cu activitate de 3000 UI/mg și raportul enzimă:țesut de 1:10. În aceste condiții, s-a obținut o soluție vâscoasă de collagen, cu substanța uscată de 1,5%, conținut în collagen de 90% și pH 6,2.

În etapa 2, soluția de collagen (20 ml) s-a tratat cu 0,0048 g proteinază K, dizolvată în prealabil în 100 ml tampon Tris 0,05 M, pH 8,0 conținând clorură de sodiu 150 mM, clorură de calciu 1 mM și SDS 0,5%. Reacția de hidroliză enzimatică a avut loc la 55 °C, timp de 16 ore. Fazele de stopare a reacției enzimatică și de ultrafiltrare s-au făcut în condițiile prezentate în exemplul 1, etapa 2. Soluția rămasă pe filtrul de 3 kDa, cu concentrația de 2,9%, s-a concentrat la 15% substanță uscată prin centrifugare la vid și, apoi, s-a uscat prin liofilizare. După uscare, s-a obținut o pulbere de peptide collagenice de masă moleculară 3-10 kDa și puritate 87%.

Exemplul 3.

Procedeul de obținere a collagenului și peptidelor bioactive este similar cu cel descris la exemplul 1, cu deosebirea că, în etapa 2, tratamentul enzimatic s-a făcut cu ambele enzime, care s-au adăugat peste soluția vâscoasă de collagen, după cum urmează:

(a) s-a realizat, inițial, hidroliza enzimatică a collagenului cu 0,006 g collagenază tip I, dizolvată în 60 ml tampon Tris 0,05 M, pH 7,4, ce conține clorură de sodiu 150 mM, clorură de calciu 1 mM, timp de 10 ore, temperatura de 37°C, urmată de încălzirea soluției la 90 °C, timp de 10 minute, pentru inactivarea enzimei;

(b) soluția rezultată mai sus s-a adus la pH 8,0 cu hidroxid de sodiu 1N și, apoi, s-a tratat cu 0,006 g proteinază K, dizolvată în prealabil în 65 ml tampon Tris 0,05 M, pH 8,0 conținând clorură de sodiu 150 mM, clorură de calciu 1 mM și SDS 0,5%. Reacția de hidroliză enzimatică a avut loc la 55 °C, timp de 6 ore.

Soluția recuperată după cele două ultrafiltrări, conform exemplului 1, s-a concentrat și liofilizat rezultând, în final, o pulbere alb-gălbuie de peptide collagenice de puritate mare, respectiv 92%.

Collagenul extras și peptidele collagenice obținute din piele de pește fitofag, conform exemplurilor de mai sus, au fost analizate din punct de vedere fizico-chimic și biologic.

Gradul de hidroliză al collagenului din deșeuri de piele de fitofag s-a determinat spectrofotometric prin estimarea numărului de grupări amino libere, folosind metoda cu reactiv TNBS (acid 2,4,6-trinitrobenzen sulfonic) (**Adler-Nissen J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1256, 1979**). Rezultatele obținute au demonstrat că, prin hidroliză enzimatică succesivă a collagenului din pește cu collagenază bacteriană și proteinază K, se obține cel mai mare grad de hidroliză (32,94%) (Tabelul 1).

Evaluarea activității antioxidante a peptidelor cu masă moleculară cuprinsă între 3 și 10 kDa, obținute în urma hidrolizei enzimatice a collagenului de pește fitofag, s-a realizat prin metoda cu ABTS (sarea de diamoniu a acidului 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonic) (**Re R. et al., *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231, 1999**), folosind ca martor o probă de Trolox, un analog al vitaminei E, cu activitate antioxidantă cunoscută. Datele obținute, exprimate în μM echivalenți Trolox/mg proteină au arătat că toate variantele de peptide preparate prin acest procedeu prezintă activitate antioxidantă, cea mai mare valoare (1,745 μM Trolox/mg proteină) înregistrându-se în cazul tratării collagenului cu cele două enzime, succesiv (Tabelul 2).

Biocompatibilitatea *in vitro* a peptidelor separate din colagenul de pește a fost evaluată prin testarea acestora pe celule fibroblaste, folosind linia celulară stabilizată NCTC clona L929, conform standardului internațional de testare a citotoxicității SR EN ISO 10993-5/2009. În acest context, s-au investigat viabilitatea celulară (colorație Hoechst), proliferarea celulară (testul MTT) și morfologia celulelor (colorație Giemsa) cultivate în prezența variantelor de peptide obținute, conform exemplelor de mai sus. Rezultatele testării au demonstrat că toate variantele de peptide realizate au fost biocompatibile deoarece, comparativ cu proba martor (celule în mediul de cultură, fără produse), celulele cultivate în prezența probelor noastre au prezentat valori ridicate ale viabilității și proliferării, iar morfologia lor în cultură a fost normală, caracteristică fenotipului celulelor fibroblaste.

Tabelul 1. Gradul de hidroliză al colagenului extras din piele de pește fitofag, după tratament enzimatic, determinat prin metoda cu TNBS

Proba	Hidrolizat colagenic obținut cu collagenază	Hidrolizat colagenic obținut cu proteinază K	Hidrolizat colagenic obținut cu collagenază și proteinază K
Grad de hidroliză (%)	26,65	30,35	32,94

Tabelul 2. Activitatea antioxidantă a peptidelor bioactive obținute din colagen de pește fitofag, determinată prin metoda cu ABTS

Proba	Peptide separate cu collagenază	Peptide separate cu proteinază K	Peptide separate cu collagenază și proteinază K
Capacitatea antioxidantă (μ M Trolox/mg proteină)	0,787	1,443	1,745

REVENDICĂRI

1. Procedeul de preparare a collagenului, conform invenției, constă din obținerea unei soluții vâscoase de collagen din 50-250 g piele de pește fitofag marunțită, spălată cu apă în flux continuu, timp de 2...3 ore apoi cu clorură de sodiu 1M, câte 10 minute, de 2...3 ori și cu apă distilată rece timp de 10...20 minute, se scurge apa, se aplică un pretratament de delipidizare prin tratare cu 200...1000 ml acetonă, timp de 4...10 ore, se filtrează, se spală cu apă distilată rece și se tratează cu 500-2500 ml hidroxid de sodiu 1M, prin agitare la temperatura camerei, 3...12 ore, se filtrează și se spală apoi cu apă în flux continuu, timp de 2...3 ore și cu apă distilată rece, timp de 10...20 minute. Peste țesutul mărunțit, se adaugă pepsină din mucoasa gastrică porcină, cu activitatea de 2500...3500 unități/mg dizolvată în 20...100 ml soluție de acid acetic 0,5 M, în raport de greutate pepsină:țesut uscat de 1:5...1:10, se agită ocazional timp de 72 de ore, la temperatura camerei și se adaugă treptat 380...1900 ml acid acetic 0,5 M pentru diluarea și omogenizarea soluției, apoi se separă soluția de collagen de resturile de țesut nedigerat prin filtrare și se precipită prin adăugare de sare fină de clorură de sodiu 0,7...2 M și incubare la 4 °C, timp de 20 ore, precipitatul se separă prin centrifugare la 5000 g, se dizolvă în 300...500 ml acid acetic 0,5 M, prin agitare, la 4 °C și se dializează față de apă distilată până la atingerea pH-ului acesteia, pentru obținerea de collagen nedenaturat, purificat, cu o substanță uscată de 1,0...2,0%, conținut în collagen de 75...90% și pH 5,0...6,5.

2. Procedeul de obținere a peptidelor antioxidante, conform invenției, constă din hidroliza enzimatică a soluției de collagen astfel obținută, prin tratare cu 5...10 volume tampon Tris 0,05 M, pH 7,4...8,3 conținând clorură de sodiu 150 mM, clorură de calciu 1 mM și/sau SDS 0,5%, în care, în prealabil, s-au dizolvat proteaze microbiene, alese dintre collagenază tip I, proteinază K și un amestec al acestora utilizat secvențial, în raport de greutate enzimă:substrat de 1:25...1:50, la 37...60 °C, timp de 6...24 ore. Pentru stoparea hidrolizei, soluția este încălzită la 90 °C, timp de 5...20 minute, răcită și centrifugată la 5000...8000 g, timp de 10 minute, după care se determină gradul de hidroliză sau capacitatea de eliberare a peptidelor bioactive. Soluțiile sunt supuse ultrafiltrării la centrifugă utilizând unități de filtrare prevăzute cu membrane din celuloză cu limita masei moleculare de 10 kDa

și, apoi, filtratul obținut se filtrează prin unitățile filtrante de 3 kDa, rezultând peptide cu o masă moleculară cuprinsă între 3 și 10 kDa. Soluțiile obținute cu substanța uscată de 2...3% sunt concentrate prin centrifugare la vacuum și uscate prin liofilizare rezultând, în final, o pulbere hidrosolubilă de peptide colagenice, de culoare alb-gălbuie, cu masă moleculară de 3...10 kDa și puritate mai mare de 85%.