



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00240

(22) Data de depozit: 16.03.2010

(41) Data publicării cererii:
30.09.2011 BOPI nr. 9/2011

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE TEXTILE PIELĂRIE -
SUCURSALA INSTITUTUL DE CERCETĂRI
PIELĂRIE ÎNCĂLȚĂMINTE,
STR. ION MINULESCU NR.93, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• NICULESCU MIHAELA,
ALEEA BARAJUL CUCUTENI NR.8,
BL. M7A, SC.2, ET.1, AP.25, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• GAIDĂU CARMEN CORNELIA,
STR. AL.PAPIU ILARIAN NR. 6, BL. 42,
SC. 2, AP. 53, ET. 6, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CRUDU MARIAN, PREL. GHENCEA
NR. 36, BL. D4, SC. 1, ET. 1, AP. 3,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• DEMETRA SIMION,
BD. DIMITRIE CANTEMIR NR.9, BL.7, SC.B,
ET.3, AP.59, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **PROCEDEU DE EXTRAGERE A PROTEINELOR DIN
DEȘEURI DE PIELE CROMATĂ ȘI REDUCERE A MASEI
MOLECULARE MEDII A HIDROLIZATELOR DE COLAGEN**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor hidrolizate de colagen utilizate ca aditivi proteici în agricultură. Procedeu conform invenției constă din extragerea proteinelor din deșeuri de piele cromată, prin hidroliza alcalină cu oxid de calciu, la un raport solid/lichid de 1/5, la 70...80°C, timp de 4...6 h, sub agitare continuă, sau prin hidroliză alcalino-enzimatică cu oxid de calciu, la un raport solid/lichid de 1/5, timp de 2...3 h, la 70...80°C, apoi cu un preparat enzimatic, la 37°C, timp de 3...4 h, sub agitare continuă, după care

dispersia obținută, conținând hidrolizate de colagen, cu masa moleculară medie de 10.000...14.000 Daltoni și conținut de Cr de până la 100 ppb, se filtrează și se trece la o hidroliză cu un preparat enzimatic cu un ciclu de 10 min agitare, 20 min pauză, rezultând hidrolizate de colagen cu o masă moleculară medie redusă cu 40...50%.

Revendicări: 3



PROCEDEU DE EXTRAGERE A PROTEINELOR DIN DEȘEURI DE PIELE CROMATĂ ȘI REDUCERE A MASEI MOLECULARE MEDII A HIDROLIZATELOR DE COLAGEN

DESCRIERE

Invenția se referă la un procedeu de extragere a proteinelor din deșeuri de piele cromată și reducere a masei moleculare medii a hidrolizatelor de colagen. Acest procedeu se aplică în domeniul prelucrării pieilor naturale, pentru extragerea componentei proteice din deșeuri de piele tăbăcită cu crom, sub formă de hidrolizate de colagen cu conținut de aminoacizi, inclusiv aminoacizi esențiali, în vederea valorificării în domeniul agricol, în compoziția fertilizanților foliari.

Industria de pielărie este nominalizată în OG nr. 34, adoptat în 2002, privind Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC) și Best Available Technique (BAT). Deși s-au luat câteva măsuri în sensul creșterii eficacității proceselor chimice și diminuării cantităților de deșeuri, sectorul de pielărie are încă, serioase probleme tehnologice de rezolvat. Dintre acestea, cea mai importantă o reprezintă procesul de tăbăcire cu crom, la care se adaugă tratarea efluenților, datorită sărurilor de crom folosite, știut fiind că speciația cromului generează produși deosebit de toxici. Eforturile de a înlocui sărurile de crom cu alte substanțe tanante s-au dovedit până acum neconvingătoare în ceea ce privește performanțele semifabricatelor din piele obținute prin tehnologiile alternative.

Desigur că există și aplicații unde acestea sunt viabile, dar în cea mai mare parte din situații încă nu se poate renunța la tăbăcirea cu săruri bazice de crom, iar acest proces este generatorul unor importante surse de poluare (ape reziduale cu crom, care în urma epurării este transferat în nămoluri și deșeuri solide cu crom și proteine, pentru care nu există o strategie unitară de eliminare sau inertizare). În acest context, căile de diminuare a impactului cromului vehiculat în tăbăcării, constau în abordarea celor mai bune practici care împiedică apariția cromului hexavalent în fluxul de fabricație și un bun management al deșeurilor de piele cromată și al flotelor cu crom neepuizate. Dacă în cadrul unităților prelucrătoare de piele aceste practici pot fi stăpânite, nu același lucru se poate spune despre deșeurile care sunt evacuate din perimetrul acestora și a căror trasabilitate se pierde, reprezentând un risc major pentru mediu [1].

Constrângerile legislative și responsabilitatea producătorilor de piele pentru impactul acestor deșeuri asupra mediului impun concentrarea atenției spre găsirea unor soluții științifice și tehnice, accesibile, de armonizare a producției de piele finită cu exigențele unui management de mediu performant. Din această perspectivă, studiile asupra deșeurilor de piele cromată s-au axat pe înglobarea lor în diverse produse ca talpă artificială, beton, asfalt, folosirea lor ca mediu de adsorbție pentru diverse reziduuri, dar în ultimii ani s-a pus accentul pe procesarea lor pentru recuperarea masei proteice.

Studiile de extragere prin hidroliză a proteinelor din deșeurile de piele cromată, în scopul disponibilizării lor ca aditivi proteici pentru diverse aplicații (biofertilizanți agricoli, surfactanți etc), sunt de mare actualitate și promovează ideea de conservare a resurselor naturale, printr-o valorificare avansată, aducând contribuții importante în sfera preocupărilor pentru protecția mediului și creșterea competitivității economice.

Din cercetările ultimilor ani în această direcție [2-9], reiese evident faptul că hidroliza trebuie abordată în mod complex, în mai multe trepte, cu mecanisme diferite de desfășurare, inițiate de agenți chimici diferiți, care să se completeze reciproc.

16-03-2010

Spre deosebire de deșeurile de piei brute sau numai cenușărite, a căror dizolvare nu ridică prea multe dificultăți, în cazul deșeurilor tăbăcite, apar dificultăți legate de detanarea acestora.

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

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

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

În timpul procesului de hidroliză are loc atât ruperea legăturilor caracteristice proteinelor, cât și formarea de noi legături: electrovalente, coordinative, covalente etc, care vor determina un nivel al energiei interne a produselor care le conțin, mult mai scăzut decât al reactanților. În această situație, diversele combinații între temperatură și durată, la aceeași valoare a concentrației agentului de hidroliză, nu vor furniza o energie de reacție capabilă să distrugă legăturile formate la nivelul oligopeptidelor. Prin urmare, mărirea temperaturii și a duratei de hidroliză peste o valoare limită, nu vor determina creșteri semnificative ale randamentului în hidrolizate proteice. Teoretic există trei motive posibile ale hidrolizei incomplete a deșeurilor de piele cromată:

- Aminoacizii nepolari și aminoacizii bazici din resturile proteinice, fiind toți hidrofobi în condiții alcaline, ar putea să formeze domenii hidrofobe inaccesibile apei, conducând la proteine rezistente la apă.

- Produsele din resturile proteinice pot să formeze legături transversale covalente între aminoacizii bazici și aminoacizii hidroxilici, legături destructibile doar în condiții acide conducând la hidroliza completă a resturilor proteinice și obținerea de hidrolizate proteice cu conținut de crom.

- În condiții alcaline (pH < 12), majoritatea cromului legat coordinativ se desprinde de grupele carboxil din catena laterală a acidului aspartic (Asp) și glutamic (Glu) și este precipitat sub formă de Cr(OH)₃. Totuși, complexii cromului formați în timpul bazificării au rezistență mare la alcalii. Aceștia ar putea să formeze legături transversale cu grupele carboxil din punțile Asp și Glu sau hidrolizate proteice, care să conducă la formarea de complecși metalici macromoleculari insolubili [3].

Se cunosc procedee de tratare a deșeurilor de piele cromată prin hidroliză alcalină (US Patent 4100154; US Patent 4483829) sau hidroliză enzimatică (US Patent 5094946), pentru separarea proteinelor în vederea folosirii lor ca suplimente nutritive în alimentația animalelor, ca îngrășăminte sau în preparatele cosmetice [11-13]. De asemenea s-au căutat și soluții bazate pe hidrolize alcalino-enzimatică elaborate în principal pentru obținerea de hidrolizate de colagen apte pentru realizarea de fertilizanți [14,15].

Aceste procedee prezintă următoarele dezavantaje:

- deșeurile de piele folosite se supun în prealabil unor operații mecanice de măcinare;
- procese de hidroliză alcalină se desfășoară la temperaturi de peste 90 °C;
- hidrolizatele proteice obținute au un conținut de crom de ordinul sutelor de ppm la pH<11;
- conținutul de aminoacizi liberi în hidrolizatele proteice destinate folosirii ca fertilizanți, este mic;
- procesele nu pun accentul pe obținerea de hidrolizate de collagen cu conținut de aminoacizi esențiali, recunoscuți pentru contribuția importantă pe care o au în metabolismul plantelor, mai ales în condiții de stres;
- nu prezintă o alternativă de reducere a maselor moleculare medii ale hidrolizatelor de collagen.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă din obținerea de hidrolizate de collagen cu un conținut diversificat de aminoacizi, inclusiv aminoacizi esențiali, în care cromul nu se regăsește decât la nivelul zecilor de ppb [16,17], prin elaborarea unui procedeu de extragere a proteinelor din deșeuri de piele cromată și reducere a masei moleculare medii a hidrolizatelor de collagen, care se desfășoară în două etape de hidroliză. În etapa I are loc extracția componentei proteice prin hidroliză alcalină sau alcalino-enzimatică sub formă de hidrolizat de collagen și separarea prin filtrare de compușii cu crom sub formă de precipitat care urmează a fi transferat în matrici minerale valorificabile, iar în etapa II are loc reducerea masei moleculare medii a hidrolizatului de collagen, prin relansarea procesului de hidroliză, dar în condiții enzimatice, când are loc punerea în libertate a aminoacizilor, inclusiv a aminoacizilor esențiali.

Hidrolizele se desfășoară în vase de reacție închise, prevăzute cu sistem de încălzire-răcire prin manta, termostatat și cu sistem de agitare.

Ca materie primă se folosesc fragmente reziduale de piele cromată, care au, în general, umiditatea de 50-60 % și se caracterizează printr-un conținut de 85-87% substanță dermică (raportat la produsul liber de umiditate), 4,5-5,5% oxid de crom (raportat la produsul liber de umiditate), restul fiind constituit din săruri provenite din faza de pregătire a suportului collagenic pentru tăbăcire.

Deșeurile de piele cromată (analizate din punct de vedere al conținutului de umiditate, azot total, substanță dermică, crom, dispersate în apă într-un raport solid/lichid de 1/5, se supun etapei I de hidroliză alcalină sau alcalino-enzimatică, folosind oxid de calciu ca agent alcalin de hidroliză și preparatul enzimatic Oropon ON₂ (activ la 37°C și pH = 7-9) pentru hidroliza enzimatică. Oxidul de calciu are proprietatea de a coagula ionii sulfat sub formă de sulfat de calciu, în mod semănător precipitării hidroxidului de crom, iar coprecipitarea celor doi compuși ajută la separarea hidroxidului de crom din dispersia rezultată în urma hidrolizei. Oxidul de calciu se dozează sub formă solidă, într-o cantitate stoichiometric stabilită, pentru precipitarea întregii cantități de crom conținut de deșeurile de piele. Hidroliza alcalină se desfășoară sub agitare continuă, la temperatura de 70....80°C, timp de 6....4 ore. Dacă se optează pentru hidroliza alcalino-enzimatică, durata se scurtează la 2....3 ore, după care masa de reacție se răcește la 37°C, se verifică pH-ul și dacă este cazul se corectează cu acid sulfuric astfel încât să aibă valoarea în intervalul 7....10 și sub agitare continuă, se adaugă preparatul enzimatic Oropon ON₂, în stare solidă, într-o cantitate echivalentă pentru un raport de 2....4 unități enzimatice/gram azot total, se menține la temperatura de 37°C timp de 4....3 ore, sub agitare continuă, după care se încălzește la 60°C pentru dezactivarea enzimei.

Oricare dintre cele două variante descrise conduce la dezagregarea fragmentelor de piele, precipitarea cromului sub formă de hidroxid de crom și trecerea componentei proteice în soluție, în proporție 80....90 %. Dispersia caldă se filtrează printr-un filtru presă sau sub

16-03-2010

vid (filtru Nuce). Filtratul care este format din hidrolizatul de collagen cu o masă moleculară medie de 10 000.....14 000 Daltoni este supus analizei pentru determinarea conținutului de azot total și azot aminic, precum și pentru stabilirea pH-ului.

Hidrolizatul de collagen se transferă în vasul de reacție și se supune etapei II de hidroliză, în condiții enzimaticе, cu Alcalase 2,5 L (activă la 70°C și pH = 7-10) sau cu Oropon ON₂ (activ la 37°C și pH = 7-9). Dacă este cazul se corectează pH-ul prin adăugare de acid sulfuric 96% sub agitare, astfel încât să se încadreze în limitele de activitate a preparatului enzimatic folosit. Sub agitare continuă, se dozează preparatul enzimatic Alcalase 2,5L într-o cantitate echivalentă pentru un raport de 3.....5 unități enzimaticе / gram (azot total-azot aminic), se aduce masa de reacție la temperatura de 70°C și se menține la această temperatură timp de 4.....2 ore, cu agitare intermitentă: 10 minute agitare 20 minute repaus, după care se încălzește la 85°C pentru dezactivarea enzimei și apoi se răcește liber, sau se dozează preparatul enzimatic Oropon ON₂ într-o cantitate echivalentă pentru un raport de 4.....6 unități enzimaticе/gram (azot total-azot aminic), se aduce masa de reacție la temperatura de 37°C și se menține la această temperatură, sub agitare intermitentă: 10 minute agitare 20 minute repaus, timp de 5.....3 ore, după care se încălzește la 60°C pentru dezactivarea enzimei și apoi se răcește liber.

Drept consecință a relansării procesului hidrolitic în etapa II, în condiții enzimaticе, are loc reducerea masei moleculare medii a hidrolizatului de collagen cu 40.....50% față de masa moleculară medie a hidrolizatului de collagen obținut în etapa I prin hidroliza alcalină sau alcalino-enzimatică. Scindările lanțurilor peptidice care au loc în timpul hidrolizei enzimaticе în etapa II, asigură diversificarea conținutului de aminoacizi, inclusiv aminoacizi esențiali, în hidrolizatele de collagen, cu aplicații în special în domeniul agricol.

Procedeu de extragere a proteinelor din deșeuri de piele cromată și reducere a masei moleculare medii a hidrolizatelor de collagen, conform invenției, elimină dezavantajele menționate anterior prin aceea că:

- folosește fragmente reziduale de piele cromată, rezultate după operația de egalizare a pieilor tăbăcite cu săruri bazice de crom, cu umiditatea de 50.....60 %, cu un conținut de 85.....87% substanță dermică (raportat la produsul liber de umiditate) și 4,5.....5,5% oxid de crom (raportat la produsul liber de umiditate), fără a fi necesare operații mecanice de tăiere, măcinare, tocare;
- folosește în etapa I hidroliza alcalină la un raport solid/lichid de 1/5, cu oxid de calciu, la temperatura de 70.....80°C, timp de 6.....4 ore, sub agitare continuă, sau hidroliza alcalino-enzimatică la un raport solid/lichid de 1/5, cu oxid de calciu, la temperatura de 70.....80°C, timp de 2.....3 ore și preparatul enzimatic Oropon ON₂ (sau echivalent) la temperatura de 37°C, timp de 4.....3 ore, sub agitare continuă, asigurând extragerea componentei proteice cu un randament de 80.....90%, sub formă de hidrolizat de collagen cu masa moleculară medie de 10 000.....14 000 Daltoni și cu mai puțin de 100 ppb crom;
- folosește în etapa II hidroliza enzimatică, cu Alcalase 2,5L (sau echivalent), la temperatura de 70°C, timp de 4.....2 ore, sau Oropon ON₂ (sau echivalent) la temperatura de 37°C, timp de 5.....3 ore, cu agitare intermitentă: 10 minute agitare 20 minute repaus, asigurând reducerea masei moleculare medii a hidrolizatului de collagen cu 40.....50% față de masa moleculară medie a hidrolizatului de collagen obținut în etapa I prin hidroliză alcalină sau alcalino-enzimatică și promovarea diversificării conținutului de aminoacizi, inclusiv aminoacizi esențiali, astfel încât hidrolizatului de collagen obținut prin acest procedeu să fie destinat, în special, aplicațiilor în domeniul agricol.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- recuperarea cu randamente mari a componentei proteice din deșeurile de piele cromată, cu toate implicațiile favorabile legate de eliminarea acestora și implicit reducerea spațiilor de depozitare, transport, respectarea legislației de mediu în vigoare, conservarea resurselor naturale printr-o valorificare avansată;
- evidențierea posibilității de a utiliza o resursă alternativă de aminoacizi (care în general au prețuri ridicate) pentru fertilizantii foliari destinați culturilor agricole;
- convertirea unui deșeu dintr-o industrie, într-un factor de creștere a eco-eficienței pentru un alt domeniu de activitate (prin înlocuirea totală sau parțială a aminoacizilor din alte resurse mai costisitoare);
- procedeul de reducere a masei moleculare medii a hidrolizatorilor de colagen conform invenției este simplu, eficient, ieftin, reproductibil;
- diversificarea gamei de hidrolizate de colagen în funcție de necesități;
- promovarea tehnologiilor bazate pe procese enzimatic, cu certe implicații favorabile în reducerea poluării induse de utilizarea substanțelor chimice de sinteză;

Se dau în continuare două exemple de realizare a invenției:

Exemplul 1

Etapa I. Fragmente reziduale de piele cromată, rezultate după operația de egalizare a pieilor tăbăcite cu săruri bazice de crom, analizate pentru determinarea conținutului de crom, de azot total și de substanță dermică, sunt dispersate într-un volum de apă echivalent raportului solid/lichid de 1/5, într-un vas de reacție termostatat, prevăzut cu sistem de agitare, sunt tratate cu oxid de calciu echivalent precipitării complete a cromului conținut. Masa de reacție se încălzește până la 70...80°C și se menține sub agitare continuă la temperatura respectivă timp de 6...4 ore, timp în care fragmentele de piele sunt dezagregate, cromul este precipitat sub formă de hidroxid de crom și componenta proteică trece în soluție în proporție 80...90 %. Dispersia caldă se filtrează printr-un filtru presă sau sub vid (filtru Nuce), iar filtratul, supus analizei pentru determinarea conținutului de azot total și azot aminic, având o masă moleculară medie de 10 000...14 000 Daltoni, se transferă într-un vas de reacție termostatat, prevăzut cu agitare.

Etapa II. Se verifică pH-ul hidrolizatului de colagen și dacă este cazul se corectează cu acid sulfuric astfel încât să aibă valoarea în intervalul 7...10. Sub agitare continuă, se adaugă preparatul enzimatic Alcalase 2,5L într-o cantitate echivalentă pentru un raport de 3...5 unități enzimatic / gram (azot total-azot aminic), se aduce masa de reacție la temperatura de 70°C și se menține la această temperatură timp de 4...2 ore, cu agitare intermitentă: 10 minute agitare 20 minute repaus, după care se încălzește la 85°C pentru dezactivarea enzimei și apoi se răcește liber.

Exemplul 2

Etapa I. Fragmente reziduale de piele cromată, rezultate după operația de egalizare a pieilor tăbăcite cu săruri bazice de crom, analizate pentru determinarea conținutului de , de azot total și de substanță dermică, sunt dispersate într-un volum de apă echivalent raportului solid/lichid de 1/5, într-un vas de reacție termostatat, prevăzut cu sistem de agitare, sunt tratate cu oxid de calciu echivalent precipitării complete a cromului conținut. Masa de reacție se încălzește până la 70...80°C și se menține sub agitare continuă la temperatura respectivă timp de 2...3 ore, după care masa de reacție se răcește la 37°C, se verifică pH-ul și dacă este cazul se corectează cu acid sulfuric astfel încât să aibă valoarea în intervalul 7...9 și sub

agitare continuă, se adaugă preparatul enzimatic Oropon ON₂ într-o cantitate echivalentă pentru un raport de 2.....4 unități enzimatic/gram azot total, se menține la temperatura de 37°C timp de 4.....3 ore, sub agitare continuă, după care se încălzește la 60°C pentru dezactivarea enzimei. Dispersia caldă se filtrează printr-un filtru presă sau sub vid (filtru Nuce), iar filtratul, supus analizei pentru determinarea conținutului de azot total și azot aminic, având o masă moleculară medie de 10 000.....14 000 Daltoni, se transferă într-un vas de reacție termostatat, prevăzut cu agitare.

Etapa II. Se verifică pH-ul hidrolizatului de collagen și dacă este cazul se corectează cu acid sulfuric astfel încât să aibă valoarea în intervalul 7.....9. Sub agitare continuă, se adaugă preparatul enzimatic Oropon ON₂ într-o cantitate echivalentă pentru un raport de 4.....6 unități enzimatic/gram (azot total-azot aminic), se aduce masa de reacție la temperatura de 37°C și se menține la această temperatură, sub agitare intermitentă: 10 minute agitare 20 minute repaus, timp de 5.....3 ore, după care se încălzește la 60°C pentru dezactivarea enzimei și apoi se răcește liber.

**PROCEDEU DE EXTRAGERE A PROTEINELOR DIN DEȘEURI DE PIELE
CROMATĂ ȘI REDUCERE A MASEI MOLECULARE MEDII
A HIDROLIZATELOR DE COLAGEN**

REVENDICĂRI

1. Procedeul de extragere a proteinelor din deșeuri de piele cromată și reducere a masei moleculare medii a hidrolizatelor de colagen, caracterizat prin aceea că folosește fragmente reziduale de piele cromată, rezultate după operația de egalizare a pieilor tăbăcite cu săruri bazice de crom, cu umiditatea de 50.....60 %, cu un conținut de 85.....87% substanță dermică (raportat la produsul liber de umiditate) și 4,5.....5,5% oxid de crom (raportat la produsul liber de umiditate), fără a fi necesare operații mecanice de tăiere, măcinare, tocare.
2. Procedeul conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că folosește în etapa I hidroliza alcalină la un raport solid/lichid de 1/5, cu oxid de calciu, la temperatura de 70.....80°C, timp de 6.....4 ore, sub agitare continuă, sau hidroliza alcalino-enzimatică la un raport solid/lichid de 1/5, cu oxid de calciu, la temperatura de 70....80°C, timp de 2.....3 ore și preparatul enzimatic Oropon ON₂ (sau echivalent) la temperatura de 37°C, timp de 4.....3 ore, sub agitare continuă, asigurând extragerea componentei proteice cu un randament de 80.....90%, sub formă de hidrolizat de colagen cu masa moleculară medie de 10 000.....14 000 Daltoni și cu mai puțin de 100 ppb crom.
3. Procedeul conform revendicării 2 caracterizat prin aceea că folosește în etapa II hidroliza enzimatică, cu Alcalase 2,5L (sau echivalent), la temperatura de 70°C, timp de 4.....2 ore, sau Oropon ON₂ (sau echivalent) la temperatura de 37°C, timp de 5.....3 ore, cu agitare intermitentă: 10 minute agitare 20 minute repaus, asigurând reducerea masei moleculare medii a hidrolizatului de colagen cu 40.....50% față de masa moleculară medie a hidrolizatului de colagen obținut în etapa I prin hidroliză alcalină sau alcalino-enzimatică și promovarea diversificării conținutului de aminoacizi, inclusiv aminoacizi esențiali, astfel încât hidrolizatului de colagen obținut prin acest procedeu să fie destinat, în special, aplicațiilor în domeniul agricol.