

GRAŻYNA KRASNOWSKA, EWA DWORECKA

## OCENA PRZYDATNOŚCI PROTEAZ TRZUSTKOWYCH DO DEGRADACJI SUROWCÓW ZWIERZĘCYCH BOGATYCH W TKANKĘ ŁĄCZNĄ

### Streszczenie

W pracy scharakteryzowano właściwości proteolityczne preparatu enzymatycznego uzyskanego z trzustek indyjskich oraz oceniono przydatność tych enzymów do degradacji skór wieprzowych. Hydrolizę enzymatyczną surowca prowadzono w środowisku o pH = 7,0, a następnie przedłużano ją o hydrolizę kwasową w pH = 3,2. Na podstawie wyników badań wykazano wysoką aktywność proteolityczną proteaz trzustkowych wobec kazeiny oraz stwierdzono aktywność wobec substratów kolagenowych. Efektywność hydrolizy enzymatycznej skór wieprzowych, wyrażona ilością uwalnianej hydroksyproliny, wolnych grup aminowych oraz białka, była kilkakrotnie większa niż hydrolizy kwasowej. Ponadto poprzez odpowiedni dobór warunków prowadzenia procesu (temperatura, pH oraz rozdrobnienie surowca) można istotnie wpływać na jego wydajność. Reasumując, enzymy z trzustek indyjskich charakteryzują się wysoką aktywnością proteolityczną w stosunku do białek skór wieprzowych.

**Słowa kluczowe:** enzymy proteolityczne, aktywność kolagenolityczna, trzustki indyjskie, skóry wieprzowe.

### Wprowadzenie

W przemyśle spożywczym mniej cenne surowce znajdują różne, niekonwencjonalne zastosowania dzięki postępowi technologicznemu w ich przetwarzaniu i modyfikowaniu, a w szczególności dzięki rozwojowi metod biotechnologicznych. Enzymatyczne modyfikowanie białek żywności umożliwia poprawę ich cech reologicznych i funkcjonalnych, usunięcie lub inaktywację szkodliwych składników żywności czy też wytworzenie nowych produktów. Istotny jest również fakt, że procesy, w których wykorzystywane są enzymy, prowadzi się najczęściej w warunkach mało uciążliwych dla środowiska [3, 4, 18].

Skóry świń są tanim surowcem wykorzystywanym bezpośrednio w produkcji przetworów mięsnych bądź są źródłem kolagenu o szerokim, przemysłowym

zastosowaniu. Białko to dzięki specyficznym cechom fizykochemicznym decyduje o właściwościach reologicznych produktów żywnościowych, do których jest dodawane. Powszechnie znane są zastosowania kolagenu w medycynie, w przemyśle kosmetycznym, garbarskim i wielu innych gałęziach gospodarki [5, 6].

Celem niniejszych badań była próba degradacji skór wieprzowych, wykorzystując właściwości proteolityczne preparatu enzymatycznego uzyskanego z trzustek indyjskich.

### **Materiał i metody badań**

Wstępna część badań dotyczyła charakterystyki preparatu enzymatycznego uzyskanego z trzustek indyjskich zgodnie z metodyką Tłuścika i wsp.[17]. Trzustki pochodziły od indyków rasy BUT 8T.

Preparat enzymatyczny oceniono pod względem właściwości proteolitycznych wobec standardowych substratów białkowych: kazeiny (Serva), żelatyny (Serva), hemoglobiny (preparat przygotowany laboratoryjnie z krwi wołowej) i preparatów syntetycznych (Sigma): elastyny Congo Red, Azocollu, Hide Power Azure, peptydu BApNA. Aktywność wobec tych substratów oznaczano spektrofotometrycznie, a jako jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która powoduje przyrost ekstynkcji o 0,01 pomiędzy próbą właściwą a kontrolną, po dwugodzinnej inkubacji substratu w temp. 35°C z preparatem enzymów trzustkowych w buforze TRIS-HCl o pH = 8,0 lub w buforze Brittona-Robinsona o pH = 6,0 [2, 8, 10]. Ponadto przeprowadzano ocenę właściwości kolagenolitycznych wobec 1% roztworu kolagenu rozpuszczalnego (Serva) oraz wobec natywnych białek z wołowych ścięgien Achillesa. Podatność na degradację enzymów trzustkowych kolagenu rozpuszczalnego oceniano na podstawie dynamiki przyrostu wolnych grup aminowych [7, 15] i hydroksyproliny [1] w roztworze po 2, 5 i 24 h prowadzenia procesu hydrolizy tego substratu w buforze Brittona Robinsona o pH = 6,0 w temp. 35°C. Natomiast wołowe ścięgna Achillesa poddawano działaniu proteaz trzustkowych w analogicznych warunkach, a intensywność procesu degradacji surowca określano po 24, 48 i 72 h czasu jego trwania.

W dalszym etapie doświadczenia prowadzono enzymatyczną hydrolizę skór wieprzowych w środowisku o pH = 7,0, którą następnie przedłużano o hydrolizę kwasową w pH = 3,2. Materiał ten uzyskano z partii bocznych skór świń rasy Pietrain i poddano oczyszczeniu z tkanki tłuszczowej. Jednocześnie analizowano wpływ zmienności takich czynników, jak: stopień rozdrobnienia skór, czas i temperatura prowadzenia procesu. Ocenę efektywności degradacji doświadczalnego surowca prowadzono w oparciu o analizę przyrostu wolnej hydroksyproliny, wolnych grup aminowych i białka [9] w roztworach po hydrolizie oraz zmiany podstawowego składu

chemicznego i zawartości kolagenu w skórach. Przeprowadzone warianty hydrolizy skór oznaczono:

- A – hydroliza skór rozdrobnionych w wilku laboratoryjnym ( $\emptyset$  3 mm) – enzymatyczna 8 h w temp. 20°C, pH = 7,0 oraz kwasowa w pH = 3,2 w temp. 4°C przez 24 i 48 h;
- B – hydroliza skór rozdrobnionych na paski o wymiarach ok. 1 x 5 cm – enzymatyczna 8 h w temp. 20°C, pH = 7,0 oraz kwasowa w pH = 3,2 w temp. 4°C przez 24 i 48 h;
- C – hydroliza skór rozdrobnionych na paski o wymiarach ok. 1 x 5 cm – enzymatyczna 8 h w temp. 20°C, pH = 7,0 oraz kwasowa w pH = 3,2 w temp. 20°C przez 24 i 48 h.

Wyniki poddano wielokierunkowej analizie wariancji za pomocą programu STATISTICA w wersji 5.0.

### Wyniki i dyskusja

Wyniki oznaczeń właściwości proteolitycznych doświadczalnego preparatu enzymatycznego wobec wybranych substratów przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Aktywność preparatu enzymatycznego z trzustek indyjskich.  
Activity of the enzymatic preparation from turkey pancreases.

Substrat Substrate	pH	Aktywność / Activity	
		[j. a./cm <sup>3</sup> ] [u.a./ cm <sup>3</sup> ]	[j.a./mg białka] [u.a./mg protein]
Hemoglobina Hemoglobin	8,0	825	55,0
Kazeina Casein	8,0	10266	684,4
	6,0	6066	404,4
Żelatyna Gelatin	8,0	975	65,0
	6,0	brak aktywności no activity	brak aktywności no activity
Elastyna Congo Red Congo Red Elastin	6,0	924	61,6
Azocoll	6,0	1046	69,7
Hide Power Azure (HPA)	6,0	510	34,0
BAPNa	6,0	4095	273,0

Uzyskany preparat wykazywał najwyższą aktywność hydrolityczną w stosunku do kazeiny, przy czym bardzo istotny wpływ na efektywność tych enzymów miało pH środowiska, gdyż obniżenie o 2 jednostki spowodowało 40% spadek ich aktywności w stosunku do tego białka. Spośród pozostałych analizowanych substratów wysoką aktywność enzymów trzustkowych odnotowano w stosunku do substratów syntetycznych – peptydu BApNa i Azocollu. Wobec hemoglobiny i żelatyny aktywność była niższa, a przy obniżeniu pH środowiska działania proteaz trzustkowych nie stwierdzono aktywności wobec żelatyny. Wykazano również aktywność elastazową na poziomie ponad 900 j.a./cm<sup>3</sup> preparatu. Oznaczona aktywność specyficzna ocenianego preparatu enzymatycznego w stosunku do kazeiny kształtowała się na poziomie 684 j.a./cm<sup>3</sup> przy pH = 8,0, a 404 j.a./cm<sup>3</sup> przy pH = 6,0. Blisko dwukrotnie niższą aktywność wykazały białka enzymatyczne preparatu wobec peptydu BApNa, natomiast na wyraźnie niższym poziomie, w granicach 62–69 j.a./cm<sup>3</sup>, kształtowała się ona w stosunku do żelatyny, elastyny Congo Red i Azocollu. Hemoglobina, mimo optymalnego dla proteaz trzustkowych pH prowadzenia analizy, okazała się również opornym substratem.

W dalszej części badań przeprowadzono ocenę aktywności kolagenolitycznej uzyskanego preparatu enzymatycznego z trzustek indyjskich. Zastosowanymi substratami był kolagen rozpuszczalny oraz wołowe ścięgna Achillesa. Podatność tych substratów oceniono na podstawie dynamiki zmian zawartości wolnych grup aminowych i hydroksyproliny w roztworach po przeprowadzonej degradacji surowców. Wyniki oznaczeń zestawiono w tab. 2.

Tabela 2

Aktywność kolagenolityczna preparatu enzymatycznego z trzustek indyjskich.  
Collagenolytic activity of enzymatic preparation from turkey pancreases.

Substrat Substrate	Czas degradacji Time of degradation [h]	Przyrosty wolnej hydroksyproliny Increases in free hydroxyprolin	Przyrosty wolnych grup aminowych Increases in free amine groups
		[µg Hyp/g substratu] [µg Hyp/g substrate]	[µg Gly/g substratu] [µg Gly/g substrate]
Kolagen rozpuszczalny Soluble collagen	2	25,4	185,5
	5	29,2	487,4
	24	35,7	836,8
Wołowe ścięgna Achillesa Achilles tendon from beef	24	11,5	160,0
	48	13,8	195,2
	72	21,2	210,4

Białka wołowych natywnych ścięgien Achillesa były bardziej opornym substratem na działanie proteaz trzustkowych niż zastosowany roztwór kolagenu rozpuszczalnego. Powszechnie znane działanie enzymów trzustkowych [16] na wiązania peptydowe tworzone przez aminokwasy zasadowe i aromatyczne oraz elastazy degradującej wiązania peptydowe niskocząsteczkowych aminokwasów, jak np. glicyna, było wyraźnie efektywniejsze w stosunku do roztworu kolagenu rozpuszczalnego niż wobec białek ścięgien Achillesa. Wydłużanie czasu trwania procesu hydrolizy o kolejną dobę w nieznacznym stopniu intensyfikowały ten proces. Przyrosty wolnych grup aminowych i hydroksyproliny kształtowały się tylko na nieznacznie wyższym poziomie w stosunku do okresu poprzedniego i po 72 h prowadzenia procesu był on na poziomie dużo niższym niż w wyniku degradacji kolagenu rozpuszczalnego po 24 h. Obserwowany przyrost ilości hydroksyproliny utrzymywał się przez 72 h prowadzenia procesu na poziomie 20% w stosunku do poprzedniej doby, natomiast ilość oznaczanej glicyny przyrastała o 20% po 48 h hydrolizy, a po 72 h tylko o 10%.

Proteoliza kolagenu rozpuszczalnego była bardziej widoczna w pomiarze przyrostu grup aminowych niż hydroksyproliny w roztworze. Stopień degradacji tego białka po 2 h prowadzenia hydrolizy wyrażał się przyrostem wolnych grup aminowych na poziomie 185  $\mu\text{g Gly/g}$  substratu i ponad 25  $\mu\text{g Hyp}$ . Wydłużenie procesu o 3 h spowodowało ponad 2,5-krotny przyrost grup aminowych oraz niespełna 20% przyrost uwalnianej hydroksyproliny. Dwudziestoczęterogodzinna hydroliza tego substratu nie była już tak efektywna i poziom przyrostu hydroksyproliny był podobny do obserwowanego między 2. a 5. h, zaś przyrost grup aminowych był prawie dwukrotnie wyższy w stosunku do poprzednio ocenianego okresu.

Ostatnim etapem badań, dotyczących oceny właściwości proteolitycznych preparatu enzymatycznego uzyskanego z trzustek indyjskich, było określenie efektywności degradacji skór wieprzowych poddanych różnym wariantom hydrolizy enzymatycznej połączonej z kwasową. Analizę wyników przeprowadzono w oparciu o przyrosty zawartości wolnej hydroksyproliny, białka i wolnych grup aminowych w roztworach (tab. 3) oraz zmiany podstawowego składu chemicznego skór po hydrolizie (rys. 1).

Analiza statystyczna potwierdziła istotność wpływu rozdrobnienia skór na ich degradację, co znalazło odzwierciedlenie w wynikach oznaczeń wszystkich ocenianych parametrów. Przyrosty zawartości hydroksyproliny, białka i wolnych grup aminowych w roztworach po hydrolizie skór, w przypadku surowca rozdrobnionego w wilku laboratoryjnym, były ponad dwukrotnie większe po 8 h hydrolizy enzymatycznej w stosunku do surowca pociętego w paski. Przedłużenie prowadzenia procesu w warunkach hydrolizy kwasowej wpłynęło na dalszą degradację skór i było również

czynnikiem istotnie intensyfikującym ten proces. Ponadto stwierdzono istotny wpływ temperatury prowadzenia hydrolizy kwasowej na jej intensywność. Zawartość hydroksyproliny w roztworach po hydrolizie skór w postaci pasków (warianty B i C) była istotnie mniejsza w porównaniu z surowcem o większym rozdrobnieniu. Hydroliza kwasowa prowadzona w temp. 4°C przez 48 h doprowadziła do uwolnienia zbliżonej zawartości tego aminokwasu jaki oznaczono po 8 h prowadzenia procesu enzymatycznego skór rozdrobnionych w wilku laboratoryjnym.

Tabela 3

Zawartość białka, hydroksyproliny i wolnych grup aminowych w roztworach po hydrolizie.  
Contents of protein, hydroksyprolin, and free amino groups in the solutions after hydrolysis.

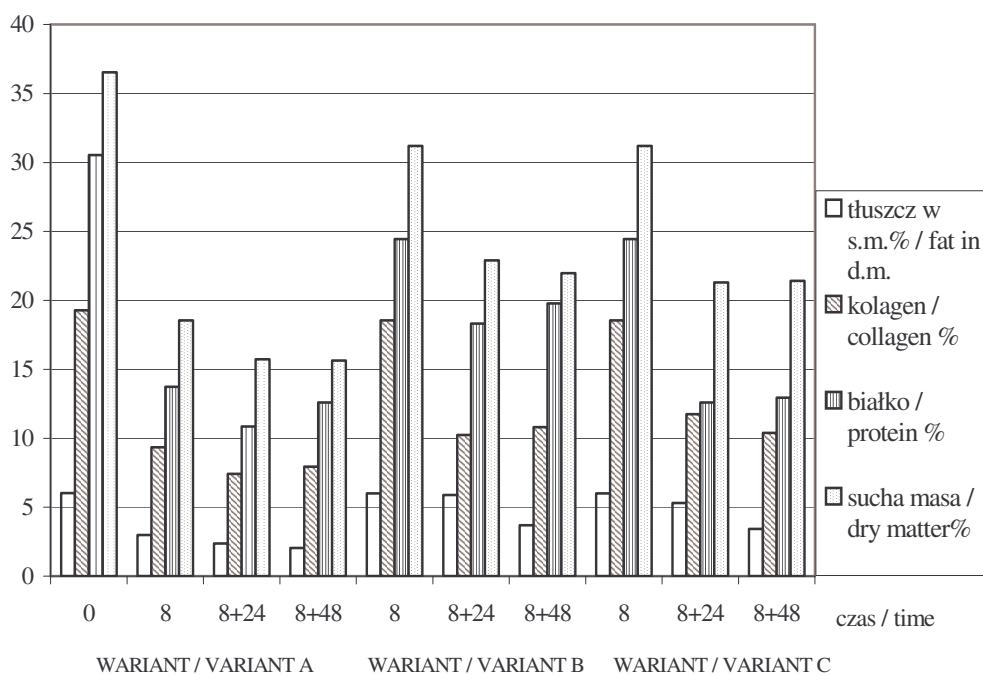
Wariant hydrolizy Variant of hydrolysis	Parametry procesu Parameters of process				Przyrosty wolnej Hyp Increases in free Hyp	Przyrosty białka Increases protein	Przyrosty wolnych grup aminowych Increases in free amino groups
	Rozdrobnienie Comminuted to..	Temp. [°C]	pH	Czas Time [h]	[µg Hyp/g] substratu substrate	[%] substratu substrate	[µg Gly/g] substratu substrate
A	ϕ 3mm	20		0	0,00 <sup>A*</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>
		20	7,0	8	8,97 <sup>E</sup>	0,98 <sup>D</sup>	24,33 <sup>E</sup>
		4	3,2	24	13,06 <sup>F</sup>	1,58 <sup>F</sup>	32,05 <sup>F</sup>
		4	3,2	48	15,42 <sup>G</sup>	1,91 <sup>G</sup>	35,83 <sup>G</sup>
B	0,5 × 3 cm	20		0	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>
		20	7,0	8	3,91 <sup>B</sup>	0,42 <sup>B</sup>	10,09 <sup>B</sup>
		4	3,2	24	7,48 <sup>D</sup>	0,89 <sup>C</sup>	16,21 <sup>C</sup>
		4	3,2	48	9,55 <sup>E</sup>	0,98 <sup>D</sup>	18,56 <sup>D</sup>
C	0,5 × 3 cm	20		0	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>
		20	7,0	8	3,91 <sup>B</sup>	0,42 <sup>B</sup>	10,09 <sup>B</sup>
		20	3,2	24	6,56 <sup>C</sup>	1,30 <sup>E</sup>	24,56 <sup>E</sup>
		20	3,2	48	6,66 <sup>C</sup>	1,60 <sup>F</sup>	26,06 <sup>E</sup>

Wartości średnie w tej samej kolumnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy  $p \leq 0,05$

Mean values in the same column and designated by various letters are significantly different at  $p \leq 0,05$

Podobną dynamikę przyrostu stwierdzono w przypadku oznaczenia wolnych grup aminowych i białka w roztworze. Natomiast w pozostałych porównywanych wariantach doświadczenia ilości hydroksyproliny były istotnie mniejsze. W przypadku pozostałych analizowanych wyróżników (białka i wolnych grup aminowych)

wydłużenie prowadzenia hydrolizy kwasowej pozwoliło nieznacznie zmniejszyć różnicę efektu degradacji skór przy różnym stopniu ich rozdrobnienia, niemniej jednak różnice te były istotne. Na podstawie omówionych wyników oznaczeń należy stwierdzić, że proteoliza skór przebiegała najintensywniej podczas procesu enzymatycznego.



Rys. 1. Skład chemiczny skór po hydrolizie

Fig. 1. Chemical contents of skins after hydrolysis.

W surowcu doświadczalnym przeprowadzono analizę podstawowego składu chemicznego i stwierdzono, że charakteryzuje się on wartościami odnośnych parametrów zbliżonymi do danych cytowanych w literaturze [13]. Zawartość białka kształtowała się na poziomie 30,54%, przy czym oznaczono 19,27% kolagenu, przy zawartości suchej masy 36,53% i tłuszczu 6,02%. Analiza składu chemicznego skór wieprzowych po procesie hydrolizy (rys. 1) potwierdziła omówione wyżej wyniki dotyczące stopnia degradacji w zależności od zastosowanych czynników zmienności. Największy wpływ na zmiany zawartości białka i kolagenu miał stopień rozdrobnienia surowca, a mniejszy czas i temperatura prowadzenia procesu. Z pewnością na efektywność ekstrakcji białka i rozpuszczalnych frakcji kolagenu skór wieprzowych

miał również wpływ bufor cytrynianowo-fosforanowy zastosowany w procesie hydrolizy. Źródła literaturowe podają, że zastosowanie kwasów i buforów o pH około 3,5 pozwala na uzyskanie kolagenu rozpuszczalnego zdolnego do rekonstrukcji. W buforze fosforanowym rozpuszcza się tylko młody tropokolagen, natomiast bufor cytrynianowy degraduje również część kowalencyjnych wiązań sieciujących w kolagenie. Wydajności tych procesów są niewielkie i osiągają poziom do 20% [11, 12, 14]. Skóra zbudowana jest głównie z kolagenu typu I i II, które mają strukturę włóknistą, ale różnią się rozpuszczalnością. Kolagen typu I rozpuszcza się w znacznym stopniu w rozcieńczonych roztworach kwasów i soli, natomiast kolagen typu II jest praktycznie nierozpuszczalny w tych warunkach. Dostępność kolagenu dla niespecyficznym enzymów wyraźnie można poprawić poprzez mechaniczne rozdrobnienie surowca czy też rozluźnienie struktury kolagenu poprzez działanie czynników chemicznych o odpowiedniej sile jonowej [12, 13]. Przedstawione badania potwierdziły również istotny wpływ tych czynników, czyli rozdrobnienia surowca, czasu, temperatury i odczynu środowiska prowadzenia procesu na degradację białek skór wieprzowych.

### **Wnioski**

1. Przeprowadzone badania wykazały, że preparat enzymatyczny z trzustek indyjskich charakteryzuje się najwyższą aktywnością proteolityczną wobec kazeiny.
2. Proteazy trzustkowe również wykazywały aktywność w stosunku do substratów kolagenowych.
3. Hydroliza enzymatyczna skór wieprzowych prowadzona w środowisku o pH = 7,0 charakteryzowała się kilkakrotnie większą wydajnością niż hydroliza kwasowa w pH = 3,2.
4. Stopień rozdrobnienia doświadczalnego surowca miał istotny wpływ na poziom degradacji jego białek.
5. Wydłużenie czasu prowadzenia procesu degradacji kwasowej skór wpływało na zwiększenie ilości uwalnianych związków azotowych, w tym również hydroksyproliny.

*Praca została wykonana w ramach grantu KBN 5 P06G 028 19*

### **Literatura**

- [1] A.O.A.C.: Official methods of analysis. 15<sup>th</sup> Ed. 1<sup>st</sup> Supplement. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. 1990, 36-37.



- [2] Bichodka M.J., Khachatourians G.G.: Purification and properties of an extracellular protease produced by enthomopathogenic fungi. *Appl. Environ Microbiol.*, 1987, **7**, 1679-1684.
- [3] Frokjaer S.: Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.*, 1994, **10**, 86-88.
- [4] Kalinowska H., Bielecki S., Turkiewicz M.: Enzymy nowej generacji w produkcji żywności . Cz. I. *Przem. Spoż.* 2000, **10**, 3-5.
- [5] Kijowski J.: Muscle proteins. In: *Chemical and functional properties of food proteins*. Ed. Z. E. Sikorski, Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, 2001, pp. 233-269.
- [6] Krasnowska G.: Kolagen – właściwości i znaczenie technologiczne. *Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu*, 1998, **328**, 137 –146.
- [7] Kuchroo C.V., Ramilly I.P., Fox P.F.: Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzenesulphonic acid. *J. Food Technol.*, 1983, **7**, 129-133.
- [8] Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K.: Cuticle-degradation enzymes of enthomopatogenic fungi. Cuticle degradation in vitro by enzymes from enthomopathogen. *J. Invertebr. Pathol.*, 1986, **47**, 167-177.
- [9] Mejbbaum-Katzenellenbogen W., Mochnacka I.: *Kurs praktyczny biochemii*. PWN, Warszawa 1968.
- [10] Morihara K., Tszuzuki H.: Elastolytic properties of various proteinases from microbiol origin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, **120**, 68-78.
- [11] Nagai T., Suzuki N.: Isolation of collagen from fish waste material – skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 2000, **68**, 277-281
- [12] Powell T.H., Hunt M.C., Dickeman M.E.: Enzymatic assay to determine collagen thermal denaturation and solubilization. *Meat Sci.*, 2000, **54**, 307-311.
- [13] Sadowska M., Kotłowski R.: Fizykochemiczne właściwości kolagenu ryb, świń i bydła. W: *Żelatyna. Właściwości, technologia, użytkowanie*. Polska Izba Dodatków do Żywności, Konin 1999, s. 13-25.
- [14] Sikorski Z.E.: Charakterystyka białek głównych surowców żywnościowych. W: *Chemia żywności - pod red. Z. E. Sikorskiego*, WNT, Warszawa 2002, s. 304-333.
- [15] Snyder S.L., Sobociński P.Z.: An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid method for determination of amines. *Analys. Bioch.*, 1975, **64**, 285-288.
- [16] Styer L.: *Biochemia*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 2003.
- [17] Tuścik F., Polanowski A., Guyonnet V., Long P.L.: Affinity purification of chicken pancreas proteinases and their N-terminal amino acid sequences. *Acta Bioch. Pol.*, 1994, 174-177.
- [18] Warchalewski J.R.: Zastosowanie enzymów w produkcji żywności na przełomie wieków. *Przem. Spoż.*, 2001, **8**, 40-44.

#### THE USE OF PANCREAS PROTEASES FOR THE DEGRADATION OF ANIMAL PRODUCTS RICH IN CONNECTIVE TISSUE

##### S u m m a r y

The study presents the proteolytic qualities of an enzymatic preparation obtained from turkey pancreas and the usefulness of enzymes for the degradation of pigskins. Enzymatic hydrolysis of the material was carried out at pH = 7.0, and, then, acid hydrolysis was conducted at pH = 3.2. The results indicated a high proteolytic activity of pancreas proteases towards the casein. Their activity towards collagen substrates was also observed. The efficiency of enzymatic hydrolysis of pigskins, expressed by the amount of freed hydroxyproline, free amine groups and protein, was several times higher than the efficiency of acid hydrolysis. Moreover, the proper selection of the process conditions (temperature, pH and material

comminuting) significantly increases its efficiency. It may be concluded that the enzymes from turkey pancreas are characterized by a high proteolytic activity towards proteins from pigskins.

**Key words:** proteolytic enzymes, collagenolytic activity, turkey pancreas, pigskins ✕