

THÔNG BÁO KHOA HỌC

**NGHIÊN CỨU THỦY PHÂN DA CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)
BẰNG GELATINASE TÁI TỔ HỢP**

***STUDY ON HYDROLYSING CATFISH SKIN (*Pangasianodon hypophthalmus*)
BY RECOMBINANT GELATINASE***

Phạm Mỹ Dung¹, Phạm Thị Tâm², Phạm Công Hoạt³, Lê Huy Hàm⁴

Ngày nhận bài: 7/10/2017; Ngày phân biên thông qua: 18/12/2017; Ngày duyệt đăng: 29/12/2017

TÓM TẮT

Để thủy phân gelatin từ da cá Tra có thể sử dụng nhiều phương pháp như sử dụng axit, kiềm, enzyme. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng enzyme gelatinase tái tổ hợp để thủy phân gelatin từ da cá Tra. Quá trình trích ly gelatin được tiến hành bằng cách sử dụng các dung dịch axit hữu cơ để làm trương da cá: axit lactic 50mM, axit lactic 25mM và axit amin acetic 50mM. Sau đó sẽ tiến hành trích ly gelatin trong nước cất ở 45°C trong 10 giờ. Tiếp đến lấy 1000ml cơ chất gelatin có nồng độ 30% để thủy phân bằng gelatinase tái tổ hợp ở nồng độ gelatinase thích hợp 75 UI trong thời gian 12 giờ, ở nhiệt độ 50°C, pH=7. Kết quả phân tích thành phần axit amin trong sản phẩm thủy phân gelatin từ da cá tra có hàm lượng axit amin tổng số là 49,37 g/100 g sản phẩm, trong đó tổng số axit amin thiết yếu là 16,63 g/100 g sản phẩm, chiếm 33,7% tổng lượng axit amin. Axit amin không thiết yếu là 32,74g/ 100g sản phẩm, chiếm 66,3% tổng lượng axit amin. Trong đó, các axit amin có hàm lượng cao là glycine, proline và hydroproline.

Từ khóa: axit amin, da cá Tra, gelatin, gelatinase, thủy phân.

ABSTRACT

To hydrolyse gelatine obtained from catfish skin can use many methods such as using acid, alkaline, enzyme. In this study we used recombinant gelatinase to hydrolyse the gelatine obtained from catfish skin. Gelatine extraction was performed using organic acid solutions for lichen skin: 50mM lactic acid, 25mM lactic acid and 50mM acetic acid. Gelatine is then extracted in distilled water at 45°C for 10 hours. Next, take 1000ml gelatine has concentration is 30 percents and using recombinant gelatinase to hydrolyse at the suitable gelatinase concentration of 75 UI for 12 hours at the temperature of 50°C, pH=7. Analysis of amino acids in product of gelatine hydrolysis from catfish skin obtained had the total amino acid content of 49.37 g/100 g of product, of which the total essential amino acids were 16.63 g/100 g of product, accounting for 33.7% total amount of amino acids. Non-essential amino acids are 32.74 g/100 g of product, accounting for 66.3% of total amino acids. In particular, high levels of amino acids are glycine, proline and hydroproline.

Keywords: amino acid, catfish skin, gelatine, gelatinase, hydrolysis.

¹ Khoa Nông Lâm Ngư, Trường Đại học Vinh

² Khoa Công nghệ Sinh học, Viện Đại học Mở Hà Nội

³ Bộ Khoa học và Công nghệ

⁴ Viện Di truyền Nông nghiệp

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở nước ta, sản lượng cá tra, ước đạt 1.150 nghìn tấn, giảm 5,6% so với năm 2015, sản lượng cá tra của các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long chiếm 99,2% sản lượng của cả nước, ước đạt 1.189 nghìn tấn tăng 4,2% so với năm 2015, trong đó Đồng Tháp đạt 403,4 nghìn tấn, An Giang đạt 280,5 ngàn tấn. Từ tổng sản lượng cá tra nguyên liệu như vậy, sản phẩm xuất khẩu là cá phi lê chỉ chiếm khoảng 35%, nguyên liệu còn lại chiếm 65% (da, mỡ, xương, vây, đầu). Do đó, việc tận dụng nguyên liệu còn lại của các nhà máy chế biến để tạo ra các sản phẩm hữu ích sẽ góp phần nâng cao hiệu quả sử dụng nguyên liệu, giảm ô nhiễm môi trường, giảm giá thành cho sản phẩm chính, nâng cao được hiệu quả sản xuất kinh doanh và tăng thêm năng lực cạnh tranh cho doanh nghiệp chế biến cá tra.

Từ collagen trong da cá, theo nghiên cứu của tác giả Trần Thanh Nhân, 2009, hiệu suất chiết tách gelatin từ da cá tra đạt 16%, nguồn gelatin này đạt các tiêu chuẩn dược điển Việt Nam III, hoàn toàn an toàn đối với con người và có thể sử dụng trong ngành dược cũng như thực phẩm.

Hiện tại, nhu cầu về axit amin có nguồn gốc từ da cá thủy phân trong nước là rất lớn, các axit amin thủy phân từ da cá đã được ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng có tác dụng bổ sung dinh dưỡng cho trẻ em, người già, phục hồi sức khỏe, chống lão hóa, làm chậm các quá trình oxy hóa. Việc sản xuất axit amin từ da cá Tra để làm thực phẩm chức năng và mỹ phẩm là một vấn đề khả thi và là một hướng đi đúng đắn nhằm khai thác hiệu quả và triệt để hơn nghề nuôi cá Tra vốn đang phát triển rất mạnh mẽ tại Việt Nam.

Hơn thế, hiện nay có một số phương pháp sử dụng để thủy phân gelatin, collagen như sử dụng axit, kiềm, enzyme (Gime'nez B và cộng sự, 2005). Nhưng theo nhiều nghiên cứu cho thấy sử dụng enzyme để thủy phân gelatin hay collagen là hiệu quả và an toàn nhất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Enzyme gelatinase **tái tổ hợp là sản phẩm của đề tài KC06/13-15 (do Khoa Công nghệ sinh học - Viện Đại học Mở cung cấp)**

- Da cá Tra **được thu tại nhà máy chế biến** của công ty cổ phần Vĩnh Nguyên, Khu công nghiệp Trà Nóc, Thành phố Cần Thơ. Mẫu sau khi thu gom được bảo quản trong tủ đông ở nhiệt độ $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ cho đến khi xử lý và phân tích.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp xử lý mẫu da cá Tra

Nhằm tránh gây biến đổi những tính chất của da cá, ngay sau khi chế biến, da cá sẽ được các nhà máy chế biến thủy sản đem đi làm đông và trữ đông ở nhiệt độ $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Chính vì vậy, trong quá trình nghiên cứu, việc đầu tiên phải làm đối với nguyên liệu là da cá tra đó là công đoạn "rã đông, rửa sạch".

Để tăng hiệu quả của quá trình, da cá sau khi được chuyển từ nhà máy chế biến về phòng thí nghiệm dưới dạng đông lạnh sẽ được đem đi tan giá, kết hợp với rửa sạch bằng nước ấm ở nhiệt độ $50^{\circ}\text{C} \div 60^{\circ}\text{C}$, sau đó được để cho khô ráo trước khi tiến hành xử lý ở bước tiếp theo.

Do da cá có kích thước khá lớn, gây trở ngại cho quá trình trích ly gelatine, vì vậy, muốn tăng hiệu quả của quá trình thì mẫu da cá cần được cắt nhỏ đến $0,2 \div 0,5\text{cm}$ /mẫu.

Da cá Tra được ngâm muối ở nồng độ bão hòa. Lượng muối NaCl cho vào trong nước cất để đạt độ bão hòa cần thiết được xác định theo thực nghiệm.

2.2. Phương pháp trích ly gelatin

Quy trình ly trích gelatin từ da cá tra tham khảo theo nghiên cứu của Jongjareonrak và cộng sự (2010). Quá trình trích ly gelatin được tiến hành bằng cách sử dụng các loại dung dịch axit hữu cơ để làm trương da cá: lactic 50mM, lactic 25mM và a acetic 50mM. Sau đó trích ly gelatin trong nước cất ở 45°C trong 10 giờ.

Lọc, cô đặc dung dịch: Sau khi trích ly, thu được dung dịch sệt, tiến hành lọc bằng vải để loại bỏ lớp màng da. Đem dung dịch được lọc qua máy lọc chân không với chất trợ lọc celite để loại bỏ bột tạp chất và mỡ. Cô đặc dung dịch ở nhiệt độ tương ứng trong thời gian 5 ÷ 6 giờ để bay hơi nước tạo điều kiện thuận lợi cho công đoạn sấy.

Dịch lọc được đổ ra khay sấy ở nhiệt độ 60 ÷ 70°C, sản phẩm sấy được nghiền mịn rồi bảo quản nơi thoáng mát. Bột gelatin được lấy làm nguyên liệu cho thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Phương pháp thủy phân gelatin bằng gelatinase tái tổ hợp

2.3.1. Khảo sát tỷ lệ nước

Trong các nghiên cứu trước đã xác định được điều kiện thích hợp cho hoạt tính của gelatinase tái tổ hợp là: nhiệt độ 50°C, pH = 7,0; thủy phân 1000g cơ chất với các tỷ lệ nước khảo sát như sau: 50%, 70%, 100%. Sản phẩm sau thủy phân sẽ được đánh giá bằng sắc ký trao đổi ion để xác định mức độ thủy phân.

2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân gelatin da cá Tra bằng gelatinase

Các nhiệt độ được khảo sát bao gồm: 40 - 45 - 50 - 55 và 60°C. Sản phẩm sau thủy phân sẽ được đánh giá bằng sắc ký trao đổi ion để xác định mức độ thủy phân.

2.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzym đến quá trình thủy phân gelatin da cá Tra bằng gelatinase

* Phương pháp sắc ký trao đổi ion

Dịch thủy phân được kết tủa với axit sulfosalicylic để loại bỏ các chất đồng chiết xuất có phân tử lượng lớn chứa nitơ. Dịch lọc được điều chỉnh pH tới 2,2. Axit amin được tách bằng sắc ký trao đổi ion và xác định bằng phản ứng với ninhydrin sử dụng detector quang đo ở bước sóng 570 nm, bước sóng 440 nm đối với prolin. Cân chính xác đến 0,2 mg một lượng phù hợp (1 g đến 5 g) mẫu thử vào bình nón và thêm 100,0 ml của hỗn hợp dịch chiết (0,1 mol/l HCl chứa 2 % thiodiglycol). Lắc đều trong 60

Lượng enzyme khảo sát cho 1000 ml gelatin 30% gồm: 25 - 50 - 75 - 100 và 125 UI. Sản phẩm sau thủy phân sẽ được đánh giá bằng sắc ký trao đổi ion để xác định mức độ thủy phân.

2.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân gelatin da cá Tra bằng gelatinase

Thời gian thủy phân được khảo sát: 2 - 6 - 8 - 12 và 24 giờ. Sản phẩm sau thủy phân sẽ được đánh giá bằng sắc ký trao đổi ion để xác định mức độ thủy phân.

2.3.5. Khảo sát ảnh hưởng của độ pH đến quá trình thủy phân gelatin da cá Tra bằng gelatinase

Độ pH được khảo sát gồm: 6,5 - 7,0 - 7,5 và 8,0. Sản phẩm sau thủy phân sẽ được đánh giá bằng sắc ký trao đổi ion để xác định mức độ thủy phân.

2.4. Phương pháp phân tích

* Phương pháp xác định mức độ thủy phân

Hiệu suất thủy phân (DH- Degree of hydrolysis) được xác định theo phương pháp của Hoyle and Merritt (1994). 20 ml protein thủy phân được bổ sung 20ml trichloroacetic axit (TCA) để tạo dung dịch đậm chứa 10% TCA. Giữ hỗn hợp trong 30 phút cho quá trình kết tủa rồi ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi được phân tích theo phương pháp Kjeldahl (AOAC, 2000). Mức độ thủy phân được tính theo công thức:

$$DH (\%) = \frac{\text{Đạm hòa tan trong mẫu chứa 10\% CTA}}{\text{Nito tổng trong mẫu}} \times 100\%$$

phút sử dụng máy lắc hoặc máy khuấy từ. Để cho lắng cặn rồi dùng pipet hút 10,0 ml dung dịch phía trên cho vào cốc có mỏ 100 ml. Thêm 5,0 ml dung dịch axit sulfosalicylic 6%, trong khi dịch vẫn đang khuấy và tiếp tục khuấy bằng máy khuấy từ trong 5 phút. Lọc hoặc ly tâm phần nổi phía trên để loại bỏ kết tủa. Lấy 10,0 ml dung dịch vào cốc 100 ml, điều chỉnh pH tới 2,20 bằng dung dịch NaOH 1 mol/l. Chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức, tráng rửa bằng đệm citrat (Na⁺ 0,2 mol/l, pH=2,2) và định mức đến vạch bằng dung dịch đệm.

Nếu sử dụng chất nội chuẩn, thêm 1,00 ml dung dịch nội chuẩn cho mỗi 100 ml dịch cuối và định mức đến vạch bằng dung dịch đệm citrate (Na⁺ 0,2 mol/l, pH=2,2).

Diện tích pic của mẫu và chất chuẩn được đo cho mỗi axit amin và lượng mẫu được tính theo gam axit amin /kilogram mẫu, được tính theo công thức:

$$w = \frac{A_e \times c \times M \times V_e}{A_c \times m \times 1000}$$

Trong đó

A_e là diện tích pic của chất thủy phân hoặc chất chiết (mm x mm)

A_c là diện tích pic của dung dịch chuẩn hiệu chuẩn (mm x mm);

M là khối lượng phân tử của axit amin được xác định (μg)

C là nồng độ của chất chuẩn, μmol/ml;

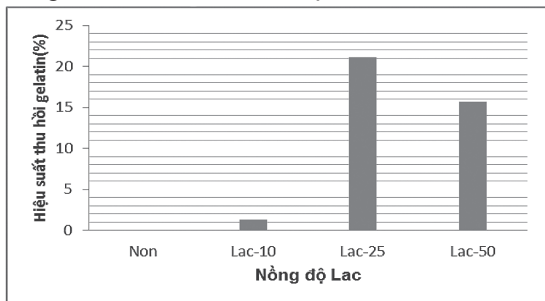
V_e là thể tích của tổng dịch thủy phân, ml, được tính theo tổng thể tích pha loãng của dịch chiết; m là khối lượng mẫu, g, tính về khối lượng ban đầu nếu mẫu được làm khô hoặc loại chất béo.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả tách chiết gelatin từ da cá Tra

Trong điều kiện nhiệt độ xử lý là 40°C, sử dụng axit lactic để trích ly gelatin trong thời gian 10 giờ, hiệu suất của quá trình tách chiết gelatin được thể hiện trong Hình 1.

Từ kết quả ở Hình 1 cho thấy hiệu suất thu hồi gelatin trong các dung dịch axit lactic 10 mM, 25 mM và 50mM đạt tương ứng là 1,3%, 21,1% và 15,7%. Quá trình thủy phân không xảy ra trong trường hợp không sử dụng axit lactic. Kết quả này cho thấy, nhất thiết phải sử dụng axit lactic để xử lý da cá trước khi trích ly gelatin và nồng độ axit lactic thích hợp là 25 mM.

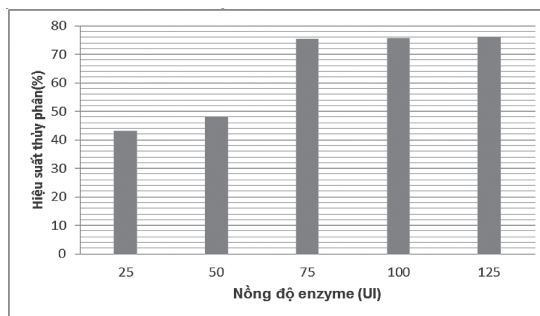


Hình 1. Hiệu suất tách chiết gelatin theo nồng độ axit lactic (LAC-10, LAC-25, LAC-50: nồng độ axit lactic đạt 10, 25, 50 mM; Non-lac: Không xử lý bằng axit lactic)

2. Kết quả xác định các điều kiện thủy phân gelatin da cá Tra bằng gelatinase tái tổ hợp

* Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến quá trình thủy phân

Hiệu suất thủy phân của enzyme không tăng tỷ lệ thuận với nồng độ enzyme (Roman Buckow, 2006). Kết quả trong Hình 2 cho thấy: hiệu suất thủy phân tăng chậm khi tăng nồng độ enzyme từ 25 UI lên 50 UI. Tuy nhiên, hiệu suất thủy phân tăng nhanh và đạt cao nhất ở nồng độ 75 UI gelatinase, đạt 76,12%. Khi tăng nồng độ enzyme lên đến 100 UI và 125 UI thì hiệu suất thủy phân tăng không đáng kể, chỉ đạt 75,79% và 76,12%. Kết quả này cho thấy, nồng độ 75 UI là phù hợp để thủy phân 1000ml cơ chất gelatin có nồng độ 30%, đây cũng chính là nồng độ bão hòa của enzyme.



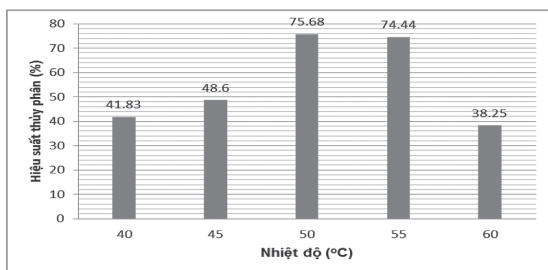
Hình 2. Hiệu quả thủy phân gelatin ở các nồng độ gelatinase khác nhau

* Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân

Gelatin là protein đòi hỏi có sự gia nhiệt trong quá trình thủy phân, tùy thuộc vào nguồn gốc trích ly mà mỗi loại gelatin có nhiệt độ nóng chảy khác nhau. Theo Grossman và Bergmen, 1992, gelatin có nguồn gốc từ cá có thành phần axit amin thấp hơn gelatin ở động vật có vú, đồng thời do hàm lượng các axit imino (proline và hydroxyproline) thấp. Vì vậy, mặc dù có độ nhớt cao nhưng nhiệt độ nóng chảy của gelatin cá luôn thấp hơn.

Trong thí nghiệm này, quá trình thủy phân da cá tra được thực hiện trong điều kiện bổ sung gelatinase và gia nhiệt ở các nhiệt độ từ 40 đến 60°C. Kết quả thí nghiệm trong hình 3 cho thấy khoảng nhiệt độ 50 ÷ 55°C cho hiệu quả

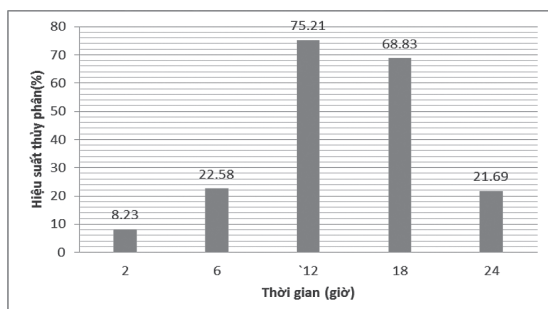
thủy phân cao nhất, đạt 75,68% và 74,54%. Lý giải cho kết quả này có thể do 2 nguyên nhân, bao gồm nhiệt độ thích hợp cho hoạt động của enzyme và nhiệt độ nóng chảy của gelatin. Ở điều kiện gia nhiệt $40 \div 45^\circ\text{C}$, quá trình nóng chảy của gelatin chưa xảy ra hoàn toàn, cùng với hoạt tính của gelatinase bị hạn chế vì vậy quá trình thủy phân xảy ra không hoàn toàn, hiệu suất chỉ đạt $41,83 \div 48,60\%$. Trong điều kiện nhiệt độ 60°C , enzyme bị giảm hoạt tính, đồng thời có hiện tượng biến tính gelatin, vì vậy hiệu suất thủy phân thấp, đạt 38,25%.



Hình 3. Hiệu suất thủy phân gelatin bằng gelatinase ở các mức nhiệt độ khác nhau

* *Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân*

Hiệu suất thủy phân tăng dần từ 2 giờ đến 12 giờ và đạt giá trị cao nhất (75,21%) sau đó giảm nhẹ trong 6 giờ tiếp theo. Sau 24 giờ, hiệu suất thủy phân giảm mạnh, đạt 21,69%. Gelatinase hoạt động mạnh nhất ở điều kiện pH=7 ở 50°C trong 12 giờ, như vậy, kết quả của thí nghiệm ứng dụng enzyme này trong thủy phân gelatin tách chiết từ da cá tra là phù hợp với đặc tính của gelatinase.



Hình 4. Hiệu suất thủy phân gelatin bằng gelatinase ở các mức thời gian thủy phân

* *Phân tích thành phần axit amin của sản phẩm thủy phân từ gelatin da cá Tra*

Kết quả phân tích thành phần axit amin của sản phẩm thủy phân từ gelatin da cá Tra theo phương pháp dùng enzyme gelatinase trong bảng 1 cho thấy: Hàm lượng axit amin tổng số là 49,37 g/100 g sản phẩm, trong đó tổng số axit amin thiết yếu là 13,69 g/100 g sản phẩm, chiếm 27,73% tổng lượng axit amin. Axit amin không thiết yếu là 35,68g/ 100g sản phẩm, chiếm 72,27% tổng lượng axit amin. Trong đó, axit amin không thiết yếu lượng cao là glycine, proline và hydroproline.

Bảng 1. Thành phần axit amin của sản phẩm thủy phân từ gelatin da cá Tra

Thành phần axit amin	Số g axit amin trong 100 g gelatin da cá Tra	Tổng số %
Histidin	2,94	
Isoleucine	1,87	
Leucine	2,15	
Lysin	1,32	
Methionine	3,22	
Phenylalanine	2,67	
Threonine	2,46	
Tổng số a.a thiết yếu	16,63	33,7
Glycine	14,65	
Proline	9,28	
Hydroproline	6,27	
Tyrosine	1,13	
Arginine	1,41	
Tổng số a.a không thiết yếu	32,74	66,3
Tổng a.a	49,37	100

Theo Grossman và cộng sự (1992) gelatin thu từ cá có hàm lượng axit amin thấp hơn collagen thu từ động vật có vú. Hàm lượng proline và hydroxyproline trong gelatin thu từ động vật có vú đạt khoảng 30%, từ cá nước ấm đạt 22 25% và 17% cho gelatin từ cá nước lạnh (Muyonga và cộng sự, 2004). Nghiên cứu của Avena-Bustillos và cộng sự (2006)

cũng có phát hiện tương tự rằng gelatin thu từ da cá nước lạnh có ít đáng kể các gốc hydroxyproline, proline, valine và leucine hơn gelatin thu từ động vật có vú nhưng lại nhiều hơn glycine, serine, threonine, aspartic, methionine và histidine. Tuy nhiên, cả gelatin thu từ da cá nước lạnh và động vật có vú đều có tỷ lệ như nhau về các gốc alanine, glutamic, cysteine, isoleucine, tyrosine, phenylalanine, homocysteine, hydroxylysine, lysine và arginine.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

- Điều kiện tách gelatin từ da cá Tra: Dùng axit lactic để xử lý da cá trước khi trích ly gelatin, nồng độ thích hợp là 25 mM.

- Điều kiện thủy phân gelatin da cá Tra bằng enzyme gelatinase tái tổ hợp là: nhiệt độ 50°C; pH=7,0; thời gian 12 giờ; nồng độ enzyme là 75 UI.

- Sản phẩm thủy phân từ gelatin da cá Tra theo phương pháp thủy phân bằng enzyme gelatinase tái tổ hợp có hàm lượng axit amin tổng số là 49,37 g/100 g sản phẩm. Trong đó tổng số axit amin thiết yếu là 16,63 g/100 g sản phẩm, chiếm 33,7% tổng lượng axit amin và axit amin không thiết yếu là 32,74 g/ 100g sản phẩm, chiếm 66,3% tổng lượng axit amin.

2. Kiến nghị

Cần tiếp tục nghiên cứu triển khai sản xuất sản phẩm axit amin tinh sạch từ nguyên liệu còn lại trong chế biến cá tra để nâng cao hiệu quả chế biến loại thủy sản này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Trần Thanh Nhân, 2009. Tối ưu hóa quy trình sản xuất gelatin từ da cá tra nhờ công nghệ enzyme. Tạp chí Nghiên cứu y học, phụ bản số 2.
2. Nguyễn Đỗ Quỳnh, Nguyễn Lê Anh Đào, 2015. Nghiên cứu sản xuất gelatin từ da cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) theo quy trình mới. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học: 40 (1), p47-52.

Tiếng Anh

3. Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C. W., Chiou, B., Yee, E., Bechtel, P. J., & McHugh, T. H. , 2006. Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. Journal of Food Science, 71, E202–E207.
4. Buckow, R., 2006. Pressure And Temperature Effects On The Enzymatic Conversion Of Biopolymers. PhD Thesis. Department Of Food Process Engineering And Food Biotechnology. Berlin, The Berlin University Of Technology.
5. Giménez B., Turnay J., Lizarbe M.A, Montero P., Go´mez-Guillén M.C., 2005. Use of lactic a xít for extraction of fish skin gelatin. Food Hydrocolloids 19, p941–950.
6. Grossman S., Bergman M., 1992. Process for the production of gelatin from fish skin. United States Patent No. 5,093,474.
7. Muyonga J.H., C.G.B. Cole, K.G. Duodu, 2004. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. Food Hydrocolloids 18, p581–592.