



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00169**

(22) Data de depozit: **18/03/2019**

(41) Data publicării cererii:
29/05/2020 BOPI nr. **5/2020**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **UNIVERSITATEA OVIDIUS DIN
CONSTANȚA, BULEVARDUL MAMAIA,
NR.124, CONSTANȚA, CT, RO**

(72) Inventatori:
• **MOLDOVAN LUCIA,
BD. CONSTRUCTORILOR NR.24, BL.19,
SC.A, ET.2, AP.13, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GASPAR- PINTILIESCU ALEXANDRA,
ȘOS.COLENTINA, NR.55, BLOC.83, SC.1,
AP.17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **CRĂCIUNESCU OANA,
BD.NICOLAE GRIGORESCU NR.33, BL.A 1,
SC.3, AP.33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **ȘTEFAN LAURA MIHAELA,
STR. DEALUL ȚUGULEA NR. 54, BL. B9,
SC. A, AP. 26, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **STANCIUC ANA MARIA,
STR.NIȚU VASILE, NR.66, BLOC 25, SC.2,
AP.52, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **COROIU VIORICA, STR.DEALUL
ȚUGULEA NR.46-50, BL.12, SC.B, AP.50,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NEGREANU-PÎRJOL TICUȚA,
STR.SUCEAVA, NR.12, BL.V4, SC.C, AP.48,
CONSTANȚA, CT, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A GELATINEI CU PROPRIETĂȚI
BIOACTIVE DIN GASTEROPODE MARINE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a gelatinei din gasteropode marine cu proprietăți bioactive cu utilizări în industria farmaceutică. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de pretratament al țesutului moale de rapane pentru îndepărtarea materialelor aderente și a contaminațiilor necolagenici, extracția gelatinei prin tratament chimic cu 1...5% acid organic, pH soluție 3...4, timp de extracție de 24...48 h, cu agitare, respectiv enzimatic, cu 1...3% soluție de acid acetic sau acid citric, în care s-a dizolvat pepsină, în

raport masic pepsină:țesut uscat de 1:10...1:30, cu agitare, timp de 24...72 h, la temperatura de 20...25°C, după care soluțiile de gelatină sunt supuse purificării, rezultând gelatină condiționată fie sub formă de pulbere sau folie spongioasă, solubile în apă, având un conținut ridicat de proteine de peste 80% și scăzut în glucide, sub 8%, respectiv lipide, sub 2%.

Revendicări: 3



PROCEDEU DE OBTINERE A GELATINEI CU PROPRIETĂȚI BIOACTIVE DIN GASTEROPODE MARINE

Autori: Lucia Moldovan, Alexandra Gaspar-Pintiliescu, Oana Crăciunescu, Laura Mihaela Ștefan, Ana-Maria Stanciuc, Viorica Coroiu, Ticuța Negreanu-Pîrjol

Prezenta propunere de invenție se referă la un procedeu de obținere a gelatinei cu proprietăți bioactive din gasteropode marine, având utilizări în industria farmaceutică și cosmetică. Gelatina, conform prezentei propuneri de invenție, condiționată sub formă de pulbere sau folii spongioase, prezintă un conținut ridicat în proteină (peste 80%) și scăzut în lipide (sub 2%) și glucide (sub 8%), un grad ridicat de biocompatibilitate, proprietăți de proliferare și aderență a celulelor fibroblaste și keratinocite în cultură și nu produce iritarea sau inflamarea pielii.

În ultimii ani, există un interes crescut pentru fabricarea colagenului și a formei sale denaturate - gelatina, datorită proprietăților lor structurale și funcționale adecvate pentru utilizarea pe scară largă în biomedicină, cosmetică și industria farmaceutică. În acest context, interesul crescut pentru obținerea proteinelor colagenice prin valorificarea superioară a resurselor este un motiv principal de explorare a diferitelor specii marine (**Gomez-Guillen și colab., *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(8):1813-1827; Silva și colab., *Marine Drugs*, 2014, 12(12):5881-5901**). În plus, restricționarea fabricării colagenilor din surse animale terestre datorită unor boli, precum: encefalopatia spongiformă a bovinelor, reacții alergice și boli autoimune date de țesuturile animale, a necesitat căutarea de alternative și surse sigure pentru obținerea acestor proteine. Un număr mare de specii marine (pești, alge, bureți, etc) cu caracteristici intrinseci diferite sunt de interes științific și industrial, necesitând optimizarea condițiilor și randamentelor de extracție a proteinelor colagenice, cu proprietăți fizico-chimice și funcționale de interes (**Subhan și colab., *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(8):4703-4707**).

Este cunoscut faptul că sursele marine conțin fracții de proteine, polizaharide, lipide, vitamine, precum și diferite minerale (**Ferraro și colab., *Food Research International*, 2010, 43(9):2221-2233**). Recuperarea componentelor biologice active din surse marine și utilizarea acestora în diferite segmente ale industriei este un domeniu promițător în cercetare-dezvoltare (**Venkatesan și colab., *Marine Drugs*, 2017, 15(5):143**). Extracția acestor componente

valoroase este cuplată cu dezvoltarea de noi tehnologii pentru recuperarea superioară și purificarea acestora.

Au fost descrise unele metode de obținere a gelatinei din piele de la diferite specii de pește marin și una dintre ele s-a bazat pe incubări succesive ale țesutului cu acid sulfuric 0,2% (v/v) și, respectiv, cu acid citric 1,0% (g/v), urmate de tratamentul țesutului cu apă distilată la 45 °C, timp de 18 ore (**Irwandi și colab., *International Food Research Journal*, 2009, 16(3):381-389**). De asemenea, s-a obținut gelatină din piele de biban la diferite temperaturi și timpi de extracție și s-a ajuns la concluzia că cel mai bun randament de extracție și proprietăți fizico-chimice și biochimice le-a prezentat varianta extrasă la 50 °C, timp de 3 ore (**Sinthusamran și colab., *Food Chemistry*, 2014, 152:276-284**).

A fost prezentat în literatura de specialitate și un procedeu de extracție a gelatinei din melc marin (*Hexaplex trunculus*) din care gelatina s-a obținut prin tratare termică la 60 °C, timp de 9 ore, în prezența unei soluții de acid organic diluat (**Zarai și colab., *Process Biochemistry*, 2012, 47(12):1779-1784**). Rezultatele analizelor fizico-chimice și biochimice (compoziție în aminoacizi, electroforeză, spectroscopie FT-IR) au demonstrat calități superioare ale gelatinei extrase din această sursă, comparativ cu alte specii marine.

Brevetul WIPO / PCT cu numărul WO 2015/151030 prezintă o metodă de obținere a unui amestec de colagen și gelatină pentru aplicații biomedicale din patru specii de bureți marini, bazată pe tratarea țesutului cu apă acidifiată cu dioxid de carbon, metodă ce a permis îmbunătățirea randamentului de extracție al proteinelor de interes.

Problema pe care o rezolvă prezenta propunere este valorificarea superioară a biomasei de origine animală din resurse marine, prin obținerea gelatinei cu aplicații farmaceutice și cosmetice dintr-o sursă puțin valorificată până în prezent în acest scop - gasteropodul marin *Rapana sp.* Impactul ecologic al acestui gasteropod în Marea Neagră este unul negativ, deoarece rapana este considerată o specie invazivă atât din cauza înmulțirii rapide, cât și a regimului lor alimentar compus din midii și stridii, ambele specii de moluște fiind extrem de importante în filtrarea apei mării, dar și cu valoare economică.

Se cunoaște că acest gasteropod marin este o sursă bogată de nutrienți de tipul proteinelor, aminoacizilor, acizilor grași, lipidelor, sterolilor și vitaminelor (**Luo și colab., *International Journal of Food Science & Technology*, 2017, 53(2):395-403**). Studii științifice anterioare au evidențiat că din *Rapana venosa* și *Rapana thomasi* se pot obține extracte lipidice bogate în acizi grași nesaturați, extracte proteice cu un conținut mare de aminoacizi esențiali și neesențiali cu proprietăți anti-inflamatoare și regenerative, precum și

raparina, o substanță din clasa glicozaminoglicanilor cu proprietăți anticoagulante asemănătoare heparinei (Badiu și colab., *Protein Journal*, 2010, 29(2):81-92).

Procedeul de preparare al gelatinei din gasteropode marine, conform invenției, constă din trei etape principale: pretratatamentul țesutului pentru îndepărtarea materialelor aderente și a contaminanților necolagenici; extracția gelatinei prin tratament chimic și/sau enzimatic și purificarea acesteia.

I. Pretratatamentul țesutului

Pretratatamentul, conform prezentei invenții, constă în utilizarea pentru extracția gelatinei a unei cantități de 100...500 g țesut moale de rapane, obținută în urma separării mecanice de țesutul dur (cochilii), spălată cu apă pentru îndepărtarea impurităților aderente, la temperatura camerei, timp de 1...2 ore, după care s-au îndepărtat părțile închise la culoare, respectiv ficat, pancreas etc, și apoi țesutul s-a mărunțit mecanic în bucăți de aproximativ 0,2...0,6 cm pentru a facilita accesul agentului de extracție la structura acestuia, s-a spălat apoi țesutul mărunțit cu apă în flux continuu, timp de 1...3 ore și cu 20...50 volume de apă distilată, timp de 20...30 minute la temperatura camerei. Delipidizarea țesutului obținut după spălare s-a realizat prin tratare succesivă cu 4...6 volume acetonă, timp de 5...20 ore și apoi cu 3...5 volume etanol 10...20%, timp de 10...24 ore, la 4 °C. Decalcifierea țesutului obținut după eliminarea lipidelor și spălarea intensă cu apă s-a făcut prin tratare cu 5...10 volume amestec de clorură de amoniu 0,6...1% și acid clorhidric 0,1...1 N, la temperatura camerei, timp de 20...24 ore. În vederea separării componentelor colagenice de cele polizaharidice, țesutul spălat s-a tratat cu 10...15 volume hidroxid de sodiu 0,2...0,5 M, timp de 24 ore, la rece, cu agitare, repetând tratamentul alcalin de 1...2 ori, apoi soluția obținută s-a centrifugat la 3000...5000 rpm, timp de 20...30 minute și s-a recuperat țesutul nedigerat, care a fost spălat de 4...7 ori cu apă distilată în raport 1:20 g/v (țesut:apă) până ce apa de spălare a avut pH-ul neutru.

II. Extracția gelatinei

Extracția acidă. Peste țesutul pretratat, conform etapei I, s-au adăugat 10...20 volume de soluție acid organic 1...5%, ales între acid acetic și acid citric, pH-ul soluției 3,0-4,0, timpul de extracție a fost de 24...48 ore, cu agitare, după care țesutul nedigerat, separat prin centrifugare, s-a supus unei alte extracții în aceleași condiții, supernatantele obținute prin centrifugare după cele 2 extracții s-au reunit și s-au hidrolizat la 50...90 °C, timp de 4...25 ore

folosind o incintă termostată, iar după răcire, soluția de gelatină obținută a fost recuperată prin filtrare.

Extracția enzimatică. Țesutul pretratat, rezultat din etapa I, s-a tratat cu 10...20 volume de soluție de acid acetic sau acid citric 1...3%, în care s-a dizolvat în prealabil pepsină cu activitatea enzimatică de 500...2500 unități/g, în raport de greutate pepsină:țesut uscat de 1:10...1:30, cu agitare la 200...400 rpm, timp de 24...72 ore, la temperatura de 20... 25 °C, apoi s-a separat soluția vâscoasă de resturile de țesut nedigerat prin filtrare și s-a inactivat enzima din soluția separată prin dializă repetată față de 10...20 volume soluție bicarbonat de sodiu 0,02...0,04 M, pH 8...8,8. Precipitatul format la dializă s-a separat prin centrifugare la 5000...8000 rpm, timp de 30...60 minute și s-a dizolvat în 10...50 volume soluție de acid acetic sau acid citric 1...3%, apoi amestecul obținut se hidrolizează la 50...90 °C, timp de 4...25 ore, într-o incintă termostată, iar după răcire soluția de gelatină obținută a fost recuperată prin filtrare.

III. Purificarea

Soluțiile de gelatină obținute prin cele două metode de extracție descrise mai sus s-au precipitat prin adăugare de hidroxid de sodiu 5...10 N până la pH 7,0, apoi dispersia s-a lăsat peste noapte la rece și s-a centrifugat la 4000...7000 rpm, timp de 20...30 minute. Precipitatul format s-a dizolvat în apă distilată, s-a dializat timp de 1...3 zile față de apă distilată și s-a uscat prin încălzire la 40...60 °C într-o incintă termostată cu ventilație sau prin liofilizare rezultând în final gelatina condiționată fie ca pudră alb-gălbuie, fie ca folie spongioasă, ambele fiind solubile în apă, cu un conținut ridicat în proteină (peste 80%), scăzut în glucide (sub 8%) și lipide (sub 2%).

Procedeul de obținere a gelatinei prezintă următoarele avantaje:

- prin utilizarea procedurii propusă, se obține o cantitate mare de gelatină cu proprietăți bioactive având utilizări în industria farmaceutică și cosmetică;
- produsul condiționat sub formă de pulbere alb-gălbuie sau folii spongioase, conform invenției, prezintă un grad ridicat de puritate având un conținut ridicat în proteină (peste 80%), scăzut în glucide (sub 8%) și lipide (sub 2%);
- gelatina obținută conform exemplurilor de mai sus, testată în culturi de linii celulare fibroblaste, este biocompatibilă, stimulând viabilitatea și proliferarea celulelor cultivate în prezența probelor;

- produsul purificat și testat pe un model experimental *in vitro* folosind celule umane specifice pielii, respectiv keratinocite umane, a prezentat un efect de stimulare a metabolismului și aderenței celulare, nu a iritat și nu a indus inflamația acestora;
- procedeul propus realizează o valorificare eficientă și superioară a biomasei marine de origine animală, precum și a subproduselor rezultate în urma procesării organismelor marine;
- procedeul este fezabil, reactivii de extracție utilizați sunt relativ ieftini și nu necesită echipamente cu grad ridicat de complexitate.

Prezenta propunere de invenție se evidențiază prin următoarele exemple:

Exemplul 1

Pretratamentul țesutului

Se ia o cantitate de 200 g țesut moale de *Rapana sp.*, obținută după separarea mecanică de cochilii, se spală cu apă rece timp de 2 ore, se îndepărtează țesuturile închise la culoare, respectiv ficat, pancreas și se mărunțește mecanic în bucăți de 0,2 cm. Se spală țesutul mărunțit cu apă rece în flux continuu 1 oră și apoi cu 1000 ml apă distilată, timp de 20 min. Pentru delipidizare, bucățile de țesut spălate se introduc într-un vas de laborator prevăzut cu agitare, peste care se adaugă 800 ml acetonă, se agită timp de 10 ore, apoi se elimină soluția acetonică prin filtrare și apoi țesutul se tratează cu 700 ml etanol 20%, timp de încă 10 ore. Țesutul delipidizat se separă prin filtrare, apoi se spală cu apă distilată rece și se decalcificiază prin tratare cu 1500 ml amestec de clorură de amoniu 0,6% și acid clorhidric 0,5 N, timp de 20 ore, la temperatura camerei. Într-un alt vas de sticlă, se introduce țesutul decalcificat și peste el se adaugă 2000 ml soluție NaOH 0,5 M și se agită la temperatura camerei, timp de 24 ore. După repetarea tratamentului alcalin, amestecul obținut se centrifughează la 3000 rpm, timp de 20 minute, iar țesutul se spală cu apă rece, în flux continuu și apoi cu 2000 ml apă distilată de cel puțin 3 ori, până ce pH-ul apei de spălare este de 6-7.

Extracția și purificarea gelatinei

Pentru solubilizarea acidă, într-un vas de reacție prevăzut cu agitare, se introduce țesutul pretrat conform etapei I, peste care se adaugă 3000 ml soluție acid acetic 3%, pH 3,4, care se lasă la agitare timp de 24 ore, la temperatura camerei. Soluția obținută se separă de țesutul nedigerat prin centrifugare la 3000 rpm, timp de 20 min, după care peste țesutul

nedigerat se adaugă înca 2000 ml soluție acid acetic 3% și se reia extracția încă 24 ore. Supernatantele obținute după cele două extracții se reunesc într-un vas de sticlă cu capac, care se introduce într-o incintă termostată și se hidrolizează la 80 °C, timp de 24 ore. Amestecul obținut se răcește, se filtrează și apoi soluția de gelatină filtrată se aduce la pH 7,0 cu hidroxid de sodiu 10 N și se lasă la rece în repaos peste noapte. Precipitatul format se separă prin centrifugare la 7000 rpm, timp de 20 min, apoi se dizolvă în 300 ml apă distilată și se dializează timp de 2 zile față de apa distilată. Soluția obținută se usucă prin încălzire la 60 °C, într-o incintă termostată cu ventilație, rezultând în final gelatină condiționată ca pulbere alb-gălbuie, solubilă în apă, cu un conținut de 82% proteină, 6,8% glucide și 2% lipide.

Exemplul 2

Pretratamentul țesutului moale de *Rapana sp.* se realizează ca în exemplul 1. Țesutul mărunțit și pretratată se pune într-un vas de sticlă cu agitare și apoi se adaugă 3000 ml soluție de acid acetic 3% în care s-au dizolvat, în prealabil, 5 g pepsină cu activitatea enzimatică de 2500 unități/g proteină și se amestecă timp de 72 ore, la temperatura camerei. Soluția vâscoasă se separă de resturile de țesut nedigerat prin filtrare și se dializează, timp de 24 ore, față de 20 volume bicarbonat de sodiu 0,02 M, pH 8,4, pentru inactivarea enzimei. Precipitatul format la dializă, separat prin centrifugare la 5000 rpm, timp de 40 min, se dizolvă în 3000 ml soluție de acid acetic 1%. Soluția obținută se hidrolizează la 70 °C, timp de 20 ore, într-o incintă termostată. După hidroliză, soluția se răcește, se filtrează și se purifică prin precipitare cu hidroxid de sodiu 10 N la pH 7,2. Precipitatul format se separă prin centrifugare la 5000 rpm, timp de 30 min, apoi se dizolvă în 250 ml apă distilată și se dializează timp de 24 ore față de apa distilată. Soluția obținută se usucă prin liofilizare rezultând în final gelatină condiționată ca folie spongioasă, solubilă în apă, cu un conținut de 85% proteină, 7,5% glucide și 1,8% lipide.

Probele de gelatină, obținute din rapane conform exemplilor de mai sus, au fost analizate din punct de vedere fizico-chimic și biologic. Rezultatele analizelor fizico-chimice și biochimice au demonstrat că gelatina obținută a prezentat un conținut ridicat în proteină (peste 88%) și scăzut în lipide (sub 1%) și glucide (sub 8%). Temperatura de denaturare, determinată prin calorimetrie de scanare diferențială (DSC) a fost de 25 °C pentru gelatina extrasă prin

metoda acidă și de 31,4 °C pentru cea extrasă enzimatic, valori comparabile cu 28,8 °C pentru gelatina standard de mamifere.

Biocompatibilitatea *in vitro* a probelor de gelatină obținută din rapane a fost investigată prin testarea acestora pe celule fibroblaste, folosind linia celulară stabilizată NCTC clona L929, prin metoda MTT, în conformitate cu standardul internațional ISO/EN 10993-5/2009. În acest context, s-a utilizat metoda contactului direct, în care celulele s-au cultivat în prezența variantelor de gelatine și s-a evaluat viabilitatea celulară prin măsurarea activității lor metabolice după 48 ore de cultivare. Martorul pozitiv a fost apa oxigenată 0,003%, iar cel negativ mediul de cultură al celulelor, considerat ca având viabilitate de 100%. De asemenea, s-a testat în aceleași condiții și o probă de gelatină tip A obținută din piele de porc (Sigma-Aldrich). Morfologia celulelor cultivate în prezența probelor de gelatină s-a observat prin microscopie optică, după colorarea celulelor cu soluție Giemsa. Rezultatele testării au demonstrat că variantele de gelatină testate nu au fost citotoxice, au indus o creștere semnificativă a viabilității celulare (viabilitate de 110,4% pentru gelatina acidă și, respectiv 109,3% pentru gelatina enzimatică), comparativ cu gelatina din piele de porc (95,78%) și cu martorul de cultură (considerat 100%), iar morfologia celulelor a fost normală, caracteristică fenotipului celulelor fibroblaste, similară cu cea a probei martor.

În vederea utilizării gelatinelor, obținute conform exemplilor de mai sus, la realizarea de produse farmaceutice și cosmetice cu aplicații în tratarea tegumentului s-a determinat efectul lor asupra pielii *in vitro*, folosind un model experimental de epidermă umană reconstituită, pe bază de keratinocite epidermale umane. S-au investigat proliferarea și adeziunea celulelor (prin microscopie de fluorescență), precum și potențialul iritant și inflamator în prezența probelor de gelatină, prin dozarea citokinelor pro-inflamatorii IL-6, IL-1 β și TNF- α , comparativ cu proba control reprezentată de mediul de cultură.

Rezultatele obținute au demonstrat că produsul realizat a prezentat proprietăți de stimulare a creșterii și proliferării keratinocitelor epidermale în cultură și că celulele și-au păstrat fenotipul lor poligonal specific. Celulele au aderat la substratul de gelatină, ceea ce confirmă păstrarea proprietăților de adeziune celulară a gelatinei în timpul procesului de extracție. De asemenea, s-a evidențiat că gelatina extrasă din rapane nu a iritat și nu a indus inflamație, prin absența citokinelor pro-inflamatorii în mediul de cultură al keratinocitelor cultivate în prezența produsului. Aceste date susțin faptul că gelatina extrasă din gasteropodele marine *Rapana venosa* și *Rapana thomasi* constituie o sursă valoroasă ce poate fi folosită în diferite formulări dermato-cosmetice.

REVENDICARE

Procedeu de preparare al gelatinei din gasteropode marine, conform invenției, constă din trei etape principale: pretratatamentul țesutului pentru îndepărtarea materialelor aderente și a contaminanților; extracția gelatinei prin tratament chimic și/sau enzimatic și purificarea acesteia.

I. Pretratatamentul țesutului

Pretratatamentul, conform prezentei invenții constă în utilizarea pentru extracția gelatinei a unei cantități de 100...500 g țesut moale de rapane, obținut în urma separării mecanice de țesutul dur (cochilii), spălat cu apă pentru îndepărtarea impurităților aderente, la temperatura camerei, timp de 1...2 ore, după care s-au îndepărtat părțile închise la culoare, respectiv ficat, pancreas etc, și apoi țesutul s-a mărunțit mecanic în bucăți de aproximativ 0,2...0,6 cm, pentru a facilita accesul agentului de extracție la structura acestuia, s-a spălat apoi țesutul mărunțit cu apă, în flux continuu, timp de 1...3 ore și cu 20...50 volume de apă distilată, timp de 20...30 minute la temperatura camerei. Delipidizarea țesutului obținut după spălare s-a realizat prin tratare succesivă cu 4...6 volume acetonă, timp de 5...20 ore și apoi cu 3...5 volume etanol 10...20%, timp de 10...24 ore, la 4 °C. Decalcifierea țesutului obținut după eliminarea lipidelor și spălarea intensivă cu apă s-a făcut prin tratare cu 5...10 volume amestec de clorură de amoniu 0,6...1% și acid clorhidric 0,1...1 N, la temperatura camerei, timp de 20...24 ore. În vederea separării componentelor colagenice de cele polizaharidice, țesutul spălat s-a tratat cu 10...15 volume hidroxid de sodiu 0,2...0,5 M, timp de 24 ore, la rece, cu agitare, repetând tratamentul alcalin de 1...2 ori, apoi soluția obținută s-a centrifugat la 3000...5000 rpm, timp de 20...30 minute și s-a recuperat țesutul nedigerat, care a fost spălat de 4...7 ori cu apă distilată în raport 1:20 g/v (țesut:apă) până ce apa de spălare a avut pH-ul neutru.

II. Extracția gelatinei

Extracția acidă. Peste țesutul pretratat, conform etapei I, s-au adăugat 10...20 volume de soluție acid organic 1...5%, ales între acid acetic și acid citric, pH-ul soluției 3,0-4,0, timpul de extracție a fost de 24...48 ore, cu agitare, după care țesutul nedigerat separat prin centrifugare s-a supus unei alte extracții în aceleași condiții, supernatantele obținute prin centrifugare după

cele 2 extracții s-au reunit și s-au hidrolizat la 50...90 °C, timp de 4...25 ore folosind o incintă termostată, iar după răcire, soluția de gelatină obținută a fost recuperată prin filtrare.

Extracția enzimatică. Țesutul pretrat, rezultat din etapa I, s-a tratat cu 10...20 volume de soluție de acid acetic sau acid citric 1...3% în care s-a dizolvat în prealabil pepsină cu activitatea enzimatică de 500...2500 unități/g, în raport de greutate pepsină:țesut uscat de 1:10...1:30, cu agitare la 200...400 rpm, timp de 24...72 ore, la temperatura de 20... 25 °C, apoi s-a separat soluția vâscoasă de resturile de țesut nedigerat prin filtrare și s-a inactivat enzima din soluția separată prin dializă repetată față de 10...20 volume soluție bicarbonat de sodiu 0,02...0,04 M, pH 8...8,8. Precipitatul format la dializă s-a separat prin centrifugare la 5000...8000 rpm, timp de 30...60 minute și s-a dizolvat în 10...50 volume soluție de acid acetic sau acid citric 1...3%, apoi amestecul obținut s-a hidrolizat la 50...90 °C, timp de 4...25 ore, într-o incintă termostată, iar după răcire soluția de gelatină obținută a fost recuperată prin filtrare.

III. Purificarea

Soluțiile de gelatină obținute prin cele doua metode de extracție descrise mai sus s-au precipitat prin adăugare de hidroxid de sodiu 5...10 N până la pH 7,0, apoi dispersia s-a lăsat peste noapte la rece și s-a centrifugat la 4000...7000 rpm, timp de 20...30 minute. Precipitatul format s-a dizolvat în apă distilată, s-a dializat timp de 1...3 zile față de apă distilată și s-a uscat prin încălzire la 40...60 °C într-o incintă termostată cu ventilație sau prin liofilizare, rezultând în final gelatina condiționată fie ca pudră alb-gălbuie, fie ca folie spongioasă, solubile în apă, cu un conținut ridicat în proteină (peste 80%), scăzut în glucide (sub 8%) și lipide (sub 2%).