

Extraction and Separation of Collagen from Fish Skin: A Comparative Evaluation of Processing Methods

Hosein Mahboudi¹,
Amir Hossein Salehinia²,
Zaynab Sadeghi Ghadi^{3,4}

¹Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

²Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

³Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴Pharmaceutical Science Research Center, Institute of Herbal Medicines and Metabolic Disorders, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 8, 2025; Accepted January 25, 2026)

Abstract

Background and purpose: Collagen has widespread applications across diverse fields, including tissue engineering, pharmaceuticals, and the food industry. In recent years, the extraction of collagen from marine sources, particularly fish skin, has attracted increasing attention due to advantages such as biocompatibility and accessibility. Given the broad applications of collagen, its growing economic value in the global market, and the country's reliance on imported sources of this protein, this study utilised modern extraction approaches, including homogenisation and protocol optimisation, to extract and purify type I collagen from minced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin.

Materials and methods: This experimental study compared nine different extraction protocols for obtaining acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) from minced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin. The principal procedures included alkaline pretreatment with 0.1 M NaOH, defatting with 10% (v/v) butanol, extraction using 0.5 M acetic acid with or without pepsin, salting-out precipitation with 2 M NaCl, and centrifugation for precipitate recovery. Selected protocols incorporated homogenisation to enhance extraction yield. Collagen yield was calculated as the ratio of dry collagen weight to dry skin weight. In addition, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to characterise the extracted collagens following spray drying.

Results: The highest extraction yield (47.95%) was achieved using the optimised protocol incorporating homogenisation and pepsin treatment. The resulting collagen precipitates ranged in colour from white to light brown. SDS–PAGE analysis of both ASC and PSC revealed characteristic bands corresponding to $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains (approximately 110 kDa), β components (approximately 210 kDa), and low-molecular-weight smears below 25 kDa, consistent with type I collagen.

Conclusion: Type I collagen and its peptides were successfully extracted and purified from minced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin using nine different protocols, including both homogenised and non-homogenised approaches. The optimised method incorporating homogenisation and pepsin treatment produced the highest extraction yield.

Keywords: collagen, extraction methods, fish skin

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 35 (253): 32-41 (Persian).

Corresponding Author: Zaynab Sadeghi Ghadi - Faculty of pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
(E-mail: Sadeghi.g.zaynab@gmail.com)

استخراج و جداسازی کلاژن از پوست ماهی با مقایسه چند روش فراوری

حسین مهبودی^۱امیرحسین صالحی نیا^۲زینب صادقی قادی^{۳،۴}

چکیده

سابقه و هدف: کلاژن در زمینه‌های متنوعی مانند مهندسی بافت، داروسازی و صنایع غذایی کاربرد دارد. اخیراً استخراج کلاژن از منابع دریایی، به ویژه پوست ماهی، به دلیل مزایای زیست‌سازگاری و دسترسی پذیری، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. با توجه به کاربردهای گسترده کلاژن، ارزش اقتصادی روزافزون آن در بازار جهانی و وابستگی کشور به واردات این پروتئین، مطالعه حاضر با هدف به کارگیری روش‌های نوین استخراج از جمله هموژنیزاسیون و بهینه‌سازی پروتکل‌ها، به استخراج و خالص‌سازی کلاژن نوع I از پوست خردشده ماهی قزل‌آلا (Oncorhynchus mykiss) پرداخته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی، ۹ روش مختلف استخراج کلاژن اسید محلول (ASC) و پپسین محلول (PSC) از پوست خرد شده ماهی قزل‌آلا (Oncorhynchus mykiss) قبل از آغاز فرآیند استخراج، مقایسه شد. روش‌های اصلی شامل پیش تصفیه با NaOH ۱/۰ مولار و بوتانول ۱۰ درصد حجمی، استخراج با اسید استیک ۵/۰ مولار (با و بدون پپسین)، رسوب‌دهی با NaCl ۲ مولار (salting-out)، و سانتریفیوژ برای جداسازی رسوبات بود. برخی روش‌ها هموژنیزاسیون را برای بهبود بازده به کار بردند. بازده استخراج بر اساس نسبت وزن خشک رسوب به وزن خشک پوست ماهی محاسبه شد. همچنین از روش SDS-PAGE جهت بررسی رسوبات پس از خشک شدن توسط اسپری درایر استفاده شد.

یافته‌ها: بالاترین بازده استخراج (۹۵/۴۷ درصد) در روش بهینه شده با هموژنیزاسیون و پپسین مشاهده شد. رسوبات با رنگ سفید تا قهوه‌ای روشن به دست آمدند. الگوهای SDS-PAGE برای ASC و PSC باندهای $\alpha 1$ و $\alpha 2$ حدود (۱۱۰ kDa) β حدود (210 kDa) و اسمیرهای کوچک‌تر از ۲۵ کیلو دالتون را نشان داد که با کلاژن نوع I سازگار است.

استنتاج: استخراج و خالص‌سازی موفق کلاژن نوع I و پپتیدهای آن از پوست خرد شده ماهی قزل‌آلا (Oncorhynchus mykiss) با ۹ روش مختلف، شامل پروتکل‌های هموژنیزه و غیرهموژنیزه، انجام شد و بالاترین بازده استخراج در روش بهینه شده با هموژنیزاسیون و پپسین مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: کلاژن، روش استخراج، پوست ماهی

Email: Sadeghi.g.zaynab@gmail.com

مؤلف مسئول: زینب صادقی قادی - ساری: دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ساری، ایران

۱. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

۲. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران گروه بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

۳. استادیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۷/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۷/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۱۱/۵

مقدمه

پروتئین کلاژن به عنوان فراوان‌ترین پروتئین ساختاری در بدن حیوانات شناخته می‌شود که نقش پشتیبانی ساختاری و مکانیکی از بافت‌های مختلف را ایفا می‌کند (۱). این پروتئین، اصلی‌ترین جزء ماتریکس خارج سلولی است و حدود یک سوم کل پروتئین‌های بدن انسان و سه چهارم وزن خشک پوست را تشکیل می‌دهد (۲). با توجه به تمایل روزافزون صنایع مختلف به جایگزینی مواد سنتزی با کلاژن به دلیل خواص زیست سازگار و چند منظوره آن، بازار جهانی این پروتئین رشد چشمگیری داشته است؛ بر اساس گزارش Global Market Insights، ارزش بازار جهانی کلاژن در سال ۲۰۲۰ از ۶/۳ میلیارد دلار فراتر رفت و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۷ به حدود ۳۴/۶ میلیارد دلار برسد، در حالی که Grand View Research نیز ارزش آن را تا سال ۲۰۲۵ بیش از ۶۳/۶ میلیارد دلار تخمین زده است (۳).

در حال حاضر، نیاز جهانی به کلاژن عمدتاً از ضایعات ذبح گاو و خوک تأمین می‌شود، اما محدودیت‌های مذهبی (مانند عدم مصرف محصولات خوکی در کشورهای مسلمان و یهودی)، ریسک انتقال بیماری‌های پریونی مانند آنسفالوپاتی اسفنجی گاوی (BSE) از گاو، و نگرانی‌های انتقال آنفلوآنزای پرندگان از ضایعات طیور، پژوهشگران را به سمت منابع جایگزین مانند ضایعات ماهی و آبزیان سوق داده است (۴-۷). در ایران نیز، آمارنامه‌های مکمل‌های تغذیه‌ای و وارداتی از سال ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۹ (منتشر شده توسط سندیکای تولیدکنندگان مکمل‌های رژیمی غذایی) نشان دهنده رشد فزاینده ارزش بازار داخلی کلاژن است، که وابستگی کشور به واردات را برجسته می‌سازد. با وجود مطالعات متعدد بر استخراج کلاژن از پوست ماهی، نیاز به روش‌های بهینه شده با بازده بالا و هزینه کم برای تولید صنعتی، به ویژه با توجه به دسترسی فراوان به ضایعات صنایع شیلاتی در ایران همچنان وجود دارد (۸).

هدف این پژوهش، مقایسه ۹ روش مختلف استخراج کلاژن اسید محلول (ASC) و پپسین محلول (PSC) از پوست خردشده ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) با تمرکز بر بهینه‌سازی پروتکل‌ها از طریق هموژنیزاسیون، حذف مراحل پرهزینه و دستیابی به بالاترین بازده استخراج (قابل اندازه‌گیری بر اساس نسبت وزن خشک رسوب به وزن خشک پوست) است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی، پوست ماهی قزل‌آلا رنگین کمان از شرکت آبری اکسیر کوثر تهیه شد. سدیم کلراید، هیدروکلریک اسید، آنزیم پپسین، استیک اسیدریا، سدیم هیدروکساید، سدیم دودسیل سولفات، ۱-بوتانول، اتانول و تریس بیس از شرکت مرک آلمان استفاده شد. نمونه‌ی استاندارد کلاژن هیدرولیز شده ماهی (Grade A) از شرکت Xiamen Gelken چین تهیه شد. کارایی ۹ روش استخراج کلاژن اسید محلول (ASC) و پپسین محلول (PSC) از پوست خرد شده ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از ۳ تکرار مستقل برای هر روش ($n = 3$) ارزیابی شد. همه مراحل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (مگر موارد خاص ذکر شده) و با کنترل pH توسط pH متر (Metrohm، سوئیس) انجام گرفت. آماده‌سازی اولیه پوست (شستشو با ۰/۹ NaCl درصد، نسبت ۶:۱ حجمی/وزنی، شیکینگ ۱۵ دقیقه، ۱۵۰ rpm) برای همه روش‌ها یکسان بود و وزن پوست در هر تکرار ۲۵ گرم ثابت نگه داشته شد تا مقایسه عادلانه امکان‌پذیر باشد. پسماندهای زیستی طبق استانداردهای ایمنی آزمایشگاهی (استفاده از دستکش، عینک و دفع در ظروف مخصوص بی‌خطر) مدیریت شدند. مراحل این پژوهش پیش از انجام در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی البرز مورد بررسی قرار گرفت و با شناسه IR.ABZUMS.REC.1400.110 به تصویب رسید.

روش های استخراج (۱ تا ۹)

روش استخراج ۱

غلظت ۲/۶ مولار اضافه گردید و pH مایع به وسیله ی محلول سود ۰/۱ مولار تا عدد ۱۱ افزایش یافت. پس از ۲۴ ساعت، سانتریفیوژ (دمای ۴ درجه ی سلسیوس، ۲۰ دقیقه، RCF:15000) شد. متغیرهای مختلف این روش در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

روش استخراج ۳

مطابق جدول شماره ۱، پس از آماده سازی نمونه مطابق روش استخراج ۲ پیش تصفیه با ۱- بوتانول (۱۰ درصد حجمی/حجمی) به مدت ۲۴ ساعت و استخراج با محلول استیک اسید ۰/۵ مولار و آنزیم پپسین (به مدت ۴۸ ساعت) و سدیم کلراید با غلظت ۲ مولار انجام شد (۹، ۱۰). نمونه به دو بخش تقسیم شد و pH بخش اول به کمک Tris-base (با غلظت ۰/۲ مولار) به عدد ۷/۲ رسید. سپس سانتریفیوژ (دمای ۴ درجه ی سلسیوس، ۲۰ دقیقه، RCF:15000) گردید (۱۱). بخش دوم نیز بدون تعدیل pH سانتریفیوژ (دمای ۴ درجه ی سلسیوس، ۲۰ دقیقه، RCF:15000) شد.

۲۵ گرم پوست با HCl (pH = ۲/۴)، نسبت ۱:۲۰ (حجمی/وزنی) حاوی پپسین (۰/۰۱ درصد حجمی/وزنی) به مدت ۲۴ ساعت شیک شد (150 rpm، 25°C) سپس سانتریفیوژ (15000 g، ۴۰ دقیقه) انجام شد. Salting Out با کمک سدیم کلراید با غلظت نهایی ۰/۹ مولار انجام شد. سانتریفیوژ مجدد (15000 g، ۴۰ دقیقه) به منظور جداسازی رسوب ایجاد شده، انجام شد. متغیرهای مختلف این روش در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

روش استخراج ۲

بر اساس روش استخراج تان و همکاران، با کمی تغییر، انجام شد (۹). بدین نحو که پیش تصفیه با محلول سود ۰/۱ مولار و هیدروکلریک اسید (pH = ۲/۴) و آنزیم پپسین با کاستفاده از دستگاه هموژنایزر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و با سرعت ۲۸۰۰۰ RPM انجام شد. در ادامه به منظور Salting Out پروتئین استخراج شد به سوپرناتانت حاصل از سانتریفیوژ سدیم کلراید با

جدول شماره ۱: شرایط استخراج و متغیرهای مختلف منظور شده برای آزمایش های منطبق با روش استخراج ۵-۱

روش استخراج	وزن پوست ماهی (گرم)	زمان تیمار با سود (ساعت)	غلظت محلول سود (مولار)	نسبت محلول سود/پوست اولیه (وزنی/حجمی)	زمان تیمار با بوتانول (ساعت)	نسبت حجم بوتانول به وزن پوست (درصد)	غلظت آنزیم (درصد)	مدت زمان استخراج (ساعت)	نسبت حجم اسید به وزن پوست
۱	۲۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۰۱	۲۴	۱/۲۰
۲	۵۰	۲۴	۰/۱	۱/۲۰	۰	۰	۰/۰۲	۶	۱/۲۰
۳	۲۵	۲	۰/۱	۱/۱۰	۲۴	۱/۲۰	۰/۰۲	۴۸	۱/۴۰
۴	۱۲/۵	۲	۰/۱	۱/۲۰	۲۰	۱/۲۰	۰/۰۲	۳۲	۱/۴۰
۵-۵	۱۲	۲	۰/۱	۱/۲۰	۲۴	۱/۲۰	۰/۰۲	۳۲	۱/۲۰
۵-۶	۷/۵	۱۲	۰/۱	۱/۴۰	۲۴	۱/۳۰	۰/۰۱	۸۰	۱/۴۰
۵-۷	۷/۵	۱۲	۰/۱	۱/۴۰	۲۴	۱/۳۰	۰/۰۲	۸۰	۱/۴۰
۵-۸	۷/۵	۲۰	۰/۱	۱/۴۰	۰	۰	۰/۰۲	۵۶	۱/۴۰
۵-۹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۵-۱۰	۷/۵	۲۴	۰/۱	۱/۴۰	۲۴	۱/۳۰	۰/۰۲	۴۸	۱/۴۰
۵-۱۱	۷/۵	۲۴	۰/۱	۱/۴۰	۰	۰	۰/۰۲	۲۴	۱/۴۰
۵-۱۲	۷/۵	۲۴	۰/۱	۱/۴۰	۰	۰	۰/۰۲	۴۸	۱/۴۰
۵-۱۳	۷/۵	۲۴	۰/۱	۱/۴۰	۰	۰	۰/۰۲	۷۲	۱/۴۰
۵-۱۴	۷/۵	۴۸	۰/۱	۱/۴۰	۰	۰	۰/۰۵	۷۲	۱/۴۰
۵-۱۵	۷/۵	۲۴	۰/۱	۱/۴۰	۰	۰	۰/۰۱	۷۲	۱/۴۰
۵-۱۶	۷/۵	۲۴	۰/۱	۱/۴۰	۰	۰	۰/۰۴	۷۲	۱/۴۰
۵-۱۷	۷/۵	۹۶	۰/۱	۱/۴۰	۰	۰	۰/۰۲	۴۰	۱/۴۰
۵-۱۸	۷/۵	۹۶	۰/۲	۱/۴۰	۰	۰	۰/۰۲	۴۰	۱/۴۰
۵-۱۹	۷/۵	۲۴	۰/۱	۱/۴۰	۷۲	۱/۳۰	۰/۰۲	۴۰	۱/۴۰
۵-۲۰	۷/۵	۲۴	۰/۱	۱/۴۰	۴۸	۱/۳۰	۰/۰۲	۴۸	۱/۴۰
۵-۲۱	۷/۵	۳۶	۰/۱	۱/۴۰	۴۸	۱/۳۰	۰/۰۲	۴۸	۱/۴۰
*۵-۲۱	۳۱/۲۵	۲۴	۰/۲	۱/۳۰	۴۸	۱/۳۰	۰	۷۲	۱/۴۰
**۵-۲۱	۳۱/۲۵	۲۴	۰/۲	۱/۳۰	۴۸	۱/۳۰	۰/۰۲	۷۲	۱/۲۰

*روش استخراج شماره ۵-۲۱ بدون آنزیم

**روش استخراج شماره ۵-۲۱ با نسبت حجم اسید به وزن پوست کمتر

روش استخراج ۴

هدایت (conductivity) محلول تغلیظ شده اندازه گیری شد و سپس مجدداً از خروجی retentate و permeate دستگاه TFF نمونه برداری انجام شد. در نهایت پروتئین استخراج شده اسپری درای شد (۱۲).

روش استخراج ۴ همانند روش استخراج ۳ با کمی تغییر مطابق با جدول شماره ۱ انجام شد.

روش استخراج ۵

بر اساس روش لیو و همکاران با متغیرهای بهینه جدول شماره ۱ انجام شد (۱۰).

روش استخراج ۶

مشابه روش‌های قبل با هموژنیزاسیون (۱۵ دقیقه، 28000rpm) قبل و بعد از افزودن پیپسین مطابق جدول شماره ۲ انجام شد.

روش استخراج ۷

آماده‌سازی نمونه همانند روش‌های پیشین انجام شد (متغیرهای انجام فرآیند در جدول شماره ۳ ذکر شده است). پس از افزودن محلول ۱- بوتانول و سانتریفیوژ از سوپرناتانت و رسوب حاصله جهت انجام تست-SDS PAGE نمونه برداری انجام شد. پس از Salting Out رسوب نمونه گیری شد و در مرحله بعد از فیلتراسیون جریان مماسی (TFF) (Tangential Flow Filtration) استفاده گردید. برای این منظور ابتدا رسوب به دست آمده در استیک اسید ۰/۵ مولار با نسبت محلول/نمونه ۱:۳۰ (وزنی/حجمی) حل شد. فیلتراسیون با کمک پمپ پرستالتیک (فیلتر با سایز ۵ کیلو دالتون) انجام شد.

روش استخراج ۸

استخراج ۸ بر اساس روش هما و همکاران انجام شد (۱۳). آماده سازی نمونه، فرآیند Salting Out و سانتریفیوژ همانند روش‌های ذکر شده پیشین انجام شد. سوپرناتانت حاصل از این مرحله به وسیله محلول Tris-base با غلظت ۲ مولار تا ۵ افزایش یافت و سوپرناتانت مجدداً با سدیم کلراید ۲ مولار Salting Out گردید. سانتریفیوژ مجدداً انجام شده و رسوب حاصل از آن به رسوب قبل اضافه شد. کلاژن حاصل از این مرحله به اختصار ASC نامیده شد. از رسوب به دست آمده جهت انجام تست SDS-PAGE نمونه گیری شد. هم چنین کلاژن استخراج شده در مرحله قبل در استیک اسید ۰/۵ مولار به نسبت محلول/نمونه ۱:۱۰ (حجمی/وزنی) حل شد. pH و Conductivity محلول اندازه گیری و در نهایت محلول به کمک فیلتر آمیکون با سایز ۱۰۰KD، ۷ فیلتر گردید. پس از فیلتراسیون، کلاژن در حجم ۵۰ میلی لیتر تغلیظ شد و سپس ASC حاصل از مرحله قبل به ۲ بخش مساوی تقسیم گردید.

جدول شماره ۲: شرایط استخراج و متغیرهای مختلف منظور شده برای آزمایش‌های منطبق با روش استخراج ۶

شماره آزمایش	وزن پوست ماهی (گرم)	زمان تیمار با سود (ساعت)	مدت زمان هموژنیزاسیون (ساعت)	زمان تیمار با بوتانول (ساعت)	غلظت آنزیم (درصد)	مدت زمان استخراج (ساعت)	نسبت حجم اسید به وزن پوست
۶-۲۲	۴/۵	۲۴	۱۵ دقیقه بدون آنزیم	۴۸	۰/۱	۲۴	۱/۴۰
۶-۲۳	۴/۵	۲۴	۱۵ دقیقه بدون آنزیم	۴۸	۰/۲	۲۴	۱/۴۰
۶-۲۴	۴/۵	۲۴	۱۵ دقیقه بدون آنزیم	۴۸	۰/۴	۲۴	۱/۴۰
۶-۲۵	۴/۵	۲۴	۱۵ دقیقه بدون آنزیم	۴۸	۰/۲	۴۸	۱/۴۰
۶-۲۶	۴/۵	۲۴	۱۵ دقیقه بدون آنزیم	۴۸	۰/۲	۴	۱/۴۰
۶-۲۷	۵	۲۴	۱۵ دقیقه همراه با آنزیم	۴۸	۰/۲	۰	۱/۴۰
۶-۲۸	۲/۵	۲۴	۱۵ دقیقه همراه با آنزیم	۴۸	۰/۲	۴۸	۱/۴۰
۶-۲۹	۳/۷۵	۲۴	۱۵ دقیقه بدون آنزیم	۴۸	۰/۲	۷۲	۱/۴۰
۶-۳۰	۳/۷۵	۲۴	۱۵ دقیقه بدون آنزیم	۴۸	۰	۴۸	۱/۴۰

جدول شماره ۳: شرایط استخراج و متغیرهای مختلف منظور شده برای آزمایش‌های منطبق با روش استخراج ۷

شماره آزمایش	وزن پوست ماهی (گرم)	زمان تیمار با سود (ساعت)	غلظت محلول سود (مولار)	نسبت محلول سود/پوست اولیه (وزنی/حجمی)	زمان تیمار با بوتانول (ساعت)	نسبت حجم بوتانول به وزن پوست	غلظت آنزیم (درصد)	مدت زمان استخراج (ساعت)	نسبت حجم اسید به وزن پوست
۷-۳۱	۳۱/۲۵	۲۴	۰/۲	۱/۳۰	۴۸	۱/۳۰	۰	۷۲	۱/۴۰
۷-۳۲	۳۱/۲۵	۲۴	۰/۲	۱/۳۰	۴۸	۱/۳۰	۰/۲	۷۲	۱/۲۰

به بخش اول آنزیم پپسین با غلظت ۰/۲ درصد (وزنی/حجمی) اضافه شده و در محلول استیک اسید ۰/۵ مولار قرار گرفت. به بخش دوم، آنزیم پروتئاز صنعتی با غلظت ۰/۰۸ و ۰/۱۶ درصد (وزنی/حجمی) اضافه شد و در محلول سدیم استات با غلظت ۰/۰۱ مولار قرار گرفت. pH هر دو نمونه اندازه گیری شد و نمونه گیری جهت انجام تست SDS-PAGE انجام شد.

روش استخراج ۹

آماده سازی نمونه همانند روش های قبل انجام شد. فیلتراسیون با کمک فیلتر Glass microfiber و فیلتر Durapore membrane Merck با سایز ۰/۴۵ میکرومتر انجام شد. پس از Salting Out از فیلتراسیون جریان مماسی (TFF) استفاده شد. در مرحله ی بعد که بر مبنای پژوهش های هما و همکاران صورت گرفت (۱۳). میزان ۵۰ میلی لیتر از پروتئین تغلیظ شده جهت فرآیند Boiling در لوله فالكون ریخته شد و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۰ درجه ی سلسیوس روی دستگاه هیتر بلاک حرارت دید. در این مرحله نیز نمونه برداری جهت تست SDS-PAGE از پروتئین تغلیظ شده بدون فرآیند Boiling، سوپرناتانت (supernatant) پروتئین تغلیظ شده ی حرارت دیده و رسوب پروتئین تغلیظ شده ی حرارت دیده صورت گرفت. سپس استیک اسید با غلظت ۰/۵ مولار و آنزیم پپسین با غلظت ۰/۲ درصد وزنی/حجمی اضافه شد و pH اندازه گیری شد. پس از فیلتراسیون با کمک فیلتر با سایز ۲ کیلو دالتون فرآیند TFF به روش مذکور تکرار گردید و از پودر اسپری درای شده نمون جهت تست SDS-PAGE نمونه گیری شد.

روش SDS-PAGE

بر اساس روش Leammli انجام شد (۱۴). ژل نگهدارنده (Stacking Gel) با غلظت ۴ درصد و ژل جداکننده (Resolving Gel) برای نمونه ی کلاژن هیدرولیز شده (پپتید کلاژن) با غلظت ۱۴ درصد و برای

ASC و PSC با غلظت ۸ درصد تهیه گردید. جهت آماده سازی نمونه، نمونه ی کلاژن (ASC، PSC و کلاژن هیدرولیز شده) با غلظت ۲۰ mg/ml در بافر فسفات با pH برابر با ۷/۲، که حاوی SDS با غلظت ۱ درصد w/v و اوره با غلظت ۳/۵ مولار بود، حل شد. Sample Buffer (بافر Tris-HCl با غلظت ۰/۵ مولار و pH برابر با ۶/۸، حاوی SDS با غلظت ۴ درصد وزنی/حجمی و گلیسرول با غلظت ۲۰ درصد حجمی/حجمی نیز با بتا-مرکاپتواتانول با نسبت ۲ درصد حجمی/حجمی مخلوط شده و در نهایت این محلول با نسبت برابر با محلول نمونه کلاژن مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه روی هیتر بلاک با دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس بلافاصله مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول نمونه های مختلف آماده شده در چاهک های روی ژل بارگذاری شد. در یکی از چاهک ها نیز نمونه استاندارد و در چاهکی دیگر Marker Ladder (Molecular Weight) بارگذاری گردید. فرآیند الکتروفورز با ولتاژ ۱۶۰ ولت ران شده و پس از باز شدن Ladder با ولتاژ ۱۰۰ ولت تا رسیدن خط جبهه رنگ به انتهای ژل ادامه یافت. پس از پایان فرآیند الکتروفورز، ژل در محلولی حاوی Coomassie Brilliant Blue R-250 با غلظت ۰/۱ درصد w/v، متانول با غلظت ۵۰ درصد v/v و استیک اسید گلاسیال با غلظت ۶/۸ درصد v/v به مدت ۲ ساعت رنگ آمیزی شد و سپس به مدت ۴ ساعت در محلولی حاوی استیک اسید گلاسیال با غلظت ۷/۵ درصد v/v و متانول ۵ درصد v/v به مدت ۵ ساعت رنگ بری گردید (۱۰).

محاسبه بازده و تحلیل آماری

بازده استخراج هر آزمایش با تقسیم وزن خشک رسوب حاصل از لیوفیلیزاسیون بر وزن خشک پوست ماهی استفاده شده محاسبه شد و به درصد بیان گردید. داده ها با ANOVA یک طرفه و تست (post-hoc) Tukey با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶، سطح معنی داری ($P < ۰/۰۵$) تحلیل شد.

یافته‌ها

نتایج استخراج کلاژن از ۷ روش مختلف در جدول شماره ۴ خلاصه شده است. بالاترین بازده استخراج (۹۵/۴۷ درصد) در روش ۲۵-۶ (هموژنیزاسیون، پیسین ۰/۲ درصد، ۴۸ ساعت بوتانول) مشاهده شد، در حالی که روش‌های ۱ و ۲ با بازده ۱/۸۱ و ۰/۵۹ درصد به ترتیب دارای کم‌ترین بازده بودند. رسوبات عمدتاً قهوه‌ای روشن تا سفید بودند، اما روش‌های ۳ و ۴ رسوبات چسبنده/سیاه با بازده صفر تولید کردند.

جدول شماره ۴: نتایج حاصل از آزمایش‌های مختلف استخراج (شامل ویژگی‌های ظاهری رسوب، وزن خشک رسوب، وزن تر رسوب و بازده فرآیند)

شماره آزمایش	رنگ رسوب	وزن تر رسوب به گرم	وزن خشک رسوب به گرم	درصد بازده (درصد)
۱	سفید مایل به زرد	۳/۲	۰/۴۵	۱/۸۱
۲	سفید مایل به خاکستری	۲/۰۸	۰/۲۹	۰/۵۹
۳	سفید مایل به خاکستری	-	-	-
۴	چسبنده و سیاه رنگ	-	-	-
۵-۵	قهوه ای	۰/۷	۰/۰۹	۰/۸۲۵
۵-۶	قهوه ای روشن	۱/۵۶	۰/۲۲	۲/۹۸
۵-۷	قهوه ای تیره	۳/۹۹	۰/۲۸	۳/۸
۵-۸	قهوه ای روشن	۴/۰۴	۰/۴۳	۵/۷۴
۵-۱۰	قهوه ای روشن	۵/۸۸	۰/۳۳	۴/۵۲
۵-۱۱	خاکستری تیره	۰/۵	۰/۱۱	۱/۵۶
۵-۱۲	قهوه ای	۳/۸۳	۰/۶۶	۸/۸۴
۵-۱۳	شیری	۰/۰۴۳	۰/۰۱	۰/۱۸
۵-۱۴	قهوه ای تیره	۴/۲۳	۰/۶۷	۹/۰۵
۵-۱۵	خاکستری	۱۰/۲۵	۱/۰۴	۱۳/۸۶
۵-۱۶	کرمی	۳۹/۲۳	۱/۷۳	۲۳/۱۴
۵-۱۷	کرمی	۱۵/۳۴	۱/۰۶	۱۴/۲۴
۵-۱۸	سفید مایل به خاکستری	۲۲/۶۹	۱/۳۱	۱۷/۵۶
۵-۱۹	قهوه ای	۱۴/۷۴	۱/۰۴	۱۴/۳۲
۵-۲۰	قهوه ای تیره	۰/۳	۰/۱۳	۱/۷۳
۵-۲۱	سفید	۲/۲۷	۰/۲۵	۳/۴۵
*۵-۲۱	سفید	۸/۱	۱/۱۷	۳/۷۵
*۲۱	قهوه ای پر رنگ	۵۳/۶۹	۷/۶۲	۲۴/۳۹
*۲۵				
۵-۲۲	قهوه ای پر رنگ	۳/۹۱	۰/۹۳	۲۰/۸
۶-۲۳	قهوه ای پر رنگ	۴/۵۱	۰/۷۸	۱۷/۴
۶-۲۴	سیاه رنگ و چسبنده	۰/۲۵	۰/۰۳	۰/۸۶
۶-۲۵	قهوه ای	۱۸/۳۴	۲/۱۵	۴۷/۹۵
۶-۲۶	قهوه ای کمرنگ	۳/۱۵	۰/۲۸	۶/۳۱
۶-۲۷	زرد	۲/۰۳	۰/۲۸	۵/۷۶
۶-۲۸	سفید مایل به خاکستری	۲/۰۷	۰/۲۶	۱۰/۶۸
۶-۲۹	قهوه ای	۱۹/۹۹	۱/۴۵	۳۸/۹۰
۶-۳۰	خاکستری	۱۸/۹	۲/۰۱	۵۳/۳۶
۷-۳۱	سفید مایل به خاکستری	۱۵/۹	۱/۹	۶/۰۸
۷-۳۲	زرد مایل به قهوه ای	۸۵/۶	۱۱/۹	۳۸/۰۸
۸	سفید مایل به کرم	۱۱.۷۷	۱/۰۱	۸/۵۶
۹	سفید	۱۲۶/۷	۱۴/۰۵	۴/۶۸

* روش استخراج شماره ۵-۲۱ بدون آنزیم

** روش استخراج شماره ۵-۲۱ با نسبت حجم اسید به وزن پوست کمتر

نتایج حاصل از بررسی الگوهای ژل SDS-PAGE حاصل از رسوب به دست آمده از روش‌های استخراج مختلف و باندهای به دست آمده در جدول شماره ۵، قابل مشاهده است.

جدول شماره ۵: خلاصه الگوهای SDS-PAGE

روش	باندهای اصلی (kDa)	تفسیر
روش ۱ و ۲	بدون باند	عدم استخراج کلاژن
روش ۳	اسیر کمتر از ده کیلو دالتون	هیدرولیز بیش از حد
روش ۴	اسیر مشابه استاندارد	پپتیدهای کوچک
روش ۵-۲۱ الی ۵-۵	(β ~210k Da, α 1, α 2~110 kDa)	کلاژن نوع I (ASC/PSC)
روش ۶-۳۰ الی ۶-۲۲	α 1, α 2~110, 120 kDa	کلاژن نوع I خالص
روش ۷	باندهای کم‌رنگ	احتباس در TFF (۵ kDa)
روش ۸	پس از فیلتراسیون آبیون باندهای کم‌تر از صد کیلو دالتون	خالص‌سازی موفق
روش ۹	پپتیدهای ۱۱-۱۰۰ کیلو دالتون	هیدرولیز جزئی

در روش استخراج ۵، باندهای تشکیل شده به وضوح قابل مشاهده بودند. این باندها در سایزهای بالاتر از ۱۸۰ کیلو دالتون تشکیل شدند و می‌توان آن‌ها را به زنجیره‌های بتای کلاژن نسبت داد؛ زنجیره‌هایی که پس از استخراج PSC و ASC، روی ژل در سایزهای حدود ۲۰۰ تا ۲۲۰ کیلو دالتون ظاهر می‌شوند. هم‌چنین، زنجیره‌های آلفا ۱ و آلفا ۲ نیز که در سایزهای ۱۱۰ تا ۱۲۰ کیلو دالتون ظاهر می‌شوند، در هر دو ژل قابل مشاهده هستند (۱۰، ۱۵).

نتایج حاصل از روش‌های مختلف استخراج با متد ۶ در جدول شماره ۴ بیان شده است. در بررسی الگوهای ژل SDS-PAGE، دو باند پررنگ و قابل مشاهده در هر دو ژل مشاهده شد که می‌تواند متعلق به زنجیره‌های آلفا ۱ و آلفا ۲ باشد؛ زنجیره‌هایی که پس از استخراج PSC و ASC، روی ژل در سایزهای حدود ۱۱۰ تا ۱۲۰ کیلو دالتون ظاهر می‌شوند و این الگو، بیانگر کلاژن نوع اول است (۱۰، ۱۵).

تحلیل آماری و ارتباط متغیرها

تحلیل ANOVA نشان داد تفاوت معنی‌داری بین بازده روش‌ها وجود دارد ($P < ۰/۰۰۱$). تست Tukey مشخص کرد روش‌های ۲۵-۶ و ۶-۲۹ با درصد‌های

بازده به ترتیب $47/95 \pm 1/2$ و $38/9 \pm 2/1$ درصد به طور معنی دار برتر بودند ($P < 0/05$) هموژنیزاسیون ($P < 0/01$)، غلظت پپسین $0/2$ درصد ($P < 0/05$) و نسبت اسید: پوست $1:40$ ($P < 0/01$) بیشترین تأثیر مثبت را بر بازده داشتند. رسوبات تیره رنگ (> 10 درصد بازده) با هیدرولیز بیش از حد و اکسیداسیون مرتبط بودند، در حالی که رسوبات سفید نشان دهنده خلوص بالاتر بودند.

بحث

تاکنون محققان زیادی به استخراج کلاژن از منابع مختلف و با روش های گوناگون اقدام کرده اند و بسیاری از این روش ها مبتنی بر استخراج کلاژن به کمک آنزیم پپسین از منابع دریایی، به ویژه پوست ماهی، بوده اند (۱۶). در این پژوهش، استخراج کلاژن به کمک آنزیم پپسین بازدهی بالاتری نسبت به استخراج اسیدی و بدون دخالت آنزیم نشان داد؛ این امر به ویژه در استخراج کلاژن هیدرولیز شده اهمیت دارد. برخلاف روش ارائه شده توسط هما و همکاران، استخراج با آنزیم پروتئاز در غلظت های مذکور به هیدرولیز بیش از حد کلاژن منجر شد و موفقیت آمیز نبود (۱۳). مشابه روش های ارائه شده توسط بلانکو، ژانگ، لیو و دیگران، پیش تیمار پوست ماهی قزل آلا با محلول سدیم هیدروکساید (برای حذف رنگدانه ها و پروتئین های غیر کلاژنی) و چربی زدایی با بوتانول

ضروری است و قابل صرف نظر نمی باشد. یافته های این پژوهش نشان داد فرآیند شیکینگ در مرحله استخراج و سرعت آن تأثیر بسزایی بر بازده دارد. همچنین، کمبود حجم اسید استخراجی به افزایش ویسکوزیته و دشواری در خالص سازی منجر می شود (۱۵، ۱۷). مشابه نتایج سادوسکا و یوسف، استفاده از هموژنیزاسیون در کنار استخراج اسیدی-آنزیمی، ضمن حفظ کیفیت پروتئین، بازده را افزایش داد و کلاژن نوع اول تولید کرد (۱۸، ۱۹). بهینه سازی با روش سطح پاسخ (RSM)، بازده $56/95$ درصد را برای روش ۶ نشان داد که با گزارش های معتبر (مانند ۵۰-۶۰ درصد در مطالعات صنعتی پوست ماهی) قابل مقایسه و مناسب تولید صنعتی است (۱۶، ۲۲-۲۰) در مقیاس صنعتی، حذف سانتریفیوژ با فیلترهای آمیکون، Glass microfiber یا DURAPORE ناموفق بود، اما TFF با فیلتر ۵ کیلو دالتون برای تعویض بافر، حذف یون های سدیم/کلر (پس از salting-out) و خالص سازی کلاژن هیدرولیز شده کارآمد است؛ این رویکرد هزینه ها را کاهش داده و scalability را برای تولید صنعتی تضمین می کند. در این پژوهش حذف و جایگزینی مراحل پرهزینه به منظور تولید صنعتی کلاژن به منظور کاهش هزینه های استخراج صنعتی مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین بازده استخراج، با روش مبتنی بر هموژنیزاسیون حاصل شد.

References

1. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 929-958. PMID: 19344236
2. Sionkowska A, Kozłowska J, Skopińska-Wiśniewska J, Piechowicz K. The review of versatile application of collagen. *Polym Adv Technol* 2017; 28(1):4-9. PMID: 28503012.
3. Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG, Sánchez ML. Collagen: a review on its sources and potential cosmetic applications. *J Cosmet Dermatol* 2018; 17(1): 20-26. PMID: 28349634.
4. da Silva T, Penna ALB. Chemical characteristics and functional properties of collagen. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2012;

- 71(3): 530-539.
5. Jia J, Zhou Y, Lu J, Chen A, Li Y, Zheng G. Enzymatic hydrolysis of Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate. *J Sci Food Agric* 2010; 90(4): 635-640. PMID: 20355086.
 6. Muralidharan N, Jeya Shakila R, Sukumar D, Jeyasekaran G. Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *J Food Sci Technol* 2013; 50(6): 1106-1113. PMID: 24426022
 7. Schmidt MM, Dornelles RCP, Mello RO, Kubota EH, Mazutti MA, Kempka AP, Demiate IM. Collagen extraction process. *Int Food Res J* 2016;23(3):913-922.
 8. Khong NMH, Yusoff FM, Jamilah B, Basri M, Maznah I, Chan KW, Nishikawa J. Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes. *Food Chem* 2018; 251: 41-50. PMID: 29426421.
 9. Tan Y, Chang SKC. Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food Chem* 2018; 242: 147-155. PMID: 29037668.
 10. Liu D, Liang L, Regenstein JM, Zhou P. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chem* 2012; 133(4): 1441-1448. PMID: 23452881.
 11. Nagai T, Suzuki N. Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. *Food Chem* 2000; 68(3): 277-281. PMID: 30944676.
 12. Benjakul S, Karnjanapratum S, Visessanguan W. Production and characterization of odorless antioxidative hydrolyzed collagen from seabass (*Lates calcarifer*) skin without descaling. *Waste Biomass Valorization* 2018; 9(4): 549-559. PMID: 29527249.
 13. Hema GS, Joshy CG, Shyni K, Chatterjee NS, Anandan R, Mathew S. Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from fish skin (*Epinephelus malabaricus*) using response surface methodology and its characterization. *J Food Sci Technol* 2017;54(2):488-496. PMID: 28242948.
 14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-685. PMID: 5432063.
 15. Zhang M, Liu W, Li G. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). *Food Chem* 2009; 115(3): 826-831. PMID: 25561857.
 16. Jafari H, Lista A, Siekapen MM, Ghaffari-Bohlouli P, Nie L, Alimoradi H, Shavandi A. Fish collagen: extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering. *Polymers (Basel)* 2020; 12(10): 2230. PMID: 33003453.
 17. Blanco M, Vázquez JA, Pérez-Martín RI, Sotelo CG. Collagen extraction optimization from the skin of the small-spotted catshark (*S. canicula*) by response surface methodology. *Mar Drugs* 2019; 17(1): 40. PMID: 30634587.
 18. Sadowska M, Kołodziejska I, Niecikowska C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem* 2003;81(2):257-262. PMID: 24042291.
 19. Yusoff F, Karim AA, Mohd Dan N, Jamilah B, Imam B, Utsumi H. A method for extracting collagen from aquatic

- animals, collagen and products containing it. 2013.
20. Usman M, Gao J, Li S, Tang Y, Huang Q, Yu C. Physicochemical and functional properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin gelatin in comparison to commercial bovine gelatin. Food Chem Adv 2025; 8:101088.
21. Uchida DT, Tang YJ, Li SL, Huang Q, Yu C. Effect of the extraction methods on the physicochemical characteristics of collagen derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin. ACS Omega 2025; 10(32): 35809-35826. PMID: 39576858.
22. Wang B, Liu Z, Li B, Ji X, Wu H, Luo Y. Extraction process optimization and functional characteristics of by papain solubilized collagen from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) skin. Am J Biochem Biotechnol 2023; 19(4):249-258.