

ORIGINAL ARTICLE

Enhanced collagen extraction from common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) bone and its properties using ultrasound

Amir Rezaie¹, Mehdi Alboofetileh^{2*}, Samira Jeddi²

1- Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

2- Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSR), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran

ABSTRACT

Introduction: Commercial collagen from pigs and cattle faces religious restrictions and health concerns (e.g., BSE/TSE). Marine sources offer a safer, effective alternative. Conventional chemical extraction methods, however, are often inefficient and can degrade collagen structure. Ultrasound-assisted extraction is a promising, green technology that utilizes cavitation to disrupt tissue matrices, facilitating solvent penetration and improving yield while preserving protein structure. This study aims to extract collagen from common dolphinfish bone using both acidic and ultrasound-assisted methods and compare their properties.

Methodology: Collagen was extracted from backbone of common dolphinfish using acidic and ultrasound methods. Then, different properties of extracted collagens were evaluated. The extraction yield of collagen was calculated as dry weight collagen/wet weight fish bone $\times 100$. The protein, fat, moisture and ash content of extracted collagens were determined according to the AOAC method. Protein and fat contents were determined by Kjeldahl and Soxhlet devices, respectively. Amino acid analysis was performed by acid hydrolysis of dry collagens and then determined using HPLC apparatus. Functional groups of extracted collagens were determined using FT-IR spectra. Thermal stability of collagens were analyzed using differential scanning calorimetry (DSC) assays. Viscosity and color were measured using viscometer and Hunter colorimeter, respectively. Antioxidant activity of extracted collagens was measured using DPPH radical scavenging and reducing power assays. Functional properties of collagens including emulsifying and foaming properties were also evaluated.

Result: The ultrasound-assisted method yielded more collagen from common dolphinfish bone (2.19%) compared to the acidic method (1.34%) and produced higher protein content (81.60% vs. 77.74%). Conversely, the acidic method resulted in higher fat (0.95%) and ash (1.50%) content. While the amino acid profiles were similar, the ultrasound-extracted collagen contained higher levels of total amino acids, proline, and hydroxyproline. Both extraction methods yielded similar FT-IR spectra and DSC analysis, and while colorimetric results showed no significant difference, the ultrasound samples exhibited slightly higher lightness (L^*) and yellowness (b^*) values. The functional properties were concentration-dependent and consistently superior in ultrasound-extracted collagen, which showed higher DPPH radical scavenging and reducing power (29.10–42.17%). Additionally, the ultrasound method provided better emulsifying capacity (16.89–31.67%) and stability (15.21–28.41%), as well as

ARTICLE INFO

Key words:

Coryphaena hippurus
collagen extraction
antioxidant activity
emulsifying properties
foaming properties



Corresponding author:
Email address: alboofetileh@areeo.ac.ir

Received: 09 August 2026 | Revised: 15 September 2026 | Accepted: 19 September 2026 | Published online: 20 September 2026

© Authors 2026. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

ORIGINAL ARTICLE

enhanced foaming capacity (68.97–97.41%) and stability (64.21–88.95%) compared to the acidic method at all concentrations.

Discussion and conclusion: Ultrasonic-assisted extraction significantly outperforms conventional acid methods in terms of collagen yield from various fish species (e.g., *Chitala ornata* and *tuna skin*), primarily due to cavitation-induced matrix disruption. The resulting collagen maintains high purity (low fat/ash) and exhibits superior functional characteristics, such as enhanced thermal stability, antioxidant activity (DPPH), and emulsifying properties. These improvements stem from ultrasonication-driven alterations in the protein's structural, molecular, and surface properties (e.g., particle size, hydrophobicity, and amino acid composition).

افزایش بازیابی و ویژگی‌های کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت (*Coryphaena hippurus*) با استفاده از روش فراصوت

امیر رضائی^۱، مهدی آل بوفتيله^{۲*}، سمیراء جدی^۲

۱- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۲- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر اثر روش استخراج فراصوت بر میزان بازیابی و ویژگی‌های مختلف کلاژن استخراج شده از استخوان ستون فقرات ماهی گالیت در مقایسه با روش اسیدی بررسی شد. به منظور ارزیابی کلاژن استخراج شده، بازده استخراج، طیف سنجی FT-IR، ویژگی‌های حرارتی (DSC)، ترکیبات تقریبی، پروفایل اسیدهای آمینه، رنگ، ویسکوزیته، ویژگی‌های ضد اکسایشی، امولسیون کنندگی و کف کنندگی سنجش شدند. نتایج نشان داد که بازده استخراج کلاژن در روش فراصوت (۲/۱۹ درصد) نسبت به روش اسیدی (۱/۳۴ درصد) بیشتر بود. کلاژن استخراج شده به روش فراصوت حاوی پروتئین بیشتر و میزان چربی و خاکستر کمتری نسبت به نوع استخراج شده به روش اسیدی بود. محتوی اسیدهای آمینه کل، اسید آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین در کلاژن استخراج شده به روش فراصوت بیشتر بودند. طیف های FT-IR نشان دادند که اختلافی بین کلاژن استخراج شده به روش های فراصوت و اسیدی وجود نداشت. پایداری حرارتی کلاژن استخراج شده به روش فراصوت مقداری بیشتر از کلاژن استخراج شده به روش اسیدی بود. نتایج همچنین نشان داد که بکارگیری روش فراصوت منجر به تولید کلاژنی با ویژگی‌های ضد اکسایشی، امولسیون کنندگی و کف کنندگی بیشتری نسبت به کلاژن استخراج شده به روش اسیدی گردید. بر اساس این نتایج، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استفاده از روش فراصوت می‌تواند باعث افزایش بازده و ویژگی‌های کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت در مقایسه با روش اسیدی گردد.

کلیدواژه‌ها: ماهی گالیت، استخراج کلاژن، ویژگی‌های ضد اکسایشی، ویژگی‌های امولسیون

کنندگی، ویژگی‌های کف کنندگی

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۵/۱۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۶/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۲۸

تاریخ چاپ الکترونیکی:

۱۴۰۵/۰۶/۲۹

*نویسنده مسئول:

alboofetileh@areeo.ac.ir

مقدمه

کلاژن مهمترین و فراوان ترین گلیکوپروتئین فیبری در پوست، استخوان، غضروف، تاندون و بافت‌های همبند حیوانات است (Göçer et al., 2022). کلاژن با زیست‌سازگاری عالی، زیست‌تخریب‌پذیری، ایمنی‌زایی پایین، فعالیت بیولوژیکی و ویژگی‌های عملکردی منحصر به فرد خود، به طور گسترده در صنایع غذایی، دارویی، پزشکی، کشت سلول، آرایشی-بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hu et al., 2023). کلاژن تجاری عموماً از پوست و استخوان خوک و گاو تولید می‌شود. با این حال، استفاده از این نوع کلاژن به علت مسائل مذهبی با محدودیت‌هایی مواجه است. در این راستا اسلام و یهودیت مصرف خوک و هندوئیسم مصرف گاو را ممنوع می‌دانند. علاوه بر اینها، نگرانی‌های بهداشتی مرتبط مانند خطر ابتلا به انسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی، انسفالوپاتی اسفنجی شکل قابل انتقال و بیماری تب برفکی نیز وجود دارد (Nurilmala et al., 2020). کلاژن استخراج شده از منابع دریایی یک منبع جایگزین و ایمن‌تر کلاژن بوده که توسط کشورهای مسلمان و هندو پذیرفته شده است. پوست، استخوان، باله‌ها، کیسه شنا و فلس ماهیان مختلف و همچنین انواع عروس‌های دریایی می‌توانند برای استخراج کلاژن مورد استفاده قرار گیرند. در مقایسه با کلاژن پستانداران، کلاژن دریایی مزایایی از جمله راندمان استخراج بالا، آماده‌سازی آسان‌تر و خواص عملکردی بالا را دارد (Wu et al., 2024). تحقیقات گذشته نشان داد که میزان بازده استخراج، ساختار و ویژگی‌های مختلف کلاژن استخراج شده از آبزیان تحت تاثیر عوامل مختلفی هستند.

یکی از عواملی که در میزان بازیابی کلاژن و ویژگی‌های آن تاثیر زیادی دارد، روش استخراج است. روش متداول استخراج کلاژن، آب داغ و هیدرولیز شیمیایی با استفاده از بازها، اسیدها یا نمک‌ها است (Hu et al., 2023). این روش ساده و ارزان بوده اما اغلب ناکارآمد و زمان‌بر بوده و ممکن است منجر به تخریب ساختاری کلاژن و در نتیجه بازدهی کم و کیفیت پایین آن شود (Malekshah et al., 2025). از این رو تحقیقات به سوی توسعه روش‌های جایگزین و موثرتر سوق پیدا کرده است. در این راستا، عباسی و همکاران (۱۴۰۰) تاثیر روش‌های استخراج اسیدی و آنزیمی کلاژن از پوست طوطی ماهی را بررسی کردند (Abbasi et al., 2021). نتایج نشان داد که در روش آنزیمی مقدار بازده استخراج سه برابر روش اسیدی بود اما نمونه‌های استخراج شده به روش اسیدی حلالیت و ویژگی‌های امولسیون کنندگی بیشتری داشتند. در مطالعه دیگری، حاجیانی و همکاران (۱۴۰۰) کلاژن عروس دریایی *Catostylus mosaicus* را با استفاده از روش‌های اسیدی و آنزیمی، استخراج کردند (Hajiani et al., 2021). نتایج این مطالعه نشان داد کلاژن استخراج شده با استفاده از روش آنزیمی از چتر و بازوی عروس دریایی شامل زنجیره‌های α و β دایمر است. مقدار بازده استخراج کلاژن در روش آنزیمی از چتر و بازوی عروس دریایی بر اساس وزن خشک به ترتیب ۱۴/۵۸ درصد و ۱۲/۸ درصد اندازه گیری شد. طیف‌های مادون قرمز کلاژن استخراجی از چتر و بازوی عروس دریایی تقریباً یکسان و شبیه کلاژن سایر گونه‌های دیگر آبزیان بودند. نتایج مطالعه زرگر و همکاران (۱۴۰۱) در مورد کلاژن‌های محلول در اسید و محلول در پیپسین از فلس کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نیز بیانگر این بود که بازده استخراج در روش آنزیمی (۲/۹۶ درصد) بیشتر از روش اسیدی (۱/۹ درصد) است (Zargar et al., 2022).

یکی دیگر از روش‌هایی که پتانسیل استفاده جهت استخراج کلاژن را دارا می‌باشد، روش فراصوت است. امواج فراصوت به امواجی با فرکانس بیش از ۱۸ کیلوهرتز اطلاق می‌شوند. فراصوت از طریق پدیده کاویتاسیون (تشکیل، رشد و متلاشی شدن حباب‌های کوچک در اثر ایجاد فشار منفی بزرگ در محیط مایع) منجر به ایجاد یکسری تغییرات فیزیکی، مکانیکی، شیمیایی و بیوشیمیایی شده و در نتیجه ماتریس‌های بافت را مختل کرده و نفوذ حلال را تسهیل می‌کند. در نتیجه طی این روش بازده افزایش و زمان پردازش کوتاه‌تر می‌شود، در حالی که ساختار پروتئین حفظ می‌گردد (Malekshah et al., 2025). این روش تاکنون برای ترکیبات زیست فعال متعددی از قبیل انواع پلی ساکاریدها، رنگدانه‌ها، روغن‌ها، ترکیبات فنولی، مواد موثره گیاهی و غیره استفاده شده است. اما استفاده از آن برای استخراج کلاژن به نسبت سایر ترکیبات، کمتر است. از این رو مطالعات بیشتری در این زمینه لازم بوده تا پتانسیل استفاده از این روش (به صورت تکی و ترکیبی با روش‌های دیگر) جهت استخراج کلاژن مورد بررسی قرار گیرد. بر این اساس، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر روش استخراج فراصوت بر میزان بازیابی و ویژگی‌های مختلف

کلاژن استخراج شده از استخوان ستون فقرات ماهی گالیت در مقایسه با روش اسیدی بود. در این راستا، بازده استخراج، طیف سنجی FT-IR، ویژگی‌های حرارتی (DSC)، ترکیبات تقریبی، پروفایل اسیدهای آمینه، رنگ، ویسکوزیته، فعالیت ضدکسایشی، ویژگی‌های امولسیون کنندگی و کف کنندگی سنجش شدند.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه‌ها:

استخوان ماهی گالیت از شرکت سروش سلامت نیکان (شارین) تهیه شد. پوست و استخوان‌ها در ابتدا با آب شهری شستشو شده و با آب مقطر آبکشی شد. سپس در دمای ۴۰- درجه سیلیسیوس منجمد و در یونولیت درب‌دار در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها تا انجام آزمایش در شرایط دمایی ۱۸- درجه سیلیسیوس نگهداری شدند. قبل از استخراج کلاژن، نمونه‌های استخوان ماهی گالیت در دمای اتاق انجمادزدائی شده و به قطعات کوچک برش داده شدند.

استخراج کلاژن:

در مطالعه حاضر کلاژن به دو روش اسیدی و فراصوت استخراج گردید. در روش اسیدی، ابتدا به منظور حذف پروتئین‌های غیرکلاژنی، قطعات استخوان تهیه شده در محلول ۰/۱ مول بر لیتر هیدروکسید سدیم به مدت ۶ ساعت غوطه‌ور شده و پس از گذشت زمان مذکور با آب مقطر شستشو شدند. در مرحله بعد محلول ۰/۵ مول بر لیتر EDTA با pH برابر با ۷/۴ به استخوان‌ها اضافه شده و به مدت ۴ روز نگهداری شد تا کلسیم موجود در بافت استخوان حذف گردد. به منظور حذف چربی، از بوتیل الکل ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط استفاده شد. در نهایت مواد باقی مانده در اسید استیک ۰/۵ مول بر لیتر به مدت ۳ روز قرار داده شدند. سپس فاز مایع با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و به آن محلول ۲/۶ مول بر لیتر NaCl اضافه شد تا اینکه کلاژن رسوب یابد. کلاژن رسوب یافته با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و در حداقل حجم ممکن از اسید استیک ۰/۵ مولار مجدداً به حالت تعلیق درآمد و به مدت ۱۲ ساعت در برابر ۲۰ برابر حجم آن، اسید استیک ۰/۱ مولار (که هر ۴ ساعت یکبار تعویض می‌شد) و سپس به مدت ۲ روز دیگر در برابر ۲۰ برابر حجم آن، آب مقطر (که روزانه تعویض می‌شد) با استفاده از فیلترهای ۱۴ کیلودالتونی دیالیز گردید. کلاژن در نهایت با استفاده از فریزدرایر خشک و تا استفاده‌های بعدی در دمای ۱۸- درجه سیلیسیوس نگهداری شد. در روش استخراج فراصوت، مراحل حذف پروتئین‌های غیرکلاژنی، کلسیم و چربی مشابه روش اسیدی بود. سپس قطعات استخوان به محلول ۰/۵ مول بر لیتر اسید استیک اضافه و مخلوط تهیه شده با استفاده از دستگاه فراصوت پروپ دار (Topsonics, UHP-400, Iran) به مدت ۲۰ دقیقه در مجاورت امواج فراصوت با شدت ۴۰۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز تیمار شد. به منظور جلوگیری از افزایش دما از حمام یخ استفاده شد. همچنین از تناوب تابش امواج به صورت سیکل‌های ۱۰ ثانیه تابش و ۱۰ ثانیه استراحت استفاده شد. انتخاب زمان ۲۰ دقیقه براساس پیش تست‌های انجام شده بود. در این رابطه استخراج کلاژن به روش فراصوت در زمان‌های ۵ الی ۲۰ دقیقه انجام و بیشترین بازده در زمان ۲۰ دقیقه مشاهده شد. لذا این زمان به عنوان زمان منتخب استخراج در نظر گرفته شد. بعد از اتمام زمان فراصوت، فاز مایع با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و به آن محلول ۲/۶ مول بر لیتر NaCl اضافه شد تا اینکه کلاژن رسوب یابد. کلاژن رسوب یافته با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و در حداقل حجم ممکن از اسید استیک ۰/۵ مولار مجدداً به حالت تعلیق درآمد و به مدت ۱۲ ساعت در برابر ۲۰ برابر حجم آن، اسید استیک ۰/۱ مولار (که هر ۴ ساعت یکبار تعویض می‌شد) و سپس به مدت ۲ روز دیگر در برابر ۲۰ برابر حجم آن، آب مقطر (که روزانه تعویض می‌شد) با استفاده از فیلترهای ۱۴ کیلودالتونی دیالیز گردید. کلاژن در نهایت با استفاده از فریزدرایر خشک و تا استفاده‌های بعدی در دمای ۱۸- درجه سیلیسیوس نگهداری شد (Heidari and Rezaei, 2022).

اندازه گیری بازده استخراج:

بازده استخراج کلاژن به نسبت وزن تر استخوان استفاده شده مطابق رابطه شماره ۱ محاسبه گردید:

$$(۱) \quad \text{BW وزن کلاژن، BW وزن استخوان} \quad \text{بازده (درصد)} = \frac{\text{CW}}{\text{BW}} \times 100$$

CW وزن کلاژن، BW وزن استخوان

ارزیابی کلاژن‌های استخراج شده:

طیف سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه (FT-IR) جهت شناسایی گروه‌های عاملی کلاژن استخراج شده استفاده شد. بدین منظور ابتدا کلاژن استخراج شده به صورت جداگانه با پودر پتاسیم بروماید مخلوط و در ادامه مخلوط بدست آمده با استفاده از دستگاه پرس به صورت قرص تبدیل شد. در انتها طیف سنجی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه FT-IR در بازه طیف‌های ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm⁻¹ انجام شد.

برای بررسی پایداری حرارتی از آزمون گرماسنجی افتراقی استفاده شد. بدین منظور مقدار مشخصی از کلاژن استخراج شده در ظرف‌های آلومینیومی قرار داده شد. یک ظرف آلومینیومی خالی نیز به عنوان مرجع استفاده شد. دمای دناتوراسیون و تخریب نمونه‌ها توسط دستگاه کالریمتری روبشی تفاضلی تجزیه و تحلیل شد. نمونه‌ها از ۱۰ درجه تا ۱۵۰ درجه سیلیسیوس با سرعت گرمایش ۵ درجه بر دقیقه در اتمسفر نیتروژن حرارت داده شدند.

ترکیبات تقریبی کلاژن استخراج شده مطابق با روش AOAC (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شدند. به منظور سنجش رطوبت از آون، محتوی پروتئین از دستگاه کلدال، چربی از دستگاه سوکسله و خاکستر از کوره الکتریکی استفاده شد (AOAC, 2005).

سنجش پروفایل اسیدهای آمینه با استفاده دستگاه HPLC انجام شد. به این منظور ابتدا هیدرولیز هر یک از نمونه‌ها با استفاده از اسیدکلریدریک ۶ نرمال به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سیلیسیوس صورت گرفت. پس از خنثی سازی، فنیل ایزوتیوسیانات برای مشتق‌سازی اسیدهای آمینه استفاده شد. مشتق‌سازی اسیدهای آمینه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با استفاده از ستون RP-C18 و آشکارساز فلوئورسانس انجام شد. مقدار هر یک از اسیدهای آمینه با استاندارد اسیدهای آمینه مقایسه شد (Medina-Medrano et al., 2019). ویسکوزیته کلاژن‌های استخراج شده با استفاده از دستگاه ویسکومتر و در دماهای ۱۰ الی ۵۰ درجه سیلیسیوس با تناوب ۱۰ درجه انجام شد.

شاخص‌های رنگی (L*)، (a*)، (b*) کلاژن استخراج شده با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج هانتربل اندازه‌گیری شدند.

جهت بررسی فعالیت ضداکسایشی نمونه‌های کلاژن استخراج شده، از آزمون‌های خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی آهن استفاده شد. برای سنجش فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH، محلول آبی حاوی غلظت‌های مختلف کلاژن استخراج شده (۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر) تهیه و با نسبت برابر با محلول رادیکال‌های آزاد DPPH مخلوط شد. محلول فاقد کلاژن نیز به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. نمونه‌های تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سیلیسیوس نگهداری و سپس جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های DPPH براساس رابطه شماره ۲ محاسبه شد (Chi et al., 2014):

$$(۲) \quad \text{فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH (درصد)} = \frac{\text{AC} - \text{AS}}{\text{AC}} \times 100$$

AC جذب کنترل، AS جذب نمونه

جهت سنجش قدرت کاهندگی آهن، محلول آبی حاوی غلظت‌های مختلف کلاژن استخراج شده (۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر) تهیه و با حجم برابر (۲ میلی لیتر) از محلول‌های بافر فسفات (pH=۶/۵) و پتاسیم فری سیانید ۰/۱ درصد مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سیلیسیوس در حمام آب قرار داده شد. در مرحله بعد ۲ میلی لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به محلول مرحله قبل اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) گردید. پس از سانتیفریوژ، ۲ میلی لیتر از مایع روماند جدا شده و به ۲ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر

محلول FeCl_3 (۰/۱ درصد) اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این آزمون میزان جذب بیشتر به معنای میزان قدرت کاهندگی یون آهن بیشتر، می‌باشد (Medina-Medrano et al., 2019).

به منظور تهیه امولسیون و سنجش ویژگی‌های امولسیون کنندگی، ۱۵ میلی‌لیتر از محلول کلاژن استخراج شده (با غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ درصد) به ۵ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان اضافه و به مدت ۱ دقیقه با استفاده از هموژنایزر با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه مخلوط شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از امولسیون تهیه شده در زمان صفر و ۳۰ دقیقه از کف ظرف برداشته شده و در ۵ میلی‌لیتر محلول سدیم دو دسیل سولفات ۰/۱ درصد رقیق‌سازی گردید. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. شاخص امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون به ترتیب با استفاده از رابطه‌های شماره ۳ و ۴ محاسبه شدند (Abbasi et al., 2021):

$$S \text{ غلظت نمونه, } A_0 \text{ جذب در زمان صفر و } A_{10} \text{ جذب در زمان ۳۰ دقیقه} \quad (3)$$

$$\text{ظرفیت امولسیون کنندگی (m}^2 \text{ g}^{-1}\text{)} = \frac{2 \times 2.303 \times 100 \times A}{S \times 0.25 \times 10000} \quad (3)$$

$$\text{پایداری امولسیون (min)} = \frac{A_0 \times 30}{A_0 - A_{30}} \quad (4)$$

به منظور سنجش ویژگی‌های کف کنندگی، ابتدا محلول آبی حاوی غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ درصد کلاژن استخراج شده تهیه گردید. سپس همگن‌سازی محلول تهیه شده با استفاده از دستگاه هموژنایزر به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق انجام شد. حجم محلول در زمان صفر (ظرفیت کف کنندگی) و پس از ۳۰ دقیقه (پایداری کف) اندازه‌گیری شد. در نهایت ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف به ترتیب براساس رابطه‌های شماره ۵ و ۶ محاسبه شدند (Chi et al., 2014).

$$\text{ظرفیت کف کنندگی (درصد)} = \frac{V_T - V_0}{V_0} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{پایداری کف (درصد)} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100 \quad (6)$$

V_0 ارتفاع محلول قبل از همزدن (میلی‌متر)، V_T ارتفاع محلول بعد از همزدن (میلی‌متر)، V_t ارتفاع محلول بعد از گذشت ۳۰ دقیقه بعد از همزدن (میلی‌متر)

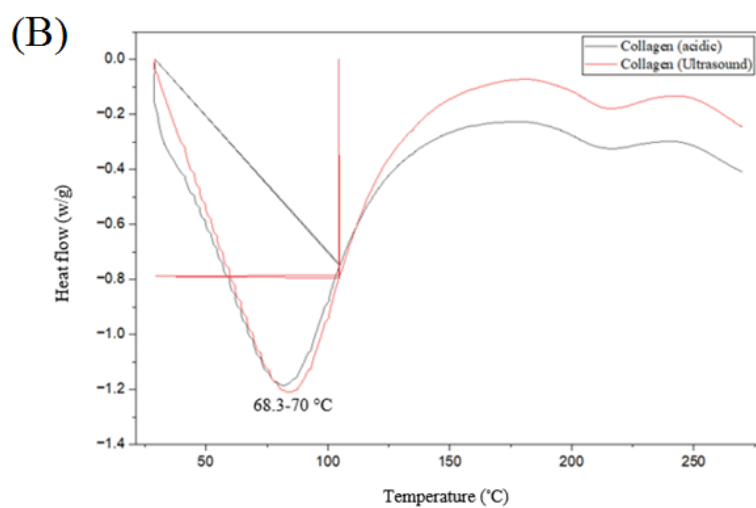
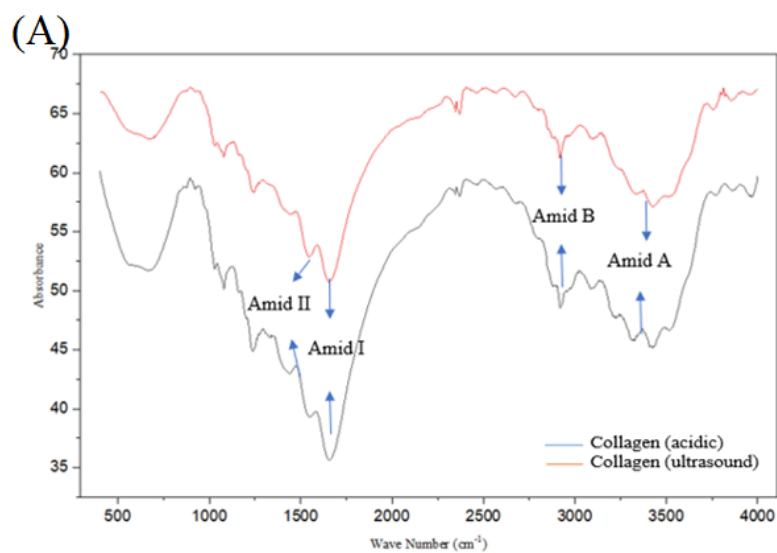
روش تحلیل داده‌ها:

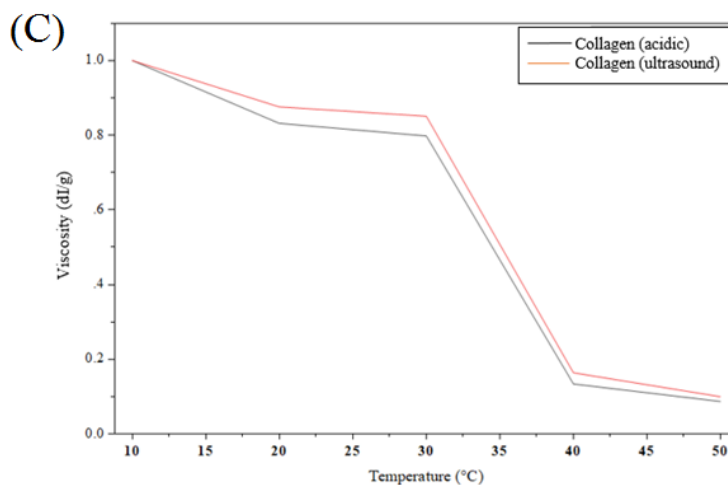
در این پژوهش تمامی اندازه‌گیری‌ها برای هر یک از نمونه‌ها سه بار انجام و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. پس از حصول اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، از آزمون T-test مستقل جهت بررسی وجود و یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین کلاژن استخراج شده به دو روش اسیدی و فراصوت استفاده شد. همچنین به منظور تشخیص وجود و یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف هر یک از نمونه‌های کلاژن استخراج شده، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) در قالب آزمون دانکن استفاده شد. در این آزمون‌ها سطح معنی‌داری، ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم افزارهای Sigma plot و Origin استفاده گردید.

نتایج

بازده استخراج کلاژن با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت به ترتیب ۱/۳۴ درصد و ۲/۱۹ درصد اندازه‌گیری شد. همانطور که واضح است استفاده از روش فراصوت باعث افزایش بازده استخراج کلاژن از استخوان ماهی گالیت در مقایسه با روش اسیدی شده است.

طیف سنجی تبدیل مادون قرمز فوری به منظور شناسایی گروه‌های عاملی و تحلیل تفاوت در ساختار کلاژن استفاده و نتایج آن در شکل ۱A نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود طیف‌های FT-IR در هر دو کلاژن استخراج شده با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت مشابه هستند.





شکل ۱- طیف های FT-IR (A)، گرماسنجی افتراقی (B) و ویسکوزیته (C) کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش های اسیدی و فراصوت

رفتار حرارتی کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت به روش های اسیدی و فراصوت با استفاده از روش گرماسنجی افتراقی اندازه گیری و نتایج در شکل ۱B نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود پایداری حرارتی هر دو کلاژن مشابه بوده و تفاوت های جزئی با هم داشتند. در این شکل، پیک اول (که در نمودار به علت کوچکی قابل مشاهده نیست) نشان دهنده دمای دناتوره شدن واقعی کلاژن استخراج شده از پوست و استخوان بوده که به ترتیب در دماهای ۳۲/۸ و ۳۲ درجه سلسیوس اندازه گیری شد. پیک دوم در کلاژن استخراج شده از پوست و استخوان به ترتیب در محدوده دمایی ۷۰ و ۶۸/۳ درجه سلسیوس مشاهده شد. همانطور که مشاهده می شود کلاژن استخراج شده به روش فراصوت به مقدار جزئی پایداری حرارتی بالاتری نسبت به کلاژن استخراج شده به روش اسیدی داشت.

نتایج ترکیبات تقریبی کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش های اسیدی و فراصوت در جدول ۱ نشان داده شده است. کلاژن استخراج شده با روش فراصوت (۸۱/۶۰ درصد) میزان پروتئین بیشتری از کلاژن استخراجی به روش اسیدی (۷۷/۷۴ درصد) داشت. اما مقادیر چربی، خاکستر و رطوبت در کلاژن استخراج شده به روش اسیدی (به ترتیب ۰/۹۵ درصد، ۱/۵۰ درصد، ۱۱/۸۳ درصد) بیشتر از کلاژن استخراج شده به روش فراصوت (به ترتیب ۰/۸۹ درصد، ۰/۸۵ درصد، ۹/۰۷ درصد) بودند.

جدول ۱- ترکیبات تقریبی و شاخص های رنگ کلاژن های استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش های اسیدی و فراصوت. حروف مختلف لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین کلاژن استخراج شده به روش های اسیدی و فراصوت در هر شاخص هستند.

شاخص	کلاژن استخراجی به روش اسیدی	کلاژن استخراجی به روش فراصوت
رطوبت	۱۱/۸۳±۰/۲۴ ^a	۹/۰۷±۰/۱۶ ^b
پروتئین	۷۷/۷۴±۱/۲۰ ^b	۸۱/۶۰±۰/۴۶ ^a
چربی	۰/۹۵±۰/۰۳ ^a	۰/۸۹±۰/۰۴ ^a
خاکستر	۱/۵۰±۰/۱۸ ^a	۰/۸۵±۰/۱۱ ^b
<i>L</i> *	۶۹/۳۴±۱/۵۲ ^a	۷۱/۴±۰/۹۸ ^a
<i>a</i> *	۴/۶۳±۰/۲۳ ^a	۳/۸۹±۰/۴۱ ^a
<i>b</i> *	۲/۱۴±۰/۱۹ ^a	۲/۷۸±۰/۲۳ ^a

جدول ۲ ترکیب اسیدهای آمینه موجود در کلاژن‌های استخراج شده از استخوان ماهی گالیت به روش‌های اسیدی و فراصوت نشان می‌دهد. محتوی اسیدهای آمینه کل در کلاژن‌های استخراج شده به روش فراصوت (۹۹۹/۹۸ میکروگرم بر میلی گرم) بیشتر از کلاژن استخراجی به روش اسیدی (۸۲۹/۴۰ میکروگرم بر میلی گرم) بودند. کلاژن استخراج شده به روش فراصوت حاوی مجموع اسیدهای آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین در (۲۱۱/۰۱ میکروگرم بر میلی گرم) بیشتری از کلاژن استخراجی به روش اسیدی (۱۸۴/۹۴ میکروگرم بر میلی گرم) بود. در هر دو نمونه کلاژن استخراج شده، اسیدهای آمینه گلیسین، پرولین، آلانین و هیدروکسی پرولین به ترتیب با بیشترین مقدار به عنوان اسید آمینه غالب اندازه‌گیری شده است.

جدول ۲- پروفایل اسیدهای آمینه کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت (میکروگرم بر میلی گرم). * نشان دهنده اسیدهای آمینه ضروری است.

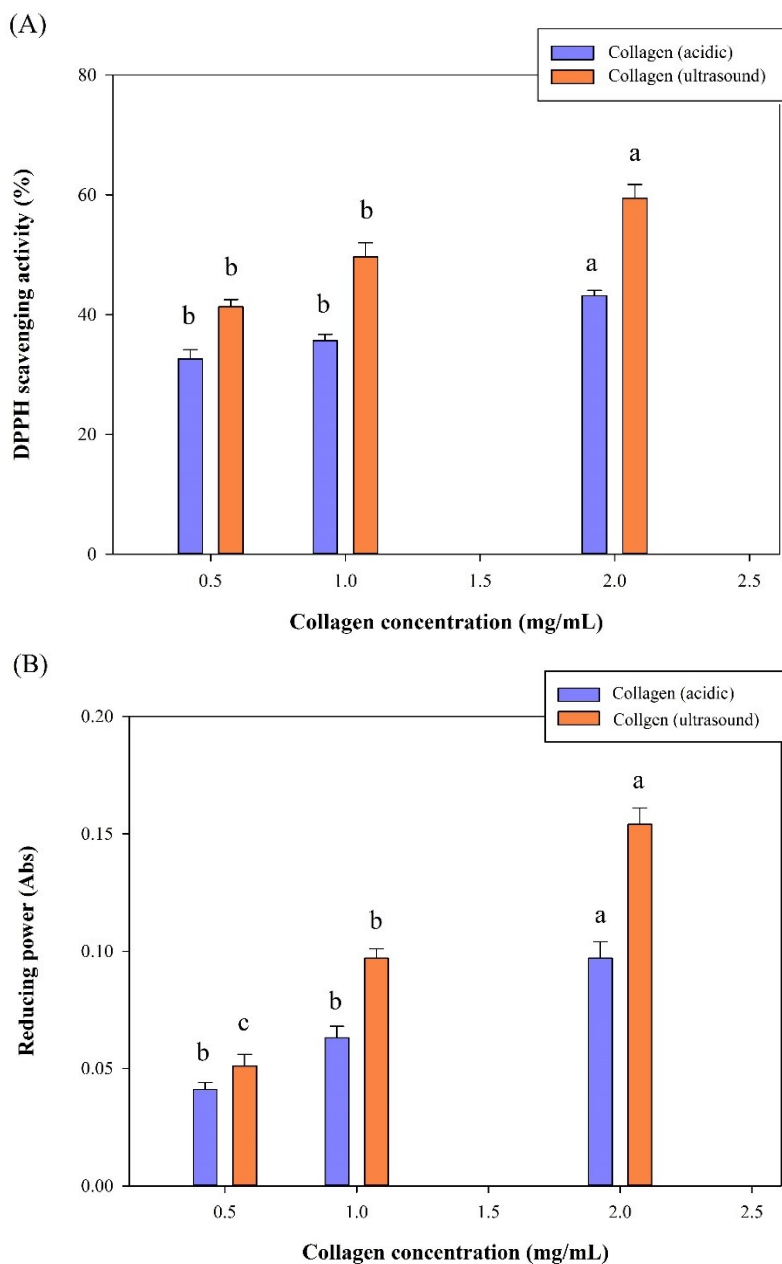
شاخص	کلاژن استخراجی به روش اسیدی	کلاژن استخراجی به روش فراصوت
هیدروکسی پرولین	۷۹/۸۲	۸۹/۱۹
آسپارتیک اسید	۵۳/۴۵	۵۱/۲۳
ترئونین*	۲۵/۴۸	۲۹/۵۲
سرین	۲۲/۱۱	۳۱/۵۶
گلوتامیک اسید	۳۴/۱۸	۳۸/۷۴
پرولین	۱۰۸/۱۲	۱۲۱/۸۲
گلیسین	۲۱۲/۱۵	۳۱۲/۲۵
آلانین	۹۰/۳۱	۹۵/۱۱
والین*	۱۱/۹۲	۱۵/۱۲
متیونین*	۶/۲۳	۹/۱۴
ایزولوسین*	۲۱/۳۵	۲۱/۸۷
لوسین*	۲۲/۸۸	۳۱/۱۴
تیروزین	۲۵/۱۳	۲۶/۲۴
فنیل آلانین*	۲۶/۱۷	۲۹/۱۴
هیستیدین	۱۱/۶۴	۱۲/۱۳
لیزین*	۵۲/۹۸	۵۹/۶۱
آرژینین	۲۵/۴۸	۲۶/۱۷
اسیدهای آمینه کل	۸۲۹/۴۰	۹۹۹/۹۸

ویسکوزیته کلاژن‌های استخراج شده به روش‌های اسیدی و فراصوت در بازه دمایی ۱۰ الی ۵۰ درجه سلسیوس اندازه‌گیری و نتایج آن در شکل ۱C نشان داده شده است. نتایج نشان داد که ویسکوزیته هر دو کلاژن با افزایش دما کاهش یافته است. در هر دو کلاژن، در دماهای بین ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس افت شدیدی در ویسکوزیته مشاهده شد. در این بین، کلاژن استخراج شده به روش فراصوت به مقدار جزئی ویسکوزیته بالاتری نسبت به کلاژن استخراج شده به روش اسیدی داشت.

نتایج سنجش رنگ سطحی نمونه‌های کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت در جدول ۱ نشان داده شده است. این سنجش نشان داد که مقدار شاخص‌های روشنی (L^*)، و زردی (b^*) در کلاژن استخراج شده با استفاده از روش فراصوت بیشتر از کلاژن استخراج شده به روش اسیدی بودند. روند معکوسی برای شاخص قرمزی (a^*) مشاهده شد.

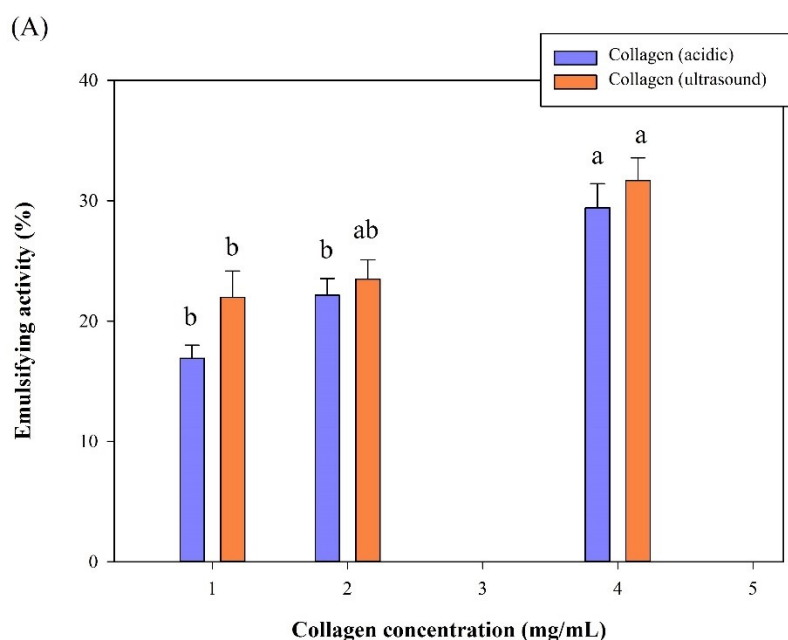
شکل ۳ نتایج ویژگی‌های ضداکسایشی کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت را نشان می‌دهد. میزان فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH بین ۳۲/۶۰ تا ۵۹/۴۳ درصد متغیر بود. در این بین، کلاژن استخراج شده با استفاده از

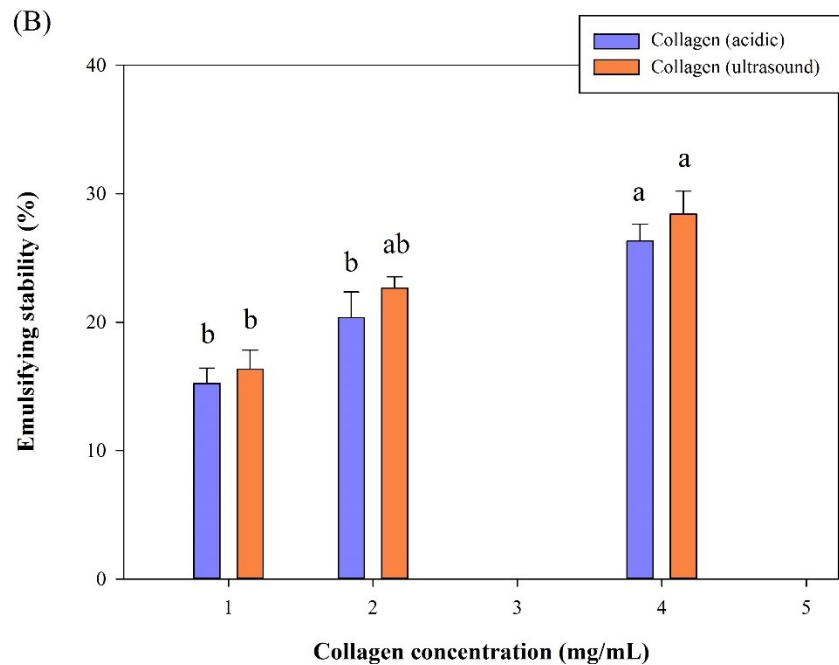
روش فراصوت دارای فعالیت خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH بیشتری از کلاژن استخراجی به روش اسیدی بود. نتایج همچنین نشان داد که میزان خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد هر یک از کلاژن‌ها، وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، افزایش پیدا کرده است (شکل ۲A). شکل ۲B قدرت کاهندگی آهن کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیته را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود کلاژن استخراج شده به دو روش قدرت کاهندگی آهن متفاوتی داشت. میزان قدرت‌های کاهندگی آهن در کلاژن‌های استخراجی بین ۰/۰۴۱-۰/۱۵۴ (جذب) اندازه‌گیری شد. از این بین، کلاژن استخراج شده با استفاده از روش فراصوت در تمامی غلظت‌های استفاده شده، قدرت مهار کنندگی آهن بیشتری داشتند. قدرت مهار کنندگی آهن کلاژن نیز وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت کلاژن، افزایش پیدا کرده است.



شکل ۲- ویژگی‌های ضد اکسایشی کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت. حروف لاتین نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف هر یک از کلاژن‌های استخراج شده به روش اسیدی یا فراصوت هستند.

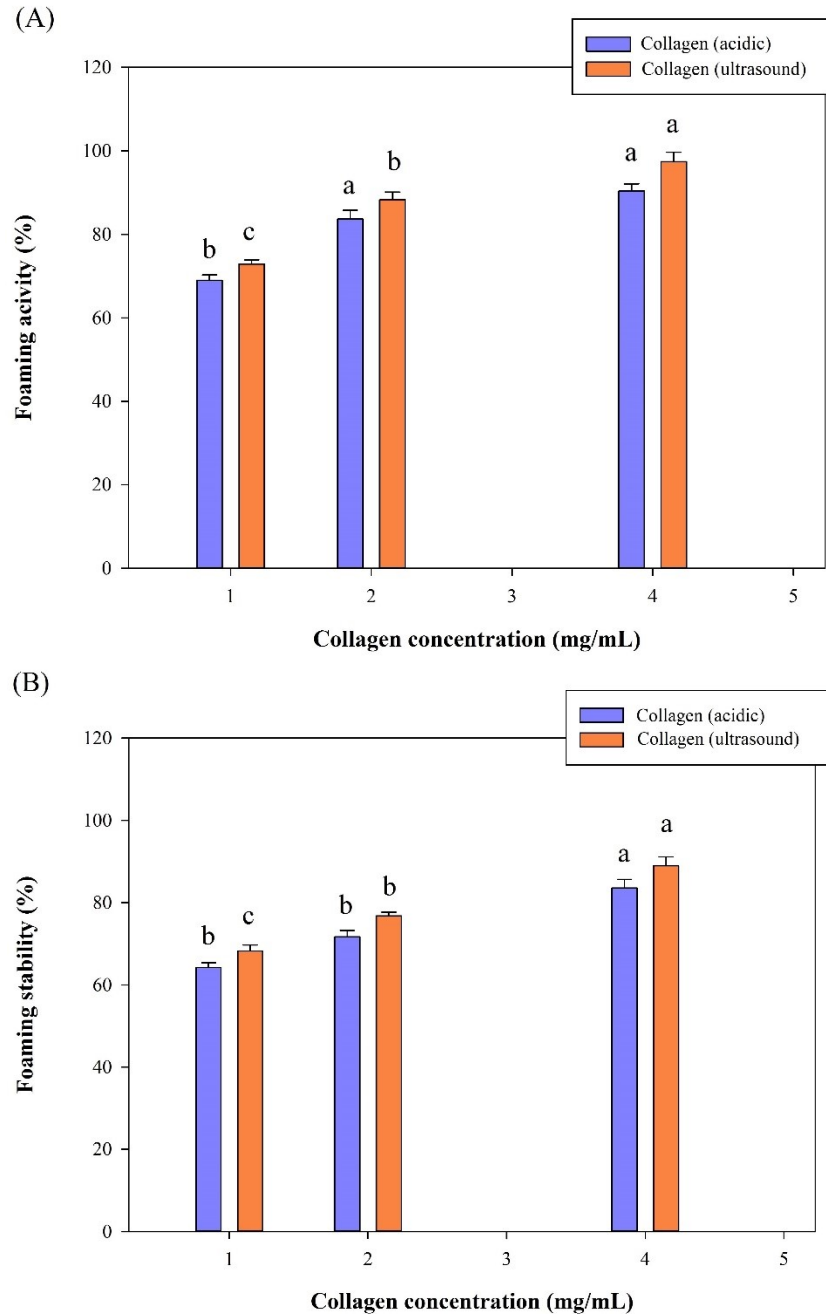
نتایج ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود هر دو کلاژن قادر به امولسیون کردن روغن مورد مطالعه بودند. مقادیر ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون کلاژن صرف نظر از نوع آن به ترتیب ۳۱/۶۷-۱۶/۸۹ درصد و ۲۸/۴۱-۱۵/۲۱ درصد اندازه‌گیری شدند. در این بین، کلاژن استخراج شده با استفاده از روش فراصوت در تمامی غلظت‌ها، ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی بیشتری نسبت به کلاژن استخراجی به روش اسیدی داشت. نتایج همچنین نشان داد که ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی کلاژن نیز وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، افزایش پیدا کرده است.





شکل ۳- ویژگی‌های امولسیون کنندگی کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت. حروف لاتین نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف هر یک از کلاژن‌های استخراج شده به روش اسیدی یا فراصوت هستند.

شکل ۴ نتایج ویژگی‌های کف کنندگی کلاژن‌های استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت را نشان می‌دهد. مقادیر ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف تولید شده کلاژن صرف نظر از نوع آن به ترتیب ۶۸/۹۷-۹۷/۴۱ درصد و ۶۴/۲۱-۸۸/۹۵ درصد اندازه‌گیری شدند. در این بین، کلاژن استخراج شده به روش فراصوت در تمامی غلظت‌ها، ویژگی‌های کف کنندگی بیشتری نسبت به کلاژن استخراجی به روش اسیدی داشت. نتایج همچنین نشان داد که ویژگی‌های کف کنندگی کلاژن نیز وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، افزایش پیدا کرده است.



شکل ۴- ویژگی‌های کف‌کنندگی کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت. حروف لاتین نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف هر یک از کلاژن‌های استخراج شده به روش اسیدی یا فراصوت هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

بازده استخراج کلاژن از استخوان ماهی گالیت در روش فراصوت نسبت به روش اسیدی بیشتر بود. نتایج Petcharat و همکاران (2021) نیز نشان داد که بازده استخراج کلاژن از پوست ماهی *Chitala ornata* در روش فراصوت (۲۷/۱۸-۵۷/۳۵ درصد) بیشتر از روش اسیدی (۲۳/۴۶ درصد) بود (Petcharat et al., 2021). در مطالعه دیگری، Pezeshk و همکاران (2022) نیز گزارش کردند که بکارگیری روش فراصوت (۲۴/۸۶-۵۷/۰۶ درصد) باعث افزایش بازده استخراج کلاژن از پوست تون ماهیان نسبت به روش اسیدی (۲۱/۴۹ درصد) گردید. نتایج مشابهی

نیز توسط Heidari و Rezaei (2022) برای کلاژن استخراج شده از پوست تون زردباله با استفاده از روش فراصوت-آنزیمی گزارش شد. افزایش بازده کلاژن در روش فراصوت می‌تواند به دلیل پدیده کاویتاسیون باشد که طی آن سلول‌های مواد اولیه به طور موثر مختل شده و قدرت مکانیکی، نفوذ حلال‌های استفاده شده (مانند اسید استیک و غیره) جهت استخراج ترکیبات موردنظر را تقویت می‌کند.

کلاژن‌های استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت طیف های FT-IR مشابهی داشتند (شکل ۱A). در این طیف‌ها، پیک‌های مشاهده شده در طول موج $3400-3000\text{ cm}^{-1}$ جایگاه باند آمید A در کلاژن نوع I بوده که به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل و ارتعاشات کششی پیوندهای آزاد N-H در اسیدهای آمینه موجود در ساختار کلاژن ها می‌باشد. پیک‌های ممتد مشاهده شده در طول موج $3400-3440\text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده پیوند هیدروژنی بین گروه‌های N-H هستند (Doyle et al., 1975; Chi et al., 2014). پیک‌های جذبی مشاهده شده در طول موج $2900-3000\text{ cm}^{-1}$ مربوط به موقعیت باند آمید نوع B و پیوندهای ارتعاشی-کششی نامتقارن CH₂ می‌باشد. این پیک همواره در نمونه‌های کلاژن مشاهده می‌شود. پیک‌های مشخص شده در طول موج‌های 1654 ، 1544 و 1239 cm^{-1} به ترتیب با آمید نوع I، آمید نوع II و آمید نوع III مرتبط هستند. در این نتایج، باند آمید نوع I نشان‌دهنده ساختار پیچ خورده کلاژن و آمید نوع III حضور ساختار مارپیچی در کلاژن استخراج شده را نشان می‌دهد (Liu et al., 2016). در واقع پیک آمید نوع I مربوط به ارتعاشات کششی گروه کربونیل (C=O) در اطراف محور اصلی و نشان‌دهنده وضعیت ساختمان دوم پلی پپتید کلاژن است. باند آمید نوع II به ترتیب در محدوده 1545 cm^{-1} مشاهده شد. پیک‌های تشکیل شده در این محدوده نشان‌دهنده درگیری گروه‌های N-H با باندهای α -Chains پروتئین‌های مجاور می‌باشد. پیک‌های تشکیل شده در محدوده $536-590$ و 592 cm^{-1} ناشی از کشش‌های اسکلتی در گروه‌های غیرعاملی می‌باشد. در مجموع پیک‌های تشکیل شده در مطالعه حاضر مشابه پیک‌های تشکیل شده در سایر مطالعات انجام شده در استخراج کلاژن از پوست و استخوان آبزیان می‌باشد (Liu et al., 2016; Kumar et al., 2012).

همانطور که در شکل ۱B نشان داده شد پایداری حرارتی کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش‌های اسیدی و فراصوت مشابه بود. در این رابطه، دماهای حدود 32 درجه سلسیوس مربوط به دمای دناتوره شدن واقعی کلاژن و دماهای $68/3$ و 70 سلسیوس دماهای تغییر حالت کلاژن از جامد به مایع و تخریب مواد هستند (Pezeshk et al., 2022). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شد، دماهای دناتوره شدن و تخریب کلاژن استخراج شده به روش فراصوت مقداری بیشتر از کلاژن استخراج شده به روش اسیدی اندازه گیری شدند. پایداری حرارتی کلاژن استخراج شده بر اساس نوع گونه و شرایط استخراج متفاوت بوده و مستقیماً تحت تاثیر محتوی اسیدهای آمینه می‌باشد. به طوری که هرچه محتوی اسیدهای آمینه بیشتر باشد ساختار کلاژن استخراج شده پایدارتر خواهد بود. اسیدهای آمینه با استفاده از حلقه‌های پیرولیدین پرولین و هیدروکسی پرولین ساختار دوم پروتئین را پایدارتر می‌کنند (Benjakul et al., 2010). همچنین گروه‌های عاملی هیدروکسیل در اسیدهای آمینه هیدروکسی پرولین به واسطه پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌ای و مستقیم با گروه‌های کربونیل ساختار مارپیچ سه گانه پروتئین را حفظ می‌کنند. تفاوت در مقدار هیدروکسی پرولین بین گونه‌ها به محیط زیست و دمای بدن آنها بستگی دارد. در بررسی پروفایل اسیدهای آمینه مطالعه حاضر مشخص شد که میزان اسیدهای آمینه کل و همچنین اسید آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین در کلاژن استخراج شده به روش فراصوت بیشتر از کلاژن استخراج شده به روش اسیدی بود (جدول ۲). این نتایج با نتایج آزمون گرماسنجی افتراقی (DSC) همخوانی دارد.

نتایج سنجش ترکیبات تقریبی نشان داد که هر دو کلاژن استخراجی حاوی مقادیر بالایی از پروتئین و مقادیر کم چربی، رطوبت و خاکستر هستند (جدول ۱). کم بودن مقادیر خاکستر و چربی در کلاژن استخراج شده در مطالعه حاضر نشان دهنده تاثیر حذف مواد آلی و چربی از مواد اولیه در حین مراحل مختلف استخراج می‌باشد. نتایج همچنین کلاژن استخراج شده به روش فراصوت میزان پروتئین بیشتری از کلاژن استخراجی به روش اسیدی داشتند. اما مقادیر چربی، خاکستر و رطوبت در کلاژن استخراج شده به روش اسیدی بیشتر بودند. کلاژن استخراج شده از فلس ماهی *Pseudosciaena crocea* نیز حاوی مقادیر بالای پروتئین ($93/56$ درصد) و مقادیر کم رطوبت ($4/52$ درصد)، چربی ($0/43$ درصد) و

خاکستر (۱/۰۳ درصد) بود (Wang et al., 2013). در مطالعه دیگری جوکار و همکاران نیز نتایج مشابهی برای کلاژن‌های استخراج شده از پوست و استخوان ماهی هوور دم دراز (*Thunnus tonggol*) گزارش شد (Jokar et al., 2014). تفاوت در ترکیبات تقریبی کلاژن استخراج شده از مواد اولیه و گونه‌های مختلف آبزیان می‌تواند در نتیجه تاثیر نوع گونه، ویژگی‌های ذاتی مواد اولیه، نوع روش استخراج و شرایط خالص‌سازی باشد (Shon et al., 2011).

محتوی کل اسیدهای آمینه به ویژه اسیدهای آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین شاخص بسیار مهمی در درجه بندی کلاژن هستند. در مطالعه حاضر محتوی اسیدهای آمینه کل، اسیدهای آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین در کلاژن‌های استخراج شده به روش فراصوت بیشتر اندازه‌گیری شدند (جدول ۲). Pezeshk و همکاران (2022) نیز گزارش کردند که محتوی اسیدهای آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین در کلاژن استخراج شده از پوست تون ماهیان در نتیجه افزایش مدت زمان تابش فراصوت، افزایش نشان دادند. اما با این حال، Petcharat و همکاران (2021) نشان دادند که محتوی هیدروکسی پرولین کلاژن استخراج شده به روش فراصوت نسبت به روش معمول اسیدی کاهش یافت. در مطالعه حاضر اسیدهای آمینه گلیسین، پرولین، آلانین، هیدروکسی پرولین و آسپارتیک اسید، اسیدهای آمینه غالب در کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت به دو روش، بودند. اسیدهای آمینه غالب در کلاژن استخراج شده از پوست و استخوان ماهی *O. niger* گلیسین، پرولین و آلانین بودند (Muralidharan et al., 2013). علت این تفاوت‌ها می‌تواند به علت روش استخراج، نوع گونه، زیستگاه گونه به ویژه دمای آن مرتبط باشد (Pezeshk et al., 2022).

شاخص ویسکوزیته یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های فیزیکی کلاژن استخراج شده از منابع مختلف است. کلاژن یک ماده حساس به حرارت بوده و ویسکوزیته آن به طور قابل توجهی وابسته به دما می‌باشد (Tong et al., 2023). همانطور که در شکل ۱c نشان داده شده است، با افزایش دما میزان ویسکوزیته هر دو کلاژن کاهش یافت. همچنین میزان ویسکوزیته در هر دو نمونه کلاژن استخراج شده در دمای ۳۰ الی ۴۰ درجه سلسیوس به طور قابل توجهی کاهش یافت. این کاهش نشان‌دهنده دمای دناتوراسیون کلاژن در حالت محلول است (Pezeshk et al., 2022). این نتایج با نتایج گرماسنجی افتراقی (شکل ۱b) همخوانی دارد. تحقیقات گذشته نشان داده که کلاژن مانند سایر پروتئین‌ها در دمای بالای ۴۰ درجه سلسیوس مستعد دناتوره شدن است (Martínez et al., 2015). در مطالعه Pezeshk و همکاران (2022) دمای دناتوره شدن کلاژن استخراج شده از پوست تون ماهیان به روش فراصوت بین دمای ۲۸/۱-۳۲/۲۰ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد. Huang و همکاران (2011) نیز گزارش کردند که ویسکوزیته استخراج کلاژن از پوست ماهی *Diodon holocanthus* با استفاده از آنزیم پیسین در محدوده دمایی بین ۲۵ الی ۳۲ درجه سلسیوس کاهش نشان داد (Huang et al., 2011). این نتایج نشان می‌دهد که پایداری حرارتی کلاژن استخراج شده در مطالعه حاضر مقداری بیشتر از کلاژن استخراج شده از پوست تون ماهیان و ماهی *D. holocanthus* می‌باشد. تفاوت در ویسکوزیته کلاژن از منابع مختلف می‌تواند ناشی از میانگین وزن مولکولی و توزیع اندازه ذرات باشد. در این رابطه Martinez و همکاران (2015) نتیجه‌گیری کردند که میزان ویسکوزیته با میزان هیدروکسی پرولین نمونه‌ها و در نهایت دمای دناتوراسیون مرتبط می‌باشد. در مطالعه حاضر، میزان اسید آمینه هیدروکسی پرولین در نمونه استخراج شده به روش فراصوت بیشتر اندازه‌گیری شد که ممکن است باعث افزایش ویسکوزیته شده باشد. مشابه این نتایج، Heidari و Rezaei (2022) گزارش کردند که روش فراصوت باعث افزایش ویسکوزیته کلاژن استخراج شده از پوست ماهی تون زردباله گردید.

در مطالعه حاضر کلاژن استخراج شده از استخوان گالیت به روش فراصوت دارای فعالیت خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH (۴۱/۳۲-۵۹/۴۳ درصد) و قدرت کاهندگی (۰/۵۱-۰/۱۵۴ جذب) بیشتری از کلاژن استخراجی به روش اسیدی (۳۲/۶۰-۴۳/۱۷ درصد و ۰/۰۹۷-۰/۰۴۱ جذب) بود (شکل ۲). Rezaei و Heidari (2022) نیز گزارش کردند که تیمار فراصوت و افزایش مدت زمان تابش فراصوت باعث افزایش توانایی مهار رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاکنندگی آهن کلاژن استخراج شده از پوست ماهی تون زرد باله شد. Abbasi و همکاران (2021) مقادیر خنثی کنندگی رادیکال DPPH کمتری برای کلاژن استخراج شده از پوست طوطی ماهی به روش اسیدی (۳۴/۴۵ درصد در غلظت ۰/۱

مولار) را گزارش کردند. به طور کلی وزن مولکولی و ترکیب اسیدهای آمینه تاثیر زیادی بر میزان فعالیت ضد اکسایشی کلاژن دارد. در این رابطه Chi و همکاران (2014) گزارش کردند که کلاژن دارای وزن مولکولی کمتر فعالیت خنثی کنندگی رادیکال‌های بیشتری داشتند و بالعکس. کلاژن به دلیل ویژگی‌های فعال سطحی خود می‌تواند بعنوان عامل امولسیون کننده در کاربردهای غذایی، دارویی، پزشکی و غیره مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعه حاضر، کلاژن استخراج شده به روش فراصوت در تمامی غلظت‌ها، ویژگی‌های امولسیون کنندگی بیشتری نسبت به کلاژن استخراجی به روش اسیدی داشت (شکل ۳). Pezeshk و همکاران (2022) نیز گزارش کردند که ویژگی‌های امولسیون کنندگی کلاژن استخراج شده از پوست تون ماهیان در روش اسیدی در نتیجه استفاده از تابش پرتوهای فراصوت بهبود یافت. نتایج مشابهی نیز توسط Heidari و Rezaei (2022) برای تاثیر تیمار فراصوت بر افزایش میزان ویژگی‌های امولسیون کنندگی کلاژن استخراج شده از پوست تون زردباله با استفاده از روش آنزیمی گزارش شد. به طور کلی عوامل مختلفی در میزان ویژگی‌های امولسیون کنندگی کلاژن موثر هستند. اندازه ذرات (Particle size) پروتئینی پراکنده شده یکی از این عوامل می‌باشد. Hu و همکاران (2023) عنوان کردند که مواد با اندازه کوچکتر به دلیل افزایش ظرفیت جذب پروتئین روی قطرات روغن، عملکرد امولسیون کنندگی بهتری خواهند داشت. محیط‌های اسیدی و قلیایی نیز می‌توانند گروه‌های عاملی لیپوفیلیک کلاژن را نمایان کرده و در نتیجه فعالیت امولسیون کنندگی آن را بهبود بخشند. در این رابطه Klompong و همکاران (2007) گزارش دادند که در شرایط بسیار اسیدی یا قلیایی، پروتئین‌ها حلالیت بیشتری داشته و زنجیره‌های پپتیدی به راحتی به سطح مشترک روغن-آب منتقل شده و در نتیجه امولسیون کنندگی بیشتری ایجاد می‌شود. نتایج عباسی و همکاران (۱۴۰۰) همچنین نشان داد که ویژگی‌های امولسیون کنندگی کلاژن استخراج شده از پوست طوطی ماهی در pH ۴ به طور معنی‌داری بیشتر از مقادیر آن در pH ۷ و ۱۰ بود. عامل بعدی موثر در میزان ویژگی‌های امولسیون کنندگی، وزن مولکولی می‌باشد. بطور کلی وزن مولکولی با میزان ویژگی‌های امولسیون کنندگی رابطه مستقیم دارد. در این رابطه ترکیبات یا پپتیدهای با وزن مولکولی پایین‌تر ممکن است به اندازه کافی آمفی‌فیلیک نباشند تا ویژگی‌های امولسیون کنندگی خوبی از خود نشان دهند. همچنین پلی‌پپتیدهای بزرگ‌تر و طولی‌تر می‌توانند فیلم پروتئینی را در سطح مشترک به طور مؤثرتری تثبیت کنند (Klompong et al., 2007). Jridi و همکاران (2014) نیز همبستگی مثبتی بین وزن مولکولی و ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون ژلاتین گزارش کردند. با این وجود Rahali و همکاران (2000) نتیجه گرفتند که خاصیت آمفی‌فیلیک برای ویژگی امولسیون از طول پپتید مهم‌تر است. علاوه بر این، انعطاف‌پذیری ساختار پروتئین یا پپتید نیز می‌تواند یک عامل حیاتی در تعیین ویژگی امولسیون کنندگی باشد. در این رابطه هر چه محتوی اسیدهای آمینه آبگریز و ایمینواسیدها (پرولین و هیدروکسی پرولین) بیشتر باشد ویژگی‌های امولسیون کنندگی بیشتر خواهد بود. از این رو در مطالعه حاضر نیز کلاژن استخراج شده به روش فراصوت به دلیل محتوی بالاتر ایمینواسیدها (جدول ۲)، ویژگی‌های امولسیون کنندگی بیشتری داشت. پیشتر Chi و همکاران (2016) نیز نتایج مشابهی برای کلاژن استخراج شده از پوست کوسه ماهی *Sphyrna lewini* (که حاوی مقادیر بیشتر ایمینواسیدها بود) نسبت به کلاژن استخراج شده از پوست سفره ماهیان *Dasyatis akjei* و *Raja porosa* گزارش کردند. علاوه بر اینها، در مطالعه حاضر افزایش ویژگی‌های امولسیون کنندگی کلاژن استخراج شده به روش فراصوت می‌تواند به علت باز شدن ساختار فضایی و در دسترس قرار دادن گروه‌های آبگریز کلاژن در نتیجه تابش فراصوت به مدت ۲۰ دقیقه، باشد.

ویژگی‌های کف کنندگی در کلاژن استخراج شده از استخوان ماهی گالیت با استفاده از روش فراصوت بیشتر اندازه‌گیری شدند (شکل ۴). به طور کلی ویژگی‌های کف کنندگی کلاژن استخراج شده از منابع مختلف می‌توانند تحت تاثیر عواملی مانند اندازه، بار سطحی، آبگریزی سطح و انعطاف‌پذیری کلاژن باشد (Li et al., 2009). در این رابطه پپتیدهای کلاژن با اندازه بزرگتر می‌توانند تشکیل یک لایه پایدار در اطراف حباب‌های گاز را افزایش داده و از این رو توانایی کف کنندگی افزایش می‌یابد (Souissi et al., 2007). اما با این حال Klompong و همکاران (2007) و Chi و همکاران (2016) گزارش کردند که ویژگی‌های کف کنندگی کلاژن با افزایش درجه هیدرولیز، کاهش یافتند.

عامل بعدی موثر در میزان پایداری کف تشکیل شده، ترکیب اسیدهای آمینه است. در این راستا هر چه میزان اسیدهای آمینه پرولین و لیزین بیشتر باشد برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین از طریق پیوندهای هیدروژنی بیشتر شده و در نتیجه شبکه‌ای متراکم‌تر ایجاد می‌شود که به تثبیت کف کمک می‌کند (Chi et al., 2016). همچنین اسیدهای ایمینو (پرولین و هیدروکسی پرولین) به دلیل ساختار حلقوی مستحکم خود ناشی از حلقه پیرولیدین، می‌توانند موجب درجه‌ی قابل توجهی از استحکام مولکولی شوند. از این رو، ترکیبات حاوی محتوی بالای اسیدهای ایمینو در مقایسه با نمونه‌های مشابه خود، پایداری کف بیشتری خواهند داشت (Klompong et al., 2007). در این راستا، در مطالعه حاضر کلاژن استخراج شده به روش فراصوت که حاوی اسیدهای آمینه پرولین، لیزین و هیدروکسی پرولین بیشتری نسبت به کلاژن استخراج شده به روش اسیدی بود (جدول ۲)، ویژگی‌های کف‌کنندگی بیشتری نشان داد.

نتیجه‌گیری نهایی

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از روش فراصوت باعث افزایش بازده استخراج، پایداری حرارتی، ویسکوزیته، ویژگی‌های ضد اکسایشی، امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی کلاژن از استخوان ماهی گالیت در مقایسه با روش اسیدی گردید. طیف‌های FT-IR و گروه‌های عاملی هر دو کلاژن استخراج شده، مشابه بودند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان صمیمانه از کلیه همکاران و متخصصانی که در مراحل مختلف این تحقیق یاری رساندند، قدردانی می‌کنند.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: امیر رضائی: نمونه‌برداری، انجام کارهای آزمایشگاهی، فراهم آوردن داده‌ها. مهدی آل‌بوفتیه: استاد راهنما، ارائه طرح پژوهش، تجزیه و تحلیل داده‌ها، تصحیح و ویرایش نسخه نهایی. سمیرا جدی: نوشتن نسخه اولیه مقاله، آنالیز آماری.

منابع

- Abbasi S, Naghdi S, Nadoshan R.M. 2021 Evaluation of the effect of acidic and enzymatic extraction methods on collagen recovery from parrot fish (*Scarus ghobban*) skin and evaluation of their structural, chemical, antioxidant and functional properties. J. Aquac. Sci. 9(16): 213-228. (In Persian).
- AOAC, AOAC-Association of official analytical chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International 18th ed, Gaithersburg, Maryland, USA 45, (2005.) 75-76.
- Akram A.N, Zhang C. 2020. Extraction of collagen-II with pepsin and ultrasound treatment from chicken sternal cartilage; physicochemical and functional properties. Ultrason. Sonochem. 64: 105053.
- Benjakul S, Thiansilakul Y, Visessanguan W, Roytrakul S, Kishimura H, Prodpran T, Meesane J. 2010. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). J. Sci. Food Agric. 90: 132-138.
- Chi C.F, Cao Z.H, Wang B, Hu F.Y, Li Z.R, Zhang B. 2014. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. Molecules 19(8): 11211-11230.
- Chi C, Hu F, Li Z, Wang B, Luo, H. 2016. Influence of Different Hydrolysis Processes by Trypsin on the Physicochemical, Antioxidant, and Functional Properties of Collagen Hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei*, and *Raja porosa*. J. Aquat. Food Prod. Technol. 25(5): 616-632.
- Doyle B.B, Bendit E.G, Blout E.R. 1975. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. Biopolymers: Original Research on Biomolecules. Biopolymers 14(5): 937-957.

- Göçer M. 2022. Extraction and characterization of collagen from the skin and bone of shababout (*Arabibarbus grypus* Heckel, 1843). Iranian J. Fish. Sci. 21(3): 671-687.
- Hu G, Li X, Su R, Corazzin M, Liu X, Dou L, Sun L, Zhao L, Su L, Tian J, Jin Y. 2023. Effects of ultrasound on the structural and functional properties of sheep bone collagen. Ultrason. Sonochem. 95: 106366.
- Hajiani E, Osfouri S. 2021. Extraction and Purification of Collagen from the Jellyfish *Catostylus mosaicus* of the Persian Gulf. Iran South Med. J. 24(2): 88-100. (In Persian)
- Heidari M.G, Rezaei M. 2022. Extracted pepsin of trout waste and ultrasound-promoted method for green recovery of fish collagen. Sustain. Chem. Pharm 30: 100854.
- Huang Y.R, Shiao C.Y, Chen, H.H, Huang, B.C. 2011. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). Food Hydrocoll. 25(6): 1507-1513.
- Jridi M, Lassoued I, Nasri R, Ayadi M. A, Nasri M, Souissi N. 2014. Characterization and potential use of cuttlefish skin gelatin hydrolysates prepared by different microbial proteases. Biomed Res. Int. 1-14.
- Jokar, S.H, Kamrani E, Salarzadeh A, Zare, D.N. 2014. Extraction of collagen from *hunnus tonggol* by-products (skin, bone and fins). J. Oceanogr. 17: 75-82. (In Persian)
- Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chem. 102: 1317-1327,
- Kumar S.N.S, Nazeer R.A., Jaiganesh R, N. 2012. Wound healing properties of collagen from the bone of two marine fishes. Int. J. Pept. Res. Ther. 18: 185-192.
- Liu H, Huang K. 2016. Structural characteristics of extracted collagen from tilapia (*Oreochromis mossambicus*) bone: effects of ethylenediaminetetraacetic acid solution and hydrochloric acid treatment. Int. J. Food Prop. 19(1): 63-75.
- Li D, Mu C, Cai S, Wei L. 2009. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. Ultrason. Sonochem.16: 605-609.
- Malekshah E.G, Rezaei M, Shahab Naghdi S, Tahergorabi. 2025. Eco-friendly extraction of collagen from beluga sturgeon skin using ultrasound-assisted deep eutectic solvents: efficiency and characterization. Food Chem.30: 102988.
- Medina-Medrano J.R, Quinones-Munoz T.A, Arce-Ortiz A, Torruco-Uco J.G, Hernandez-Martinez R, Lizardi-Jimenez M.A, Varela-Santos E. 2019. Antioxidant Activity of Collagen Extracts Obtained from the Skin and Gills of *Oreochromis* sp. J. Med. Food. 1-7.
- Muralidharan N, Shakila R.J, Sukumar D, Jeyasekaran G. 2013. Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. J. Food Sci. Technol. 50(6):1106-1113.
- Martínez M.A, Hernández-Fuentes A.D, Pimentel-González D.J, Campos-Montiel R.G, Vargas-Torres A, Aguirre-Álvarez G. 2015. Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: partial characterization. CYTA. J. Food. 13(2): 253-258.
- Nurilmala M, Hizbullah H.H, Karnia E, Kusumaningtyas E, Ochiai Y. 2020. Characterization and Antioxidant Activity of Collagen, Gelatin, and the Derived Peptides from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Skin. Mar. Drugs 18: 98.
- Nagai T, Suzuki N. 2000. Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. Food Chem. 68(3): 277 – 281.
- Petcharat T, Benjakul S, Karnjanapratum S, Nalinanon S. 2021. Ultrasound-assisted extraction of collagen from clown featherback (*Chitala ornata*) skin: yield and molecular characteristics. J Sci Food Agric 101(2): 648-658
- Pezeshk S, Rezaei M, Abdollahi M. 2022. Impact of ultrasound on extractability of native collagen from tuna by-product and its ultrastructure and physicochemical attributes. Ultrason. Sonochem. 89: 106129.

-
- Rahali V, Chobert JM, Haertle T, Gueguen J. 2000. Emulsification of chemical and enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin: Characterization of the peptides adsorbed at the interface. *Nahrung*. 44: 89–95.
- Souissi N, Bougatef A, Triki-Ellouz Y, Nasri M. 2007. Biochemical and functional properties of *Sardinella* (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technol. Biotechnol.* 45(2): 187–194.
- Shon J, Eo J.H, Hwang S.J, Eun J.B. 2011. Effect of processing conditions on functional properties of collagen powder from skate (*Raja kenojei*) skins. *Food Technol. Biotechnol.* 20: 99–106.
- Wang S, Hou H, Hou J, Tao Y, Lu Y, Yang X, Li B. 2013. Characterization of acid-soluble collagen from bone of pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 22(4): 407-420.
- Wu K, Li Y, Chen J. 2024. Effect of pH on the Structure, Functional Properties and heological Properties of Collagen from Greenfin Horse-Faced Filefish (*Thamnaconus septentrionalis*) Skin. *Mar. Drugs* 22: 45.
- Zargar M, Shabanpour B, Pourashouri P, Neyshabouri E.Z. 2022. Extraction of acid-soluble and pepsin-soluble collagens from common carp scales (*Cyprinus carpio*) and determination of their characteristics. *Iranian Food Sci. Technol. Res. J.* 18(5): 740-749.
- Tong Q, Zhao W, Guo T, Wang D, Dong X. 2023. A study of the gelatin low-temperature deposition manufacturing forming process based on fluid numerical simulation. *Foods* 12(14): 1–20 (2687).