INFORMATICS IN BIOLOGY, HEALTH, AND FOOD

Interdisciplinary Explorations in Life Science

Volume 1 Number 1, Dec. 2024 DOI: 10.22034/ibhf.2024.483712.1009

Original Article

Investigating the Antibacterial and Antioxidant Effects of Hydrolyzed Collagen on Gram-positive and Gram-negative Bacteria

Zahra Mohammadzadeh

Parshan Tos Azma Company, Mashhad health science and Technology Park-Bu Ali Research -Institute, Mashhad, Iran.

Received: 2024/10/15 **Accepted:** 2024/12/05 **Online Published:** 2024/12/05

Abstract

Hydrolyzed collagen is a form of collagen broken down into smaller peptide chains. In this study, the antibacterial and antioxidant properties of hydrolyzed collagen derived from fish skin and chicken feet were investigated. Collagen was extracted using an acidic method, and its quality was assessed through FTIR, biuret, ash content, and Kjeldahl tests. Antibacterial effects on Gram-positive and Gram-negative bacteria were evaluated using the disc diffusion method, while antioxidant activity was assessed via the DPPH assay. The results revealed that the extraction efficiency of collagen was 2.5% for fish skin and 2.1% for chicken feet. FTIR analysis confirmed the presence of amide bands A, I, II, and III, while the biuret test validated the presence of proteins in the collagen. Antioxidant activity increased with higher collagen concentrations: at 100 ppm, 31% of DPPH radicals were inhibited, and at 500 ppm, the inhibition reached 58%. Additionally, hydrolyzed collagen at a concentration of 50 mg/mL exhibited significant antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. These findings suggest that hydrolyzed collagen possesses notable antioxidant and antibacterial properties and may have potential anti-cancer effects.

Keywords: Collagen, Antioxidant, Antibacterial, Waste, Fish, Chicken

Cite this article: Mohammadzadeh Z. Investigating the antibacterial and antioxidant effects of hydrolyzed collagen on gram-positive and gram-negative bacteria. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2024;1(1):71-80.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education

Corresponding author: Zahra Mohammadzadeh **Email**: zahramohammadzadeh516@gmail.com

انفورماتیک در زیست‌شناسی، بهداشت و غذا

کاوش‌های بین رشته‌ای در علوم زیستی

دوره: ۱، شماره ۱، آذر ۱۴۰۳

DOI: 10.22034/ibhf.2024.483712.1009

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات آنتی باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی کلاژن هیدرولیز شده بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

زهرا محمدزاده

شرکت پرشان توس آزما، پارک علم و فناوری سلامت-پژوهشکده بوعلی، مشهد، ایران

دریافت: ۱۴۰۳/۷/۲۴ **پذیرش:** ۱۴۰۳ /۹/۱۵ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۳/۹/۱۵

چکیده

کلاژن هیدرولیز شده، فرمی از کلاژن است که به زنجیره‌های کوچک‌تر پپتیدی تجزیه می‌شود. در مطالعه حاضر، اثرات آنتی باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی و پای مرغ بررسی شد. کلاژن با روش اسیدی استخراج شد و کیفیت آن از طریق تست‌های طیف‌سنجی مادون‌قرمز، بیوره، خاکستر وکجلدال ارزیابی گردید. اثرات ضد باکتریایی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از طریق دیسک دیفیوژن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن با روش ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بررسی شد. نتایج نشان داد که بازده استخراج کلاژن از پوست ماهی دو و نیم درصد و از پای مرغ دو و یک‌دهم درصد بود. تست طیف‌سنجی مادون‌قرمز حضور آمیدهای A، I، II، III را تأیید کرد،همچنین تست بیوره وجود پروتئین در کلاژن را نشان داد. با افزایش غلظت کلاژن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت، به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ppm، ۳۱ درصد و در غلظت ۵۰۰ppm، ۵۸ درصد رادیکال دی فنیل-۲،۲-۱-پیکریل هیدرازیل مهار شد. همچنین کلاژن هیدرولیز شده در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، فعالیت ضد باکتریایی موثری بر باکتری‌های گرم مثبت و منفی نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که کلاژن هیدرولیز شده دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و آنتی باکتریایی بوده و احتمالاً می‌تواند درزمینه‌درمانی ازجمله اثرات ضدسرطانی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کلاژن، آنتی‌اکسیدان، آنتی باکتری، ضایعات؛ ماهی، مرغ

Cite this article: Mohammadzadeh Z. Investigating the antibacterial and antioxidant effects of hydrolyzed collagen on gram-positive and gram-negative bacteria. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2024;1(1):71-80.
Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education.
Corresponding author: Zahra Mohammadzadeh **Email**: zahramohammadzadeh516@gmail.com

مقدمه

کلاژن پروتئینی ساختاری است که در بافت‌های پیوندی و محیط خارج سلولی موجودات یافت می‌شود و نقش مهمی در حفظ استحکام بافت‌ها ایفامی‌کند. کلاژن هیدرولیز شده، فرم پپتیدی این پروتئین است که به زنجیره‌های کوچک‌تر شکسته شده و جذب آن توسط بدن آسان‌تر می‌باشد (۱). این پروتئین نامحلول، با ساختار مارپیچ سه‌گانه، در بافت‌های همبند مانند پوست، استخوان و غضروف وجود داشته و توسط پیوندهای هیدروژنی پایدار می‌ماند (۲،۳). رادیکال‌های آزاد که به دلیل عواملی مانند ورزش و آلودگی ایجاد می‌شوند، می‌توانند به سلول‌ها آسیب برسانند. آنتی‌اکسیدان‌ها با خنثی کردن این رادیکال‌ها از آسیب سلولی جلوگیری می‌کنند (۴).

استخراج کلاژن از ضایعاتی مانند پوست ماهی و پای مرغ به تولید محصولات آنتی باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی کمک می‌کند و به دلیل زیست سازگاری بالای کلاژن، در محصولات غذایی و دارویی نیز کاربرد دارد (۵). کلاژن ماهی، نوعی کلاژن هیدرولیز شده است که به دلیل ویژگی‌هایی مانند خلوص بالا و جذب آسان در محصولات آرایشی و مکمل‌های غذایی برای بهبود سلامت پوست، مو و مفاصل به کار مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰،۱۱).کلاژن پای مرغ نیز به دلیل ویژگی‌های فیزیکی مانند استحکام کششی و زیست سازگاری برای کاربردهای صنعتی و دارویی استخراج می‌شود (۱۲،۱۳). باکتری‌های گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۵،۱۶) و گرم منفی مانند *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۷) ازجمله میکروارگانیسم‌هایی هستند که می‌توانند به عفونت منجر شوند. هدف از این تحقیق بررسی اثرات آنتی باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی کلاژن هیدرولیز شده بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد.

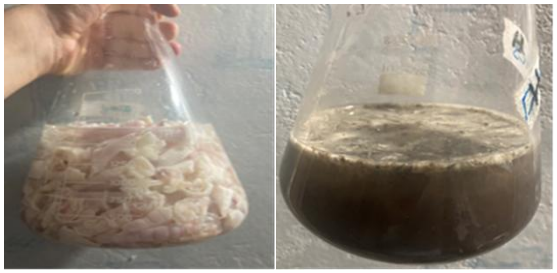
مواد و روش‌ها

تهیه و احیای سویه‌های استاندارد میکروبی و آماده‌سازی جهت کشت

به منظور انجام تست ضد میکروبی بر روی کلاژن به دست آمده از این پژوهش، سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*،*کلبسیلاپنومونیه* و *اشرشیاکلی* به‌صورت آمپول لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری گردید. جهت فعال‌سازی باکتری‌ها، ابتدا طبق دستورالعمل و در شرایط استریل سر آمپول شکسته شد. به‌وسیله ی یک پیپت استریل در حدود ۴ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت براث به درون آمپول اضافه شده و مخلوط گردید. سوسپانسیون آماده شده، درون لوله حاوی محیط کشت مایع (نوترینت براث) و محیط جامد اختصاصی انتقال یافت. پس از کشت خطی، محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت تا ۴۸ ساعت انکوبه شدند.

روش استخراج کلاژن

در این مطالعه، استخراج کلاژن از دو نوع بافت جانوری، پای مرغ و پوست ماهی انجام شد. ابتدا بافت‌ها با آب سرد شست‌وشو داده شده و به تکه‌های ۱×۱سانتیمتری برش داده شدند. در ادامه ۲۰۰ گرم از هر بافت به نسبت ۱:۲ در محلول سدیم هیدروکسید ۰/۵ نرمال غوطه‌ور شدند. محلول هر دو ساعت تعویض گردید و این فرآیند چهار نوبت تکرار گردید.



شکل ۱: شست‌وشو قطعات برش داده شده پوست ماهی و پای مرغ

Figure1: Washing of the cut pieces of fish skin and chicken feet.

سپس بافت‌ها با آب مقطر شسته شدند تا pH آن‌ها به حالت خنثی نزدیک شود.در مرحله بعد، اسید استیک ۱مولار همراه آنزیم پپسین به رسوبات اضافه شد و مخلوط به مدت ۵ ساعت در دما ۴ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. پس از صاف کردن محلول، pH آن توسط سدیم هیدروکسید به ۷ رسانده شد. در مرحله بعدی سدیم کلرید ۱ مولار به محلول اضافه گردید و مخلوط به مدت دو ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داشته شد تا ذرات کلوئیدی رسوب کنند. در نهایت، محلول فوقانی جدا شد و رسوبات با سانتریفیوژ در دور

۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه جدا گردید . رسوبات نهایی به کمک دستگاه فریز درایر خشک شدند تا کلاژن استخراج شده به دست آید (۱۸).

طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR)

برای بررسی برهمکنش‌ها از طیف سنجی FT-IR مدل SPECRTUM TWO ساخت شرکتPerkin Elmer کشور آمریکا، در محدوده تا cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰و در تفکیک پذیری cm^{-1} ۰/۵استفاده شد.

تست بیوره

تست بیوره یکی از آزمون‌های شیمیایی استاندارد برای شناسایی پروتئین‌ها و تعیین غلظت آن‌هاست. این تست بر اساس وجود پیوندهای پپتیدی در مولکول‌های پروتئین انجام می‌شود. در کلاژن که یک پروتئین ساختاری مهم در بدن است، تست بیوره می‌تواند برای بررسی وجود و غلظت پروتئین استفاده شود.به‌منظور بررسی پروتئین در کلاژن حاصل شده از پوست ماهی و پای مرغ آزمایش بیوره انجام شد. ابتدا یک محلول ۰/۱ از پودر به دست آمده کلاژن از بافت پای مرغ و پوست ماهی تهیه شد. از محلول تهیه شده مقدار ۱ میلی‌لیتر درون لوله آزمایش ریخته شد و سپس به لوله آزمایش دارای محلول پروتئینی کلاژن ۱۰ قطره از محلول تجاری بیوره افزوده شد. محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. درصورتی‌که پس از ۵ دقیقه حلقه بنفش رنگ ایجاد شد محلول پروتئینی و تست مثبت می‌باشد و درصورتی‌که حلقه ایجاد نشود محلول غیر پروتئینی می‌باشد.

سنجش میزان خاکستر و پروتئین

به‌منظور محاسبه درصد خاکستر، پوست ماهی و پای مرغ از روش سوزاندن در کوره استفاده شد که نمونه‌ها پس از خشک شدن در آون با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد درون کوره الکتریکی با دمای حدود ۵۵۰ تا ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا مواد آلی موجود در نمونه به‌طور کامل تجزیه شود. درصد خاکستر با توجه به اختلاف وزن به‌دست‌آمده، محاسبه گردیده است. میزان پروتئین موجود در کلاژن استخراج شده از پای مرغ و پوست ماهی با استفاده از دستگاه کجلدال با ضریب تبدیل ۶/۲۵ محاسبه شد.

آزمون ضد میکروبی

برای بررسی اثر ضد باکتریایی کلاژن به روش دیسک دیفیوژن، ابتدا از هر پودر به‌دست‌آمده کلاژن از بافت پای مرغ و پوست ماهی به‌صورت مجزا ۰/۰۴ گرم در یک لوله حاوی سرم فیزیولوژی (حجم سرم ۴ میلی‌لیتر) با هدف غلظت ۱ درصد حل و از غلظت حاصل شده ۲ میلی‌لیتر برداشته و به سرم فیزیولوژی به حجم ۲ میلی‌لیتر افزوده شد تا غلظت ۰/۵ درصد حاصل شود و به همین ترتیب رقت تا چهار غلظت ادامه یافت (۱ درصد، ۰/۵ درصد، ۰/۲۵ درصد، ۰/۱۲۵ درصد). محیط مولر هینتون آگارآماده شده و پس از جامد شدن محیط توسط نوک سمپلر در هر پلیت ۴ چاهک ایجاد شد. از سویه‌های استاندارد گرم مثبت و گرم منفی احیا شده از هر کدام دو نوع سویه (گرم مثبت:، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*) (گرم منفی:*اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه*) غلظت نیم مک فارلند تهیه و به حالت چمنی توسط سوآب برروی محیط مولر کشت داده شد. پس از کشت از غلظت‌های پودر تهیه شده به‌اندازه ۷۰ میکرولیتر به چاهک‌ها افزوده شد. در وسط پلیت‌های حاوی باکتری گرم مثبت، دیسک آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و در پلیت‌های حاوی باکتری گرم منفی دیسک نالیدیکسیک اسید به‌عنوان کنترل قرار داده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها:

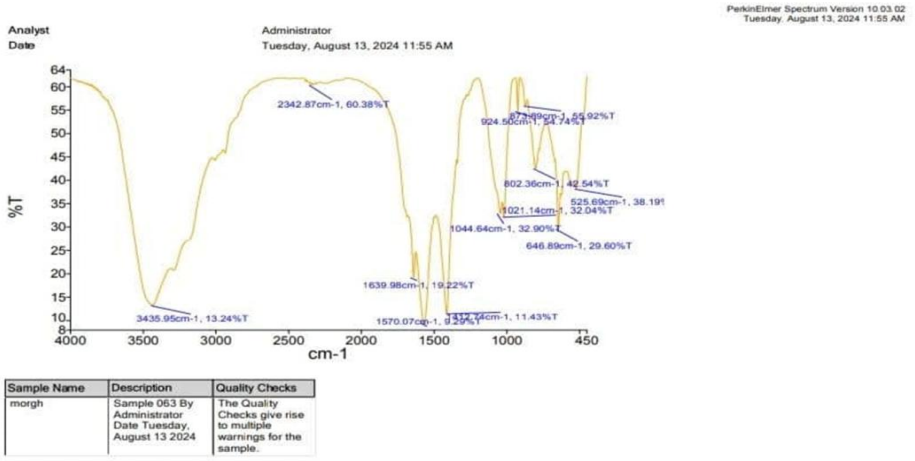
برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل آماری مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار SPSS، مقایسه و تعیین تفاوت معنی‌دار بین متغیرها با استفاده از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و روش چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. نتایج تحلیلی بر اساس میانگین ± انحراف معیار با مقدار احتمال $p < ۰/۰۵$ به‌صورت معنی‌دار ارائه شد.

نتایج

طیف‌سنجی مادون‌قرمز

طیف‌سنجی FTIR نمونه‌های کلاژن محلول در اسید در محدوده cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۵۰ در شکل ۲ ارائه شده است. محور افقی نشان‌دهنده اعداد موج (cm^{-1}) و محور عمودی درصد عبور (T٪) را نشان می‌دهد. بر اساس شکل پیک‌های جذب اصلی مربوط به آمید A، I، II و III مشاهده شد. محدوده جذب در cm^{-1} 3435 نشان‌دهنده آمید A است که ارتعاشات کششی NH پپتیدهای کلاژن را نشان می‌دهد. طول‌موج پایین‌تر پایداری بهتر ساختار مارپیچ سه‌گانه را به دلیل درگیری

پپتیدهای کلاژن با پیوندهای هیدروژنی نشان می‌دهد. آمید B که معمولاً به ارتعاشات کششی نامتقارن CH2 مربوط است، به‌طور تقریب در کلاژن استخراج شده با روش اسیدی در محدوده 2342 cm^{-1} مشاهده شد. پیک آمید I را می‌توان در ناحیه ۱۶۳۹cm^{-1} در ارتباط با کشش گروه کربونیل (C=O) و ستون پلی‌پپتیدی مشاهده کرد. آمید I نمونه‌های کلاژن در مطالعه حاضر در بازه 1639 cm^{-1} مشخص شدند که این پیک در این ناحیه نشان‌دهنده C=O در ساختار دوم کلاژن است. ازطرف‌دیگر، آمید II حضور خمش H-N همراه با ارتعاش کششی CN را نمایان می‌کند که برای تیمار ذکر شده در محدوده ۱۵۷۰cm^{-1}بوده است. پیک آمید III به‌طورکلی به فعل‌وانفعالات مولکولی کلاژن ازجمله پیک‌های ناشی از کشش N-C و تغییر شکل H-N و همچنین جذب‌های حاصل از ارتعاشات متحرک از گروه‌های CH2 در ساختار گلایسین و زنجیره‌های جانبی هیدروکسی پرولین است که این آمید در بازه 1412 cm^{-1} مشاهده شده است. بررسی باندها نشان‌دهنده حضور ساختارهای پروتئینی کلاژن در نمونه استخراج شده است. با توجه به این داده‌ها و مقایسه با نمونه‌های استاندارد، به بررسی کیفیت و خلوص کلاژن پرداخته شد. در نهایت نتایج نشان دادند که ساختار مارپیچ سه‌گانه کلاژن‌های مشتق شده از پوست ماهی و پای مرغ در طول فرآیند استخراج حفظ شده است، چراکه نسبت جذب باند آمید III به باند در محدوده‌ی ۱۴۰۰ بوده است که به‌طور معمول برای نشان دادن مارپیچ سه‌گانه است و معیار مهمی برای ارزیابی کیفیت کلاژن به شمار می‌رود.

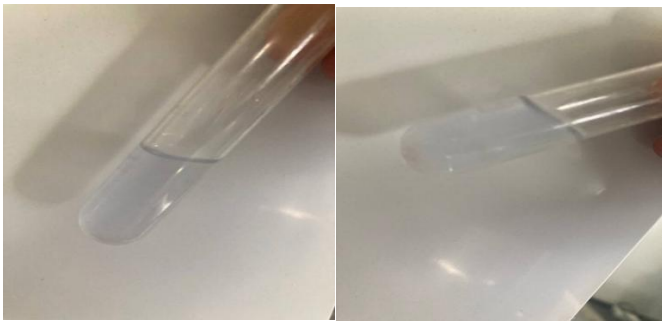


شکل ۲: نمودار FTIR نمونه‌های کلاژن محلول در اسید.

Figure 2: FTIR spectrum of acid-soluble collagn sample.

نتایج تست بیوره

تست بیوره برای محلول کلاژن یک درصد استخراج شده از پوست ماهی و پای مرغ انجام شد که نتیجه تست مثبت بود و حلقه بنفش کمرنگ ایجاد شد. شکل ۳ نتیجه تست بیوره را نشان می‌دهد.



شکل ۳: ایجاد حلقه بنفش کمرنگ در تست بیوره برای نمونه‌های کلاژن.

Figure 3: Formation of a light purple ring in the biuret test for collagen samples

سنجش میزان خاکستر و پروتئین

نتایج به دست آمده از سنجش میزان پروتئین و خاکستر کلاژن استخراج شده از پای مرغ بدین‌صورت بود: مقدار پروتئین حاصل از کلاژن پای مرغ ساده ۳۱/۵ گرم از ۱۰۰ گرم، میزان پروتئین حاصل از کلاژن هیدرولیز شده از پای مرغ نمکی ۴/۰۲ گرم از ۱۰۰ گرم بود. میزان خاکستر کل حاصل از کلاژن هیدرولیز شده از پای مرغ نمکی مقدار ۷۷/۰۹ گرم از ۱۰۰ گرم بود. در نتیجه دریافت شد میزان پروتئین در کلاژن هیدرولیز شده از پای مرغ ساده بیشتر از میزان کلاژن هیدرولیز شده از پای مرغ نمکی بود (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱: نتایج ارزیابی میزان پروتئین و خاکستر در کلاژن هیدرولیز شده از پای مرغ نمکی.

Table1: Results of protein and ash content analysis in hydrolyzed collagen from salted chicken feet.

ردیف	ویژگی‌ها	واحد	نتایج آزمون	نوع نقص	حدودقابل‌قبول	روش آزمون
۱	پروتئین	گرم‌درصدگرم	۴/۰۲	-	-	استاندارد۱۹۰۵۲
۲	خاکستر کل	گرم‌درصدگرم	۷۷/۰۹	-	-	INTERNAL SOP

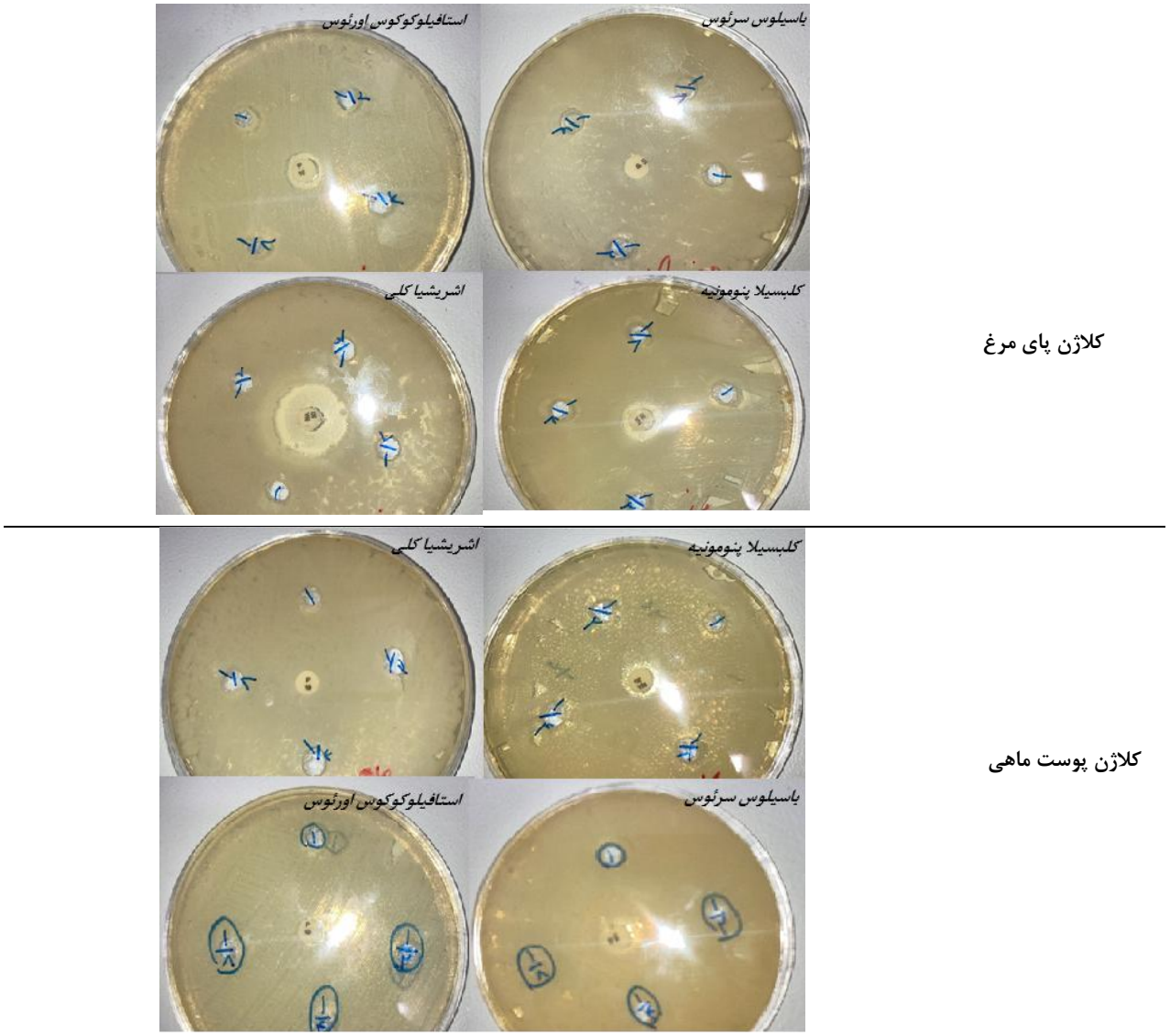
جدول ۲: نتایج ارزیابی میزان پروتئین و خاکستر در کلاژن هیدرولیز شده از پای مرغ ساده.

Table2: Results of protein and ash content analysis in hydrolyzed collagen from unsalted chicken feet.

ردیف	ویژگی‌ها	واحد	نتایج آزمون	نوع نقص	حدودقابل‌قبول	روش آزمون
۱	پروتئین	گرم‌درصدگرم	۳۱/۵	–	–	استاندارد۱۹۰۵۲

نتایج آزمون ضد میکروبی

آزمایش دیسک دیفیوژن نشان داد که کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی و پای مرغ در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر ضد باکتریایی بر روی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید و دارای اثر ضد باکتریایی بر روی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین هستند (شکل ۴).

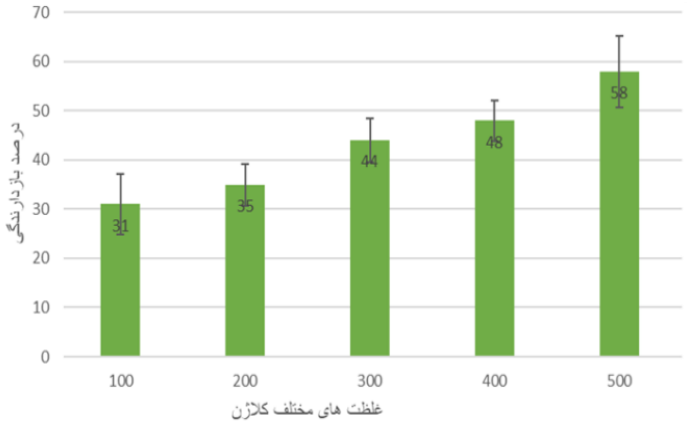


شکل۴: نتایج حاصل از اثر ضدباکتریایی کلاژن بر ایزوله‌های باکتریایی در تحقیق حاضر.

Figure 4: Results of the antibacterial effect of collagen on bacterial isolates in present study.

نتایج حاصل از اثر آنتی اکسیدانی کلاژن

به جهت ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی کلاژن در مطالعه حاضر، به بررسی میزان مهار رادیکال‌های DPPH توسط کلاژن پرداخته شده است. ازاین‌رو، مطابق شکل ۵ قابل به مشاهده است که با افزایش غلظت کلاژن، میزان درصد بازدارندگی رادیکال‌های فوق افزایش محسوسی یافته است. بر این اساس، بیشترین غلظت مورد بررسی از کلاژن(۵۰۰ ppm) سبب مهار ۵۸ درصدی رادیکال DPPH شده است. درحالی‌که کمترین غلظت مورد بررسی (۱۰۰ppm) از کلاژن سبب مهار ۳۱ درصدی رادیکال DPPH شده است. بنابراین به نظر می‌رسد، ازآنجایی‌که ترکیب فوق پتانسیل آنتی‌اکسیدانی مناسبی را از خود نشان داده است احتمالاً از اثرات ضد سرطانی مناسبی به دلیل مهار رادیکال‌های آزاد، برخوردار باشد. این مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی به اثرات محافظتی کلی هیدرولیزهای کلاژن به‌دست‌آمده از پای مرغ و پوست ماهی کمک می‌کند و آن‌هارا کاندیدهای بالقوه‌ای برای کاربرد در نگهداری مواد غذایی، لوازم آرایشی و مداخلات درمانی برای هدف قرار دادن بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو می‌کند.



شکل ۵ : فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH کلاژن هیدرولیز شده.

Figure 5:DPPH free radical scavenging activity of hydrolyzed collagen.

شده که طبق نتایج کلاژن هیدرولیز شده دارای اثر ضد

بحث

کلاژن هیدرولیز شده نوعی کلاژن است که در آن پروتئین کلاژن به زنجیره‌های کوچک‌تری از آمینواسیدها یا پپتیدها تبدیل می‌شود که جذب آن برای بدن آسان‌تر است (۱). این کلاژن با نام‌هایی مانند پودر هیدرولیز کلاژن و پپتید کلاژن نیز شناخته می‌شود (۴). استخراج کلاژن پای مرغ از طریق روش‌های هیدرولیز اسیدی، قلیایی و آنزیمی انجام می‌شود و ویژگی‌هایی همچون استحکام، انعطاف‌پذیری، زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری دارد (۱۲،۲۲). کلاژن ماهی که از پوست، استخوان و فلس ماهی استخراج می‌شود، منبعی از کلاژن نوع ۱ است و حاوی اسیدهای آمینه‌ای مانند گلیسین، پرولین و هیدروکسی‌پرولین است که برای استحکام و آب‌رسانی پوست مهم اند (۱۰).

جعفری و همکاران در سال ۲۰۲۰، مطالعه‌ای بر روی کلاژن ماهی استخراج، خصوصیات و کاربردها برای مهندسی بیومواد انجام دادند. آن‌ها اثبات کردند که اخیراً پپتیدهای ضد باکتریایی از پروتئین گوشت ماهی کپور با استفاده از آلکالاز به‌دست‌آمده که فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *باسیلوس سرئوس* و باکتری‌های گرم منفی *سالمونلا انتریتیدیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلای* و *کلبسیلا پنومونیه* نشان می‌دهند (۱۹). در تحقیق حاضر نیز اثر ضد باکتریایی کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی و پای مرغ بررسی باکتریایی بود که نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق جعفری و همکاران همسو بود.

در تحقیق انجام شده توسط خلعتبری و همکاران در سال۲۰۲۲، خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی هامور انجام شد. نتایج به دست آمده در مورد خواص آنتی اکسیدانی نشان داد با افزایش غلظت، بویژه در کلاژن هیدرولیز شده قدرت کاهندگی و توانایی مهار رادیکال DPPH افزایش پیداکرده است. در نهایت می‌توان گفت کلاژن و کلاژن هیدرولیز و استخراج شده از پوست ماهی هامور به عنوان یک ماهی پرمصرف دریایی با خواص آنتی اکسیدانی مطلوب، و ویژگی های عملکردی مناسب می‌تواند در مقیاس انبوه تولید و به عنوان یک ترکیب زیست فعال و امولسیفایر در صنعت غذا و در تولید محصولات فراسودمند مورد استفاده قرار گیرد (۲۰). نتایج این تحقیق با یافته های مطالعه حاضر هم سو می‌باشد.

شده از پوست ماهی و پای مرغ بررسی شده که طبق نتایج کلاژن هیدرولیز شده دارای اثر ضد باکتریایی بود که نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق جعفری و همکاران همسو بود.

ویدال و همکارانش در سال ۲۰۲۲، تولید کلاژن و هیدرولیز با فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی از محصولات جانبی

کشتار گوسفند بررسی کردند. طبق این تحقیق محصولات جانبی (گوسفند و بره) تیمار و استخراج شدند. کلاژن‌ها با آنزیم آلکالاز هیدرولیز شدند. طیف کلاژن‌ها و هیدرولیزها مشابه بود (باند آمید I، II، III، A، B). هیدرولیزها مقادیر کم‌تری از فعالیت آنتی اکسیدانی (AA) را نسبت به کلاژن‌ها نشان دادند. کلاژن‌های گوشت بره و گوسفند به ترتیب ۱۳/۴ درصد AA (غلظت ۰/۰۰۰۲درصد) و ۱۳/۱درصد (غلظت ۰/۰۰۰۵درصد) را نشان دادند. در غلظت ۰/۰۰۲۰درصد، هیدرولیزهای بره ۱۰/۲ درصد AAرا نشان دادند، درحالی‌که هیدرولیزهای گوسفند فقط ۱/۹۸درصد AA داشتند. کلاژن همچنین فعالیت ضد میکروبی بالاتری را در مقایسه با هیدرولیزها نشان داد که به غلظت کم‌تری برای مهار میکروارگانیسم‌های آزمایش شده نیاز داشت. محصولات جانبی کشتار گوسفند منبع مناسبی برای به دست آوردن هیدرولیزهای پروتئین و کلاژن با فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی هستند که می‌توانند در توسعه مواد مغذی مفید برای سلامت انسان استفاده شوند (۲۱). در تحقیق حاضر از پوست ماهی و پای مرغ کلاژن استخراج شد که این کلاژن دارای اثر ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی بود که این نتایج با نتایج تحقیق ویدال و همکاران همسو بود. کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی و پای مرغ اغلب به دلیل وزن مولکولی پایین، فراهمی زیستی افزایش‌یافته، پروفایل اسیدآمینه مطلوب و پایداری آن، در کنار کاهش خطرات سلامتی، برتر از محصولات جانبی گوسفند است. این عوامل به محبوبیت فزاینده آن در مکمل‌های غذایی و غذاهای کاربردی کمک می‌کند ونیز به این دلایل تحقیق حاضر نسبت به تحقیق ویدال و همکاران دارای برتری بود.

نتیجه‌گیری

اثرات آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی کلاژن هیدرولیز شده بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد. در این راستا پس از استخراج کلاژن به روش اسیدی از ضایعات پوست ماهی و پای مرغ، به بررسی کیفیت کلاژن هیدرولیز شده از طریق تست‌های FTIR، تست بیوره، تست خاکستر و تست کجلدال پرداخته شد و اثرات ضد باکتریایی آن بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی آن توسط روش‌های DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نتایج میزان بازده کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی ۲/۵ درصد و میزان بازده کلاژن هیدرولیز شده از پای مرغ ۲/۱ درصد بود. نتایج حاصل از تست FTIR نشان داد که پنج پیک جذب اصلی مربوط به آمید A، I، II و III وجود داشته که با نمودار استاندارد قابل‌مقایسه بود. با توجه به نتایج تست بیوره و ایجاد حلقه بنفش رنگ وجود پروتئین در کلاژن هیدرولیز شده مثبت اعلام شد. نتایج حاصل از ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی کلاژن حاکی از آن بوده است که با افزایش غلظت کلاژن، میزان درصد بازدارندگی رادیکال‌های فوق افزایش محسوسی یافته است. بر این اساس، بیشترین غلظت مورد بررسی از پپوسیانین (۵۰۰ppm)، سبب ۵۸ درصدی رادیکال DPPH شده است. درحالی‌که کمترین غلظت مورد بررسی(۱۰۰ppm) از کلاژن سبب مهار ۳۱ درصدی رادیکال DPPH شده است. بنابراین به نظر می‌رسد، ازآنجایی‌که ترکیب فوق پتانسیل آنتی اکسیدانی مناسبی را از خود نشان داده است احتمالاً از اثرات ضد سرطانی مناسبی به دلیل مهار رادیکال‌های آزاد، برخوردار باشد. نتایج تست دیسک دیفیوژن برای بررسی اثر ضد باکتریایی کلاژن حاکی از آن بود که کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی و پای مرغ در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر ضد باکتریایی بر روی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید و دارای اثر ضد باکتریایی بر روی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین بودند.

References

1. de Miranda RB, Weimer P, Rossi RC. Effects of hydrolyzed collagen supplementation on skin aging: a systematic review and meta-analysis. Int Dermatol.2021;60(12):1449-61. doi:10.1111/ijd.15518.
2. Schrieber R, Gareis H. Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice. Germany: Wiley-VCH; 2007. p. 45-6. ISBN: 978-3-527-61097-6.
3. Muiznieks LD, Keeley FW. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.2013;1832(7):866-75.doi:10.1016/j.bbadis.2012.11.022.
4. Al Hajj W, Salla M, Krayem M, Khaled S, Hassan HF, El Khatib S. Hydrolyzed Collagen: Exploring its Applications in the Food and Beverage Industries and Assessing its Impact on Human Health–a Comprehensive Review. SSRN. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e36433.
5. Ahmed SK, Hussein S, Qurbani K, Ibrahim RH, Fareeq A, Mahmood KA, et al. Antimicrobial resistance: impacts, challenges, and future prospects. J Med Surg Public Health. 2024;2:100081. doi:10.1016/j.glmedi.2024.100081.

6. Lin K, Zhang D, Macedo MH, Cui W, Sarmento B, Shen G. Advanced Collagen-Based Biomaterials for Regenerative Biomedicine. Adv Funct Mater. 2019;29(3):1804943. doi:10.1002/adfm.201804943.
7. Asaduzzaman AK, Getachew AT, Cho YJ, Park JS, Haq M, Chun BS. Characterization of pepsin-solubilised collagen recovered from mackerel (Scomber japonicus) bone and skin using subcritical water hydrolysis. Int J Biol Macromol. 2020;148:1290-7. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.104.
8. Sae-Leaw T, O'Callaghan YC, Benjakul S, O'Brien NM. Antioxidant activities and selected characteristics of gelatin hydrolysates from seabass (Lates calcarifer) skin as affected by production processes. J Food Sci Technol. 2016;53:197-208. doi:10.1007/s13197-015-1989-7.
9. Wang Y, Zhang CL, Zhang Q, Li P. Composite electrospun nanomembranes of fish scale collagen peptides/chito-oligosaccharides: antibacterial properties and potential for wound dressing. Int J Nanomedicine. 2011;6:667-76. doi:10.2147/IJN.S17547.
10. Nurilmala M, Suryamarevita H, Hizbullah HH, Jacoeb AM, Ochiai Y. Fish skin as a biomaterial for halal collagen and gelatin. Saudi J Biol Sci. 2022;29(2):1100-10. doi:10.1016/j.sjbs.2021.09.056.
11. Sharma YVRK, Srivastava A, Bansal D, Srivastava A. Fish Collagen: Extraction, Properties, and Prospects. In: Engineered Biomaterials: Progress and Prospects. 2024:369-419. doi:10.1142/9789811272011_0010.
12. Kim SH, Park HS, Lee OJ, Chao JR, Park HJ, Lee JM, et al. Fabrication of duck's feet collagen-silk hybrid biomaterial for tissue engineering. Int J Biol Macromol. 2016;85:442-50. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.12.086.
13. Oechsle AM, Akgün D, Krause F, Maier C, Gibis M, Kohlus R, et al. Microstructure and physical–chemical properties of chicken collagen. Food Struct. 2016;7:29-37. doi:10.14674/IJFS-1557.
14. Karki G. Difference between Gram positive and Gram negative bacteria. Online Biology Notes. Accessed March 29, 2019.
15. Grispoldi L, Karama M, Ianni F, La Mantia A, Pucciarini L, Camaioni E, et al. The relationship between S. aureus and branched-chain amino acids content in composite cow milk. Animals. 2019;9(11):981. doi:10.3390/ani9110981.
16. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. Staphylococcus aureus and food poisoning. Genet Mol Res. 2003;2(1):63-76. PMID:12917803.
17. Rani A, Chauhan S, Azmi W. Production and antimicrobial, antioxidant and anticancer applications of pyocyanin from isolated Pseudomonas aeruginosa. SciFed J Ferment Microbial Technol. 2018;1:1-13. PMID:372139315.
18. Mohammadi R, Mohammadifar MA, Mortazavian AM, Rouhi M, Ghasemi JB, Delshadian Z. Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM). Food Chem. 2016;190:186-93. doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.073.
19. Jafari H, Lista A, Siekapen MM, Ghaffari-Bohlouli P, Nie L, Alimoradi H, et al. Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering. Polymers. 2020;12(10):2230. doi:10.3390/polym12102230.
20. Khalatbari S, Hasani M, Khoshvaght-Aliabadi M. Investigating the Characteristics of Nanoliposomes Carrying Bioactive Peptides Obtained from Shrimp Waste. Int J Pept Res Ther. 2024;30(2):10. doi:10.1007/s10989-024-10587-w.
21. Vidal AR, Cansian RL, Mello RDO, Demiate IM, Kempka AP, Dornelles RCP, et al. Production of collagens and protein hydrolysates with antimicrobial and antioxidant activity from sheep slaughter by-products. Antioxidants. 2022;11(6):1173. doi:2076-3921/11/6/1173#.
22. Zou Y, Wang L, Cai P, Li P, Zhang M, Sun Z, et al. Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash. Int J Biol Macromol. 2017;105:1602-11. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.011.