

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-29-45>



Методы экстракции морского коллагена для решения задач регенеративной медицины

Ю.В. Куликова, С.А. Сухих, О.О. Бабич

НОЦ «Промышленные биотехнологии», ФГБОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Калининград, улица Александра Невского, д. 14

Адрес для корреспонденции: stas-asp@mail.ru

Аннотация

Современная регенеративная медицина широко использует продукты и изделия на основе коллагена, наиболее популярным является коллаген животного происхождения. Использование такого коллагена сопряжено с рядом трудностей, в том числе с возникновением активных иммунных реакций, а также с ограничениями религиозного и культурного характера, не позволяющими использовать препараты, изготовленные из тканей животных. Удачной альтернативой коллагену из животных источников может служить морской коллаген, лишенный указанных недостатков. Сложившаяся геополитическая обстановка заставляет искать отечественные источники коллагена. В статье представлен обзор методов экстракции коллагена из биомассы медуз. Рассмотрены перспективные виды медуз, пригодные для реализации указанных методов. Показано, что на территории РФ наиболее продуктивным и перспективным следует считать медуз семейства Rhizostomatidae отряда корнероты (*Rhizostoma pulmo*), обитающих в Черном море. Медуза *Aurelia aurita* отряда дискомедуз (Semaeostomeae), несмотря на свою распространенность (обитает почти во всех морях России), имеет низкое содержание сухих веществ в биомассе и сложна в добыче из-за маленького веса особей. Из рассмотренных методов экстракции применительно к биомассе медуз наиболее подходящей следует считать смешанную ферментативную и кислотную с использованием органических кислот экстракцию. Ферментативный метод с использованием пепсина применим к биомассе медуз *Aurelia aurita*, так как биомасса медуз полностью растворяется на первой стадии ферментативной экстракции.

Ключевые слова: коллаген, медузы, кислотная экстракция, регенеративная медицина, раны и ожоги

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Куликова Ю.В., Сухих С.А., Бабич О.О. Методы экстракции морского коллагена для решения задач регенеративной медицины. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(1):29–45. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-29-45>

Поступила 10.01.2024

Обработана 20.02.2024

Принята к публикации 15.03.2024

Marine collagen extraction methods for solving regenerative medicine problems

Yuliya V. Kulikova, Stanislav A. Sukhikh, Olga O. Babich

REC “Industrial Biotechnologies”, Immanuel Kant Baltic Federal University,
Alexander Nevsky Str., 14, 236041, Kaliningrad, Russia

Correspondence address: stas-asp@mail.ru

Abstract

Modern regenerative medicine widely uses collagen-based products and products, the most popular being collagen of animal origin. The use of such collagen is associated with a number of difficulties, incl. with the occurrence of active immune reactions, as well as with religious and cultural restrictions that do not allow the use of drugs made from animal tissue. Marine collagen, which does not have these disadvantages, can be a successful alternative to collagen from animal sources. The current geopolitical situation forces us to look for domestic sources of collagen. The article provides an overview of methods for extracting collagen from jellyfish biomass. Promising species of jellyfish suitable for implementing these methods are considered. It has been shown that on the territory of the Russian Federation, the most productive and promising jellyfish of the family Rhizostomatidae of the order of *Rhizostoma pulmo*, living in the Black Sea. The jellyfish *Aurelia aurita* of the order of disc jellyfish (Semaestomeae), despite its prevalence (lives in almost all seas of Russia), has a low content of dry substances in its biomass and is difficult to catch due to the small weight of individuals. Of the extraction methods considered in relation to jellyfish biomass, mixed enzymatic and acidic extraction using organic acids should be considered the most suitable. The enzymatic method using pepsin is applicable to the biomass of *Aurelia aurita* jellyfish, because The jellyfish biomass is completely dissolved in the first stage of enzymatic extraction.

Keywords: collagen, jellyfish, acid extraction, regenerative medicine, wounds and burns

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Kulikova Yu.V., Sukhikh S.A., Babich O.O. Marine collagen extraction methods for solving regenerative medicine problems. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(1):29–45. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-29-45>

Received 10.01.2024

Revised 20.02.2024

Accepted 15.03.2024

1. Введение

Статистика травм свидетельствует о росте частоты получения ожогов и ран у людей в результате несчастных случаев и хирургических вмешательств. Заживление ран является сложным физиологическим процессом. Заживлению ран могут препятствовать деструктивные дерматологические состояния, вызванные раневой инфекцией [1]. Поэтому актуальной является

разработка новых эффективных средств для лечения ожогов [2].

Во второй половине XX века интенсивно развивалась регенеративная медицина, ожоговая терапия, предполагающая использование тканеинженерных конструкций для формирования новой жизнеспособной ткани, стимулируя этим снижение зависимости от использова-

ния для пересадки донорской ткани. Однако иммунные отторжения, послеоперационные инфекции, требования к размерам донорских участков кожи ограничивают использование заменителей кожи [3].

Коллаген является перспективным биоматериалом для заживления ран. В основном коллаген и его производные получают из свиной и бычьей кожи и костей. К сожалению, в последние годы существует повышенный риск заражения человека губчатой энцефалопатией крупного рогатого скота. Также повсеместному использованию биоматериалов из отходов свиней и крупного рогатого скота (костей, сухожилий, кожи) препятствуют религиозные ограничения [4].

Морские организмы, такие как медузы, губки и другие беспозвоночные, а также рыбы, являются привлекательными источниками коллагена, поскольку не являются источниками заболеваний, которые могут передаваться человеку, и обладают высокой биосовместимостью [5]. Каркасы, состоящие из коллагенов, выделенных из морских источников, демонстрируют высокую биоразлагаемость и низкую иммуногенность [6].

Как упоминалось выше, биомасса медузы состоит в основном из белков, называемых коллагенами. Коллаген является основным компонентом медуз [7].

Растущий интерес к морским медузам связан с тем, что состав и структура их мезоглеи напоминают структуру кожной ткани человека [8]. При этом преимущества коллагенов медуз перед коллагенами млекопитающих обусловлены тем, что с коллагенами медуз не переносятся заболевания (губчатая энцефалопатия) [1]. В дополнение к заявленным фармакологическим свойствам пептиды коллагена, полученные из медуз, обладают потенциалом для ускорения заживления повреждений кожи, поэтому в будущем они могут стать основой для новых продуктов для лечения ран [9]. В связи с этим исследования, посвященные созданию коллагеновых препаратов из медуз для регенерации тканей кожи, являются весьма перспективными в области медицины и биотехнологии.

Целью данного обзора является оценка перспективных видов медуз, обитающих в морях Российской Федерации, с точки зрения получения

коллагена, а также анализ и выбор наиболее перспективного метода экстракции коллагена из биомассы медуз.

2. Анализ ресурсного потенциала медуз, обитающих в морях

Наиболее распространенными медузами Черного, Балтийского, дальневосточных морей и морей Северного Ледовитого океана являются: сцифоидные медузы видов *Aurelia aurita*, *Cyanea capillata*, гидроидные медузы *Aequorea spp.* и корнероты *Rhizostoma pulmo* [10–12]. Гидроидные медузы имеют чрезвычайно нежную биомассу и для промышленного вылова не подходят, в связи чем данный вид медуз был исключен из рассмотрения.

Aurelia aurita — вид медуз, принадлежащий классу *Scyphozoa*, обитающий в широком диапазоне температур и подвергавшийся разнообразным экологическим и молекулярным исследованиям [13]. Среда обитания *A. aurita* — прохладная соленая вода с течением, температура воды от -6 до $+31$ °C; наибольшее распространение имеют в водах с температурой $+9$ – 19 °C [14].

Медузы *A. aurita* имеют сложный жизненный цикл, который обычно включает как половое, так и бесполое размножение, при этом половое размножение происходит на стадии медузы, а полипы служат основной формой бесполого размножения [15]. У взрослой особи отсутствуют дыхательная, выделительная и кровеносная системы [14].

Состав желеобразной мезоглеи медуз изучался достаточно давно. Так, еще в 80-х годах прошлого века было установлено, что в мезоглее имеется два вида волокон: коллагеноподобные и «эластичные» или вертикальные волокна [16]. Система коллагеновых волокон придает устойчивость мезоглее [17, 18]. В работе Napara et al. (1996) показано, что «эластичные» волокна *A. aurita* содержат положительно заряженные белки, богатые лизином. Белки «эластичных» волокон также обогащены цистеином и, следовательно, дисульфидными связями [20].

Общий химический состав тела медуз схож: низкое содержание жиров и углеводов и высокое содержание белка и минеральных солей. В таблице 1 представлен компонентный состав тела медузы на примере *A. aurita*.

Таблица 1. Компонентный состав медузы *A. aurita* [21]

Компонент	Содержание, % (сухой вес)
Влага	98,67
Зола на а.с.в.*	22,81
Сырой жир на а.с.в.	0,30
Углеводы на а.с.в.	7,13
Белки на а.с.в.	69,76

Примечание: * а.с.в. — абсолютно сухое вещество.

Rhizostoma pulmo — крупная и тяжелая беловатая изначально средиземноморская медуза с фиолетовыми краями, которая сейчас активно расселяется в Черном и Азовском морях.

Благодаря своему весу *R. pulmo* способна разрывать рыболовные сети (сообщалось, что в некоторые весенние месяцы вес медуз превышал вес пойманных рыб) [22, 23]. *R. pulmo* считается самой крупной медузой Черного моря, встречается обычно поздней весной, когда температура повышается до 25,5 °C [24].

Основным достоинством данного вида следует считать тот факт, что токсины, выделяемые медузами, имеют небелковую природу, в связи чем могут легко удаляться при реализации технологии получения коллагена [22, 23].

Согласно проведенным исследованиям биомасса медуз *R. pulmo*, выловленных в Азовском море, имеет содержание сухих веществ на уровне 1,5–2,3%, отличается высокой зольностью. На долю белков приходится 72,1% беззольной массы (табл. 2).

3. Типы и распространение коллагена

Коллаген обладает большой прочностью на разрыв, что обуславливает его присутствие в сухожилиях, костях, хрящах, фасциях и т. д. Он обеспечивает эластичность и прочность кожи, также обеспечивает защиту кожи, препятствуя всасыванию токсинов и патогенов [26]. Коллаген в терапевтических препаратах помогает в заживлении поврежденных костей или кровеносных сосудов и способствует регенерации кожи [27].

Таблица 2. Компонентный состав медузы *R. pulmo* [25]

Компонент	Содержание, % (сухой вес)
Влага	97,7–98,5
Зола на а.с.в.*	60,6
Сырой жир на а.с.в.	0,6
Углеводы на а.с.в.	10,4
Белки на а.с.в.	28,4

Примечание: * а.с.в. — абсолютно сухое вещество.

Коллаген как биополимерная структура образован тремя полипептидными цепями, соединенными между собой в тройную спираль водородными связями. Эта структура содержит две идентичные цепи ($\alpha 1$) и одну несколько отличающуюся по химическому составу ($\alpha 2$). Общая структура молекулы коллагена характеризуется повторением доменов «глицин-Х-У», где «Х» и «У» представлены разными аминокислотами. Этот паттерн приводит к образованию тройной спирали из трех полипептидных цепей, обнаруженной у всех коллагеновых белков [28]. Различные типы можно сгруппировать в категории в соответствии с их структурой, к которым относятся: 1) фибриллярный коллаген (типы I, II, III, V, XI, XXIV и XXVII); 2) коллаген базальной мембраны (типы IV, VII и XXVIII); 3) короткоцепочечные коллагены (типы VI, VIII и X); и 4) фибрилл-ассоциированные коллагены (типы IX, XII, XIV, XVI и с XIX по XXII) [28]. Конкретный тип коллагена определяют путем физико-химических (растворимость, электрофорез и др.) и спектроскопических (FTIR, DC, Raman и др.) исследований извлеченного материала.

Коллаген типа I широко распространен в коже, костях [29], сухожилиях [28, 29] рыб [30–33], у морских беспозвоночных, таких как *Apostichopus japonicus* (морской огурец) [34]. Коллаген типа II обнаружен в хряще [35], стекловидном теле, хрящевых зонах сухожилий, межпозвоночном диске [28], костях и коже рыб [36, 37], он также был извлечен из морских беспозвоночных, таких как медузы [38]. Коллаген типа IV расположен в базальной мембране [28, 29, 39], его супрамолекулярная структура образована нефибриллярной сеткой [28]. Этот тип выявлен

у морских беспозвоночных, таких как брюхоногие моллюски [40] и морские губки [41, 42]. Коллаген типа V в основном обнаруживается в плацентарной/эмбриональной ткани, дерме, костях, мышцах, легких [43], роговице рыб [28, 29], а также, вместе с коллагеном типа I, у морских беспозвоночных [44–46]. Тип XI, фибриллы которого идентичны коллагену типа V [29, 46], найден в хряще, скелетных мышцах, плаценте, легких, сухожилиях, семенниках, трахее [47]. Тип XV и тип XVIII расположены в областях базальной мембраны [48, 49].

4. Основные направления использования коллагена

Благодаря своей стабильности, эластичности и иммунофизиологическим свойствам коллаген находит широкое применение в различных областях медицины, фармацевтики, косметологии и пищевой промышленности. Известно множество разработок на основе коллагена, выделенного из побочных продуктов мясopерерабатывающей промышленности. В то же время активно ведутся исследования по применению коллагена из морских альтернативных источников. Морской коллаген в последние десятилетия вызывает большой интерес как «голубой ресурс». Доступность субпродук-

тов рыбоперерабатывающей промышленности является ключевым фактором, стимулирующим исследования по производству на их основе продуктов с высокой добавленной стоимостью и низким воздействием на окружающую среду. К тому же морской коллаген обладает рядом преимуществ относительно коллагена, выделяемого из млекопитающих животных (табл. 3).

Коллаген используется в фармацевтической промышленности для изготовления микрокапсул, инъекционных дисперсий, систем доставки лекарств [51–53]. В современной медицине коллаген играет важную роль — он помогает в восстановлении хрящевой ткани и костей в случаях их повреждения [54, 55]. Эти разработки нашли свое применение во многих областях медицины: в кардиологии (сердечные клапаны), в дерматологии (трансплантация кожи, инженерия кожных тканей, искусственная дерма), в хирургии (как кровоостанавливающее средство, для заживления ран, восстановления нервов), в ортопедии (восстановление сухожилий, костей и связок, реконструкция хряща), в офтальмологии (трансплантаты роговицы, контактные линзы), в урологии (мембранный гемодиализ) [56]. Эти биоматериалы производятся чаще всего

Таблица 3. Сравнительная характеристика коллагена из различного сырья [50]

Коллаген млекопитающих	Морской коллаген
Низкая стоимость	Высокая стоимость
Высокая температура плавления	Относительно низкая температура плавления
Трудное извлечение (низкая доступность)	Легкодоступен (большое количество)
Растворим в органическом растворителе	Растворим в кислотах
Имеется риск передачи заболеваний	Нет риска передачи заболеваний
Низкое содержание GLX и ALA при высоком PRO	Высокое содержание GLX и ALA при низком PRO
Содержит 7 незаменимых аминокислот	Содержит 10 незаменимых аминокислот
pH раствора 6,3–6,7	pH раствора 6,9–7,3
Молекулярная масса коллагена около 300 кДа, длина 300 нм, толщина 1,5 нм	Молекулярная масса коллагена около 200 кДа, длина 100 нм, толщина 1,0 нм

из фибриллообразующего коллагена, который включает типы I и редко II. Типы III, V, XI используются в основном в научных исследованиях [52, 53]. Примеры биомедицинского применения коллагена, выделенного из медуз, представлены в таблице 4.

5. Теоретические сведения о параметрах экстракции коллагена из биомассы медуз

При описании экстракции коллагена из субпродуктов рыболовства и аквакультуры авторы часто упоминают о необходимости предварительной промывки сырья дистиллированной водой и раствором хлорида натрия (NaCl) для удаления примесей и жиров. Далее сырье обрабатывают щелочными растворами для удаления примесей неколлагеновых белков с использованием растворов гидроксида натрия (NaOH), перекиси водорода (H₂O₂), гидроксида кальция (Ca(OH)₂) или их комбинации, после чего следует обработка бутиловым спиртом (10%) для удаления маслянистых веществ [30].

Среди методов экстракции коллагена из альтернативных источников, в частности из медуз рода *Aurelia*, наиболее часто встречаются следующие варианты: 1) солевая обработка для экстракции с использованием хлорида натрия (NaCl) [61, 62] и/или гидрохлорида гуанидина [63], имеющая среди недостатков низкий выход целевого продукта; 2) кислотная обработка экстрактов с использованием уксусной [64], молочной, лимонной [65], соляной [66], муравьиной, серной или винной кислот [67]; и 3) ферментативная обработка с использованием коммерческих ферментов (и/или очищенных ферментов), таких как пепсин [27, 61, 62, 68], папаин [62, 70, 71] и/или коллагеназа [67, 72]. При этом виде обработки экстракция происходит в среде, содержащей органическую кислоту с добавлением фермента (например, пепсина). Сообщается, что использование неорганических кислот, таких как HCl и H₂SO₄, менее эффективно при экстракции по сравнению с органическими кислотами [67].

Таблица 4. Биомедицинские разработки на основе коллагена, выделенного из медуз

Источник коллагена	Техника получения	Назначение	Биологическая функция	Результаты	Источник
<i>Rhopilema sculentum</i>	Лиофилизация, EDC-сшивка	Регенерация хрящевой ткани	Первичные хондроциты носовой перегородки человека и крысы. Модель дефекта перегородочного хряща крысы <i>in vivo</i>	Усиление адгезии и выработка белков хрящевого матрикса. Уменьшение перфораций носовой перегородки	[57]
			Первичные мезенхимальные стволовые клетки человека	Индукцированная хондрогенная дифференцировка	[58]
<i>Stomolophus meleagris</i>	Электроспиннинг	Регенерация сосудистой ткани	Клетки гладких мышц. Эндотелиальные клетки	Усиленная пролиферация клеток. Индуцированное выравнивание клеток. Усиление развития эндотелиальных клеток	[59]
Биомиметически минерализованный коллаген лосося и фибриллированный коллаген медузы	Лиофилизация, EDC-сшивка	Регенерация костной ткани	Мезенхимальные и стромальные клетки человека, полученные из костного мозга	Индукцированная хондрогенная и остеогенная дифференцировка	[60]

Анализ литературы показывает, что наибольшие выходы коллагена достигаются при использовании на первой стадии ферментативной, а на второй — кислотной экстракции, которые применяются последовательно с целью оптимизации конечного выхода коллагена. В таблице 5 представлены данные о количественном выходе коллагена в зависимости от метода экстракции и вида (типа) сырья.

5.1. Кислотная экстракция

Коллаген чаще всего извлекают путем гидролиза с использованием кислот или щелочей. Как неорганические, так и органические кислоты могут эффективно расщеплять связи в коллагене, обеспечивая экстракцию фибрилл [81]. Обычно

используются органические кислоты: уксусная, хлоруксусная, лимонная и молочная. Чаще всего авторы сообщают об использовании уксусной кислоты для экстракции коллагена [81–89]. Среди неорганических кислот обычно используются соляная, серная и азотная кислоты [89–92]. Органические кислоты, по-видимому, более эффективны для расщепления поперечных связей коллагена и позволяют добиться более высокого выхода экстракции по сравнению с минеральными кислотами [82, 89, 93]. Органические кислоты также солюбилизируют несшитые коллагены [92].

Кислотная экстракция коллагена медузы описана в работах авторов Miura и Kimura (1985)

Таблица 5. Содержание коллагена (в процентах от сухой или влажной массы) в различных видах *Scyphomedusae*, экстрагированных с использованием разных методов

Источник коллагена	Часть тела	Выход	Метод экстракции	Источник
<i>Aurelia aurita</i>	Целый организм	0,01% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
<i>Rhopilema esculentum</i>	Ротовые лопасти	4,31% (влажный вес)	Ферментативная	[74]
<i>Rhopilema esculentum</i>	Мезogleя	0,12% (влажный вес)	Кислотная	[75]
		0,28% (влажный вес)	Ферментативная	[75]
<i>Chrysaora sp.</i>	Купол	9–19% (влажный вес)	Ферментативная	[38]
<i>Acromitus hardenbergi</i>	Купол / ротовые лопасти	37–40% (влажный вес)	Кислотная/ферментативная	[76]
<i>C. mosaicus</i>	Не описано	1–2% (влажный вес)	Кислотная	[77]
<i>Pelagia noctiluca</i>	Целый организм	0,07% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
<i>Cotylorhiza tuberculata</i>	Ротовые лопасти	19,4% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
	Купол	4,5% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
<i>Rhizostoma pulmo</i>	Купол	8,3–31,5% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
	Ротовые лопасти	26–90% (влажный вес)	Ферментативная	[73]
<i>Cassiopea andromeda</i>	Целый организм	2,2–6,0% (влажный вес)	Ферментативная	[78]
<i>Catostylus tagi</i>	Купол	2,7% (влажный вес)	Ферментативная	[46]
<i>Cotylorhiza tuberculata</i>	Купол	<10% (сухой вес)	Ферментативная	[73]
<i>Rhizostoma pulmo</i>	Купол	<10% (сухой вес)	Ферментативная	[73]
<i>Rhopilema asamushi</i>	Мезogleя	35,2% (сухой вес)	Ферментативная	[79]
<i>Stomolophus meleagris</i>	Мезogleя	46,4% (сухой вес)	Ферментативная	[80]
<i>Nemopilema nomurai</i>	Мезogleя	2,2% (сухой вес)	Ферментативная	[12]

и Nagai et al. (2000). Вкратце, ткани медузы промывали дистиллированной водой и 0,1 М NaOH. После чего экстрагировали в 0,5 М уксусной кислоте (1:1000 мас./об.) в течение трех дней, экстракцию повторяли дважды. Экстракты, собранные путем фильтрования и отжима нерастворимой мезоглеи через марлю, подвергались интенсивному диализу против 0,02 М Na₂HPO₄. Полученные осадки собирали центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин при 4 °С и растворяли в 0,5 М уксусной кислоте. После центрифугирования при 20 000 g в течение 1 часа к надосадочной жидкости добавляли твердый NaCl до конечной концентрации 0,9 М. Осажденную хлоридом фракцию (кислотно растворимый коллаген) повторно растворяли в 0,5 М уксусной кислоте, диализовали против 0,1 М уксусной кислоты, а затем лиофилизировали [15, 79].

Метод экстракции коллагена, приводящий к увеличению гомогенности и солюбилизации обезвоженных тканей медузы, описан авторами Yusoff et al. (2013). Вкратце, ткани медузы промывались дистиллированной водой и три-

жды 0,1 М раствором NaOH. После чего экстрагировались в 0,5 М уксусной кислоте (1:1, вес/объем) при интенсивном перемешивании. Затем суспензию подвергали обработке ультразвуком в течение 15 минут (PowerSonic, Корея) с последующим перемешиванием в течение 1 часа при температуре 4 °С (IKA, Германия). Экстракты тщательно диализовали против 0,02 М фосфатного буфера, pH 7,2 (1:10, по объему). Полученный осадок повторно растворяли в 0,5 М растворе уксусной кислоты, а коллаген осаждали добавлением NaCl до конечной концентрации 0,9 М. Осадок отделяли и очищали перерастворением в 0,5 М уксусной кислоте и последующим диализом против 0,1 М уксусной кислоты, затем 0,05 М уксусной кислоты и 0,025 М уксусной кислоты. Чистый коллаген получали при лиофилизации суспензии диализованного экстракта [94].

В работе Khong et al. (2018) приводится сравнение характеристик коллагена, полученного разными методами из разных частей тела медузы, по его составу, pH, pI и внешнему виду (табл. 6).

Таблица 6. Характеристики коллагена, экстрагированного из медузы (*Acromitus hardenbergi*) [76]

Параметры	Купол			Ротовые лопасти		
	Кислотная экстракция	Ферментативная экстракция	Ультразвуковая экстракция	Кислотная экстракция	Ферментативная экстракция	Ультразвуковая экстракция
Влага, %	7,14 ± 0,20	6,29 ± 0,04	7,43 ± 0,02	8,33 ± 0,15	6,46 ± 0,01	7,50 ± 0,05
Содержание белка, %	54,94 ± 0,08	77,59 ± 1,44	78,39 ± 0,97	65,20 ± 1,12	77,01 ± 2,14	78,28 ± 1,01
Содержание жиров, %	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Содержание углеводов, %	8,65	13,36	11,96	9,08	8,69	10,36
Содержание золы, %	29,27 ± 1,83	2,76 ± 0,57	2,22 ± 0,32	17,39 ± 0,51	7,84 ± 0,25	3,26 ± 1,26
Изoeлектрическая точка, pI	4,92 ± 0,31	4,46 ± 0,24	6,04 ± 0,37	5,40 ± 0,47	4,93 ± 0,35	6,41 ± 0,07
pH	2,81 ± 0,06	2,79 ± 0,07	2,84 ± 0,04	2,86 ± 0,02	2,92 ± 0,10	2,87 ± 0,08
Внешний вид	Тусклый белый с легкой текстурой	Желтоватый и легкий по текстуре	Белый с воздушной текстурой	Тусклый, слегка желтоватый, легкая текстура	Желтоватый и светлый по текстуре	Белоснежный с воздушной текстурой

5.2. Щелочная экстракция

Щелочной гидролиз также можно использовать для экстракции коллагена, чаще всего с помощью раствора гидроксида натрия или гидроксида калия [94], хотя в качестве экстрагентов также можно использовать оксид кальция, гидроксид кальция и карбонат натрия [95]. Однако щелочи имеют тенденцию гидролизовать коллаген [81] и разрушать аминокислоты цистеин, гистидин, серин и треонин [94, 95]. Использование щелочного гидролиза, по-видимому, ограничивается экстракцией коллагена из жестких материалов: отходов обработки кожи крупного рогатого скота, и не встречается в литературе при работе с мезоглеей медуз [81, 96, 97].

5.3. Ферментативная экстракция

Метод ферментативной экстракции имеет потенциал для получения значительного выхода коллагена высокой чистоты [81]. Недостатком является то, что ферменты, как правило, намного дороже кислот, щелочей и солей. Однако по сравнению с химическими методами ферментативная обработка менее агрессивна к технологическому оборудованию, требует меньше энергии, оставляет меньше отходов, а конечный экстракт имеет более низкое содержание примесей [81, 98].

При экстракции коллагена используются протеолитические ферменты животного происхождения (например, трипсин, пепсин), растительного происхождения (например, бромелайн, папаин, фицин) или продуцируемые микроорганизмами одиночные или смешанные ферменты (например, коллагеназа, протеиназа К, Алкалаза® (Novozymes, Bagsværd, Дания), Nutrase® (Nutrex, Hoogbuul, Бельгия), Flavourzyme® (Novozymes, Bagsværd, Дания) и Protamex® (Novozymes, Bagsværd, Дания)). Наибольшее распространение характерно для пепсина животного происхождения [82, 90, 94]. Пепсин, трипсин и папаин действуют только на неспиралевидную часть пептидной цепи коллагена (концы) и оставляют нетронутой структурно важную спиральную часть [81]. Кроме того, экстрагированный пепсинорастворимый коллаген обычно имеет более высокую чистоту, поскольку неколлагеновые белки эффективно гидролизуются ферментом. Обработка пепсином также увеличивает растворимость коллагена в кислой среде, что повышает эффективность экстракции [99].

Метод ферментативной экстракции, на который часто ссылаются в работах о коллагене, описан у авторов Miura and Kimura (1985) и Nagai et al. (2000). Вкратце, ткани медузы промывали дистиллированной водой и 0,1 М раствором NaOH. Нерастворимый остаток ресуспендировали в 0,5 М уксусной кислоте (1:100 мас./об.) и расщепляли 10% (мас./об.) пепсином в течение 48 часов при 4 °С. Солюбилизованный пепсином коллаген отделяли центрифугированием при 20 000 g в течение 1 часа, далее супернатант диализовали против 0,02 М Na₂HPO₄ (pH 7,2) в течение трех дней. Коллаген высаливали добавлением NaCl до конечной концентрации 1,0 М. Осадок отделили центрифугированием при 20 000 g в течение 1 ч и растворили в 0,5 М уксусной кислоте. После растворения диализовали против 0,1 М уксусной кислоты, а затем лиофилизировали [15, 79].

Для выделения коллагена также применяют микроволны, которые разрушают структуру клеток и тканей [100, 101], облегчая экстракцию. Было обнаружено, что использование микроволнового излучения ускоряет действие кислот и ферментов по сравнению с эквивалентной экстракцией без микроволн [100].

5.4. Комбинированная экстракция

Среди вышеупомянутых методов экстракции наиболее часто встречаются варианты исполнения, в которых пепсин-растворимый коллаген получают ферментативной обработкой коллагена после кислотной экстракции.

Авторы Nagai T. et al. (1999) описывали следующую методику: мезogleю медузы измельчили с помощью машины для гомогенирования тканей (IKA T10 Basic ULTRA-TURRAX, Штауфен, Германия). Далее мезogleю обрабатывали 0,6 М раствором уксусной кислоты при постоянном перемешивании при 4 °С в течение 72 часов. Смесь фильтровали через марлю для удаления нерастворимых компонентов. Затем в фильтрат вносили твердый NaCl до конечной концентрации 0,9 М и осадок кислотно-растворимого коллагена собирали центрифугированием при 4000 g в течение 15 минут [80].

Пепсин-растворимый коллаген готовили путем внесения кислотно-растворимого коллагена в 20 объемов 0,5 М уксусной кислоты, содержащей 1% пепсина (по массе, ЕС 3.4.23.1, Sigma, США). После инкубации при 4 °С в течение

24 часов смесь центрифугировали при 10 000 g в течение 30 минут, надосадочную жидкость диализовали против 0,02 М Na_2HCO_3 для инактивации пепсина, а коллаген высаливали 0,9 М раствором NaCl . Кислотно-растворимый и пепсин-растворимый коллаген растворяли в 0,5 М уксусной кислоте и диализовали против деионизированной воды при 4 °C в течение 72 часов. Наконец, коллагеновые волокна получали лиофилизацией [80].

В работе Jankangram W. et al. (2016) показана следующая методика: образцы промывали дистиллированной водой при температуре 4 °C при постоянном перемешивании в течение 3 дней, после чего образцы измельчали и на 3 дня погружали в 0,5 М раствор уксусной кислоты с соотношением твердое вещество / растворитель 1:15 (масс./об.) при 4 °C. Смесь фильтровали через два слоя марли, а остаток повторно экстрагировали в тех же условиях. Далее фильтраты с обоих этапов объединяли и осаждали коллаген добавлением 0,9 М раствора NaCl и 0,05 М буферного раствора трис(гидроксиметил)аминометана, pH 7,0. Полученный осадок центрифугировали при 20 000 g в течение 60 минут и растворяли в минимальном объеме 0,5 М раствора уксусной кислоты. Полученный раствор диализовали против 50 объемов 0,1 М раствора уксусной кислоты в течение 3 дней с последующим диализом против того же объема дистиллированной воды еще в течение 3 дней. После лиофилизации диализата получали кислотно-растворимый коллаген [102].

Для экстракции пепсин-растворимого коллагена использовали нерастворенный остаток, полученный после экстракции кислотно-растворимого коллагена. Остаток суспендировали в 0,5 М растворе уксусной кислоты при соотношении твердое вещество / растворитель 1:15 (масс./об.) и вносили пепсин (20 ед./г остатка). Смесь непрерывно перемешивали при 4 °C в течение 3 дней с последующей фильтрацией через два слоя марли. Фильтрат подвергали осаждению и осадок диализовали, как описано ранее для кислотно-растворимого коллагена. Пепсин-растворимый коллаген получали лиофилизацией диализата [102].

5.5. Оптимизация процесса экстракции

Развитие биотехнологии аквакультуры способствовало увеличению производства коллагена из пресноводных/морских видов. В настоящее время предлагаются новые подходы для оптимизации этапов экстракции коллагена. Напри-

мер, ультразвук используют для улучшения массопереноса за счет открытия фибрилл коллагена, что способствует повышению эффективности экстракции. При использовании ультразвука можно управлять основными переменными: частотой (кГц), временем воздействия и температурой в зависимости от типа используемого ультразвукового оборудования [91, 103–108]. Электродиализ, простой и недорогой метод, который можно использовать для замены обычного диализа, применяют для увеличения выхода экстракта коллагена [109]. Изоэлектрическое осаждение, распространенный метод разделения белковых макромолекул, используют в процессе выделения коллагена из медуз и при экстракции коллагена из морских рыб [110]. Процесс экстракции-гидроэкстракции (ЭГЭ) используют для производства кормов и продуктов питания, а также для экстракции коллагена из субпродуктов *Oreochromis sp.* (тилапия). Данный метод облегчает экстракцию коллагена при использовании горячей воды и приводит к минимизации отходов обработанного материала [111].

Методы экстракции можно адаптировать в зависимости от желаемого выхода и свойств конечного продукта. На свойства коллагена, такие как средняя длина полипептидных цепей, растворимость, вязкость раствора, термостабильность, эмульгирующая способность и способность удерживать влагу, влияют особенности метода экстракции [98, 104]. Кроме того, на качество экстрагируемого коллагена влияют конкретные условия обработки, включая предварительную обработку, условия хранения сырья [103].

Заключение

На основании оценки данных, представленных в литературе о распространенности и доступности биомассы медузы, для дальнейших экспериментальных исследований учеными БФУ им И. Канта были выбраны 2 вида медуз, один из которых обитает в Балтийском море — *Aurelia aurita*, другой — в Черном и Азовском морях — *Rhizostoma pulmo*. Данные виды являются одними из наиболее распространенных видов, обитающих во внутренних и внешних морях РФ.

На основании анализа литературных данных о способе кислотной экстракции коллагена из биомассы морских животных было установлено, что традиционно для экстракции используется уксусная кислота с концентрацией 0,2–0,5 Н,

при этом время экстракции варьируется от 24 до 72 часов [12, 79, 81–89, 92, 93]. Именно эти границы варьирования и третий указанный способ экстракции рекомендован к дальнейшему рассмотрению при проработке технологии экстракции коллагена.

Ферментативная экстракция является наиболее распространенным методом извлечения коллагена из биомассы животных, т.к. отличается высоким выходом продукта и безопасностью [112]. Для экстракции коллагена используют протеазы, такие как пепсин [113, 114] папаин [115, 116] и трипсин [117]. Высокий выход коллагена при ферментной обработке связан с усилением расщепления телопептидов в тропоколлагене [118]. Использование папаина во многом связано с вопросами халяльности, т.к. в большинстве случаев пепсин получают с использованием туш свиней. Большее количество исследований ферментной экстракции коллагена описывают опыт применения пепсина. Khong [76] для экстракции коллагена пепсином из медузы *Acromitus hardenbergi* суспендировал обрабатываемую биомассу в 0,5 М уксусной кислоте (1:100 мас./об.) и расщеплял 0,1% (мас./об.) пепсином в течение 48 часов при 4 °C. Addad et al. [73] использовали аналогичный подход, а именно: осадок растворяли в 0,1 М уксусной кислоте и добавляли пепсин (2–15 мг пепсина/мг влажной ткани).

При разработке технологии экстракции морского коллагена предстоит решить целый ряд технологических задач при условии его дальнейшего использования для изготовления препаратов и изделий для регенеративной медицины, в том числе:

- 1) подбор условий сушки полученного коллагена с применением методов сублимации и лиофилизации;
- 2) стерилизация коллагена с применением газового или радиационного воздействия;
- 3) обеспечение необходимых гидродинамических свойств коллагена методами физико-химической модификации;
- 4) очистка коллагена от загрязнений, которые могут повлиять на цитотоксичность, безопасность, аллергенные свойства материалов и изделий из него.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, договор № 075-15-2023-601 (вн. № 13.2251.21.0219)

Funding: The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, the agreement 075-15-2023-601 (№ 13.2251.21.0219)

Литература

1. Cadar E, Pesterau AM, Sirbu R, Negreanu-Pirjol BS, Tomescu CL. Jellyfishes —Significant Marine Resources with Potential in the Wound-Healing Process: A Review. *Mar. Drugs*. 2023;21(4):201.
2. Hu Z, Yang P, Zhou C, Li S, Hong, P. Marine collagen peptides from the skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and wound healing evaluation. *Mar. Drugs*. 2017;15(4):102.
3. Lahmar A, Rjab M, Sioud F, Selmi M, Salek A, Kilani-Jaziri S, Chekir Ghedira L. Design of 3D Hybrid Plant Extract/Marine and Bovine Collagen Matrixes as Potential Dermal Scaffolds for Skin Wound Healing. *Sci. World J.* 2022;1:8788061.
4. Pozzolini M, Millo E, Oliveri C, Mirata S, Salis A, Damonte G, Scarfi S. Elicited ROS scavenging activity, photoprotective, and wound-healing properties of collagen-derived peptides from the marine sponge *Chondrosia reniformis*. *Mar. Drugs*. 2018;16(12):465.
5. Geahchan S, Baharlouei P, Rahman A. Marine collagen: a promising biomaterial for wound healing, skin anti-aging, and bone regeneration. *Mar. Drugs*. 2022;20(1):61.
6. Davison-Kotler E, Marshall WS, García-Gareta E. Sources of collagen for biomaterials in skin wound healing. *Bioengineering*. 2019;6(3):56.
7. D'Ambra I, Merquiol, L. Jellyfish from fisheries by-catches as a sustainable source of high-value compounds with biotechnological applications. *Mar. Drugs*. 2022;20(4):266.
8. Fernández-Cervantes I, Rodríguez-Fuentes N, León-Deniz LV, Quintana LEA, Cervantes-Uc JM, Kao WAH, et al. Cell-free scaffold from jellyfish *Cassiopea andromeda* (Cnidaria; Scyphozoa) for skin tissue engineering. *Mater. Sci. Eng.* 2020;111:110748.

9. Felician FF, Yu RH, Li MZ, Li CJ, Chen HQ, Jiang Y, et al. The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Chin J Traumatol*. 2019;22(01):12–20.
10. Заволокин А.В. Медузы дальневосточных морей России. 1. Видовой состав и распространение. *Известия ТИНРО*. 2010;163:45–46.
11. Brodeur RD, Sugisaki H, Hunt Jr. JL. Increases in jellyfish biomass in the Bering Sea: implications for the ecosystem. *Mar. Ecol. Prog.* 2002;233:89–103.
12. Александров СВ, Гусев АА, Дмитриева ОА, Семонова АС, Чукалова НН. Планктонные и бентосные сообщества Балтийского моря у Северного побережья Самбийского полуострова летом и осенью 2017 года. *Труды АТЛАНТИРО*. 2019;3(2(8)):38–58.
13. Miyake H, Iwao K, Kakinuma Y. Life history and environment of *Aurelia aurita*. *South Pacific Study*. 1997;17(2):273–285.
14. Tardent P. Coelenterata, Cnidaria. In: T Seidel, editor. *Morphogenesis der Tiere*. New York: Gustav Fischer Verlag (1978). 391 p.
15. Dong J, Sun M, Wang B. Comparison of life cycles and morphology of *Cyanea nozakii* and other scyphozoans. *Plankton and Benthos Research*. 2008;3:118–124.
16. Fuchs B, Wang W, Graspeuntner S, Li Y, Insua S, Herbst E-M, et al. Regulation of polyp-to-jellyfish transition in *Aurelia aurita*. *Curr Biol*. 2014;24(3):263–273.
17. Elder HY. Distribution and functions of elastic fibers in the invertebrates. *Biol Bull*. 1973;144:43–63.
18. Tillet E, Franc JM, Franc S, Garrone R. The evolution of fibrillar collagens: a sea-pen collagen shares common features with vertebrate type V collagen. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1996;113:239–246.
19. Bouillon J, Vandermeerssche G. Structure et nature de la mésogée des hydro-et scyphoméduses. *Ann Soc R Zool Belg*. 1956;87:9–25.
20. Napara TO, Oskol'sky AA, Chaga OY. Mesogleal cells of *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa). II. Ultrastructural and cytochemical study. *TSITOLOGIJA-ROSSIJSKAIA AKADEMIJA NAUK*. 1996;38:456–464.
21. Nurokhmatunnisa PD, Arifah AN. Utilization of Jellyfish (*Aurelia aurita*) as Functional Food to Increase Human Body Stamina Report of Student Creativity. Indonesia: Bogor Agriculture University Indonesia (2013).
22. Rottini-Sandrini L, Avian M, Franchi N, Troian A, Vio E. Le dérangement et le dommage que les floraisons de méduses causent à la pêche. UNEP: Workshop on Jellyfish Blooms in the Mediterranean, Athens; UNEP: Athens, Greece. (1984). p. 35–44
23. Rottini-Sandrini L, Stravisi F, Avian M, D'Angela D, Del la Loggia R, Del Negro P; et al. MED POL II Programme “Jellyfish in the Mediterranean Sea”. C.I.M.A.M. final report. UNEP: Jellyfish blooms in the Mediterranean Proceedings of the II Workshop on Jellyfish in the Mediterranean Sea MAP Tech Rep Ser, No 47; UNEP: Athens, Greece. (1991). p. 147–162
24. Kideys AE, Kovalev AV, Shulman G, Gordina A, Bingel F. A review of zooplankton investigations of the Black Sea over the last decade. *J Mar Syst*. 2000;24:355–371.
25. Битютская ОЕ, Белякова ИА, Мазалова НФ, Есина ЛМ, Булли ЛИ. Функционально-технологические свойства и пищевая ценность медузы *Rhizostoma pulmo*. *Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство*. 2022;3:82–91.
26. Fratzl P. *Collagen: Structure and Mechanics*. New York: Springer (2008). 496 p.
27. Buehler MJ. Nature designs tough collagen: Explaining the nanostructure of collagen fibrils. *PNAS*. 2006;103(33):12285–12290.
28. Felician FF, Xia C, Qi W, Xu H. Collagen from marine biological sources and medical applications. *Chem Biodivers*. 2018;15(5):e1700557.
29. Soroushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Adv. Mater*. 2019;31(1):1801651.
30. Oliveira VM, Neri RCA, Monte FTDM, Roberto NA, Costa HMS, Assis CRD, et al. Crosslink-free collagen from *Cichla ocellaris*: structural characterization by FT-IR spectroscopy and densitometric evaluation. *J. Mol. Struct*. 2019;1176:751–758.

31. Alves AL, Marques ALP, Martins E, Silva TH, Reis RL. Cosmetic potential of Marine fish skin collagen. *Cosmetics*. 2017;4:39.
32. Ali AMMM, Benjakul S, Kishimura H. Molecular characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the scales of golden carp (*Probarbus jullieni*), Emirates J. Food Agric. 2017;29:450–457.
33. He L, Lan W, Wang Y, Ahmed S, Liu Y. Extraction and characterization of self-assembled collagen isolated from grass carp and crucian carp, *Foods*. 2019;8:396.
34. Tian M, Xue C, Chang Y, Shen J, Zhang Y, Li Z, Wang Y. Collagen fibrils of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) are heterotypic, *Food Chem*. 2020;316:126272.
35. He Y, Gudmann NS, Bay-Jensen AC, Karsdal MA, Engstroem A, Thudium SC. Type II collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, second ed., Elsevier Inc. (2019). p. 13–22
36. Jeevithan E, Bao B, Zhang J, Hong S, Wu W. Purification, characterization and antioxidant properties of low molecular weight collagenous polypeptide (37kDa) prepared from whale shark cartilage (*Rhincodon typus*). *J. Food Sci. Technol*. 2015;52:6312–6322.
37. Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Shahidi F. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *LWT*. 2000;43:792–800.
38. Barzideh Z, Latiff AA, Gan CY, Benjakul S, Karim AA. Isolation and characterisation of collagen from the ribbon jellyfish (*Chrysaora* sp.). *Int. J. Food Sci. Technol*. 2014;49:1490–1499.
39. Sand JMB, Genovese F, Gudmann NS, Karsdal MA. Type IV collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, Second Edi, Elsevier Inc (2019). p. 37–49.
40. Chovar-Vera O, Valenzuela-Muñoz V, Gallardo-Escárate C. Molecular characterization of collagen IV evidences early transcription expression related to the immune response against bacterial infection in the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Fish Shellfish Immunol*. 2015;42:241–248.
41. Ehrlich H, Wysokowski M, Zółtowska-Aksamitowska S, Petrenko I, Jesionowski T. Collagens of poriferan origin, *Mar. Drugs*. 2018;16:79.
42. Pozzolini M, Bruzzzone F, Berilli V, Mussino F, Cerrano C, Benatti U, Giovine M. Molecular characterization of a nonfibrillar collagen from the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo 1847 and positive effects of soluble silicates on its expression, *Mar. Biotechnol*. 2012;14:281–293.
43. Leeming DJ, Karsdal MA. Type V collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, second ed., Elsevier Inc. (2019). p. 51–57.
44. Cozza N, Bonani W, Motta A, Migliaresi C. Evaluation of alternative sources of collagen fractions from *Loligo vulgaris* squid mantle. *Int. J. Biol. Macromol*. 2016;87:504–513.
45. Oliveira VM, Carneiro da Cunha MN, Nascimento TP, Assis CRD, Bezerra RS, Porto ALF. Collagen: general characteristics and production of bioactive peptides — a review with emphasis on byproducts of fish. *Acta Fish. Aquat. Resour*. 2017;5:70–82.
46. Calejo MT, Morais ZB, Fernandes AI. Isolation and biochemical characterisation of a novel collagen from catostylus tagi. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed*. 2009;20:2073–2087.
47. Luo YY, Szlarski PM, Kehlet SN, Karsdal MA. Type XI collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, second ed. Elsevier Inc. (2019). p. 99–106.
48. Manon-Jensen T, Arvanitidis A, Karsdal MA. Type XV collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, second ed. Elsevier Inc. (2019). p. 127–131.
49. Pehrsson M, Bager CL, Karsdal MA. Type XVIII collagen. In: M.A. Karsdal (Ed.), *Biochem. Collagens, Laminins Elastin Struct. Funct. Biomarkers*, second ed. Elsevier inc. (2019). p. 149–162.
50. Subhan F, Ikram M, Shehzad A, Ghafoor A. Marine Collagen: An Emerging Player in Bio-medical applications. *J Food Sci Technol*. 2015;52:4703–4707.
51. Leitinger B, Hohenester E. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol*. 2007;26:146–155.

52. Oliveira S, Ringshia R, Legeros R, Clark E, Terracio L, Teixeira C, Yost M. An improved collagen scaffold for skeletal regeneration. *J. Biomed. Mater.* 2009;94(2):371–379.
53. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials.* 2010;3:1863–1887.
54. Sanz-Herrera JA, Reina-Romo, E. Cell-Biomaterial Mechanical Interaction in the Framework of Tissue Engineering: Insights, Computational Modeling and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2011;12:8217–8244.
55. Cunniffe GM, Brien FJO. Collagen scaffolds for orthopedic regenerative medicine. *JOM.* 2011;63(4):66–73.
56. Rose FR, Oreffo RO. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292:1–7.
57. Pustlauk W, Paul B, Gelinsky M, Bernhardt A. Jellyfish Collagen and Alginate: Combined Marine Materials for Superior Chondrogenesis of HMSC. *Mater. Sci. Eng.* 2016;64:190–198.
58. Bermueller C, Schwarz S, Elsaesser AF, Sewing J, Baur N, von Bomhard A, et al. Marine Collagen Scaffolds for Nasal Cartilage Repair: Prevention of Nasal Septal Perforations in a New Orthotopic Rat Model Using Tissue Engineering Techniques. *Tissue Eng.* 2013;19:2201–2214.
59. Jeong S, Kim SY, Cho SK, Chong MS, Kim KS, Kim H, et al. Tissue-Engineered Vascular Grafts Composed of Marine Collagen and PLGA Fibers Using Pulsatile Perfusion Bioreactors. *Biomaterials.* 2007;28:1115–1122.
60. Bernhardt A, Paul B, Gelinsky M. Biphasic Scaffolds from Marine Collagens for Regeneration of Osteochondral Defects. *Mar. Drugs.* 2018;16(3):91.
61. Zhou C, Li Y, Yu X, Yang H, Ma H, Yagoub AEGA, et al. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. *LWT.* 2016;74:145–153.
62. Cumming MH, Hall B, Hofman K. Isolation and characterisation of major and minor collagens from hyaline cartilage of hoki (*Macrurus novaezelandiae*). *Mar. Drugs.* 2019;17:223.
63. Wu J, Guo X, Liu H, Chen L. Isolation and comparative study on the characterization of guanidine hydrochloride soluble collagen and pepsin soluble collagen from the body of surf clam shell (*Coelomactra antiquata*). *Foods.* 2019;8:11.
64. Bi C, Li X, Xin Q, Han W, Shi C, Guo R., et al. Effect of extraction methods on the preparation of electrospun/electrosprayed microstructures of tilapia skin collagen. *J. Biosci. Bioeng.* 2019;128:234–240.
65. Cordeiro ARRA, Bezerra TKA, Queiroz ALM, Galvão MS, Cavalcanti MT, Pacheco MTB, Madruga MS. Collagen production from chicken keel bone using acid and enzymatic treatment at a temperature of 30 °C. *Food Sci. Technol.* 2020;40:491–497.
66. Tan Y, Chang SKC. Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food Chem.* 2018;242:147–155.
67. Bhuimbar MV, Bhagwat PK, Dandge PB. Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: development of collagen-chitosan blend as food packaging film, *J. Environ. Chem. Eng.* 2019;7:102983.
68. Ahmad M, Benjakul S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chem.* 2010;120:817–824.
69. Song W, Chen W, Yang Y, Li C, Qian G. Extraction Optimization and Characterization of Collagen from the lung of soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Int. J. Nutr. Food Sci.* 2014;3:270–278.
70. Dhakal D, Koomsap P, Lamichhane A, Sadiq MB, Anal AK. Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based biopolymeric fibres. *Food Biosci.* 2018;23:23–30.
71. Hashim P, Ridzwan MSM, Bakar J. Isolation and characterization of collagen from chicken feet. *Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnol. Eng.* 2014;8:147–151.
72. xin Liu Y, qiang Liu Z, Song L, ru Ma Q, yong Zhou D, wei Zhu B, Shahidi F. Effects of collagenase type I on the structural features of collagen fibres from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) body wall. *Food Chem.* 2019;301:125302.
73. Addad S, Exposito J-Y, Faye C, Ricard-Blum S, Lethias C. Isolation, Characterization and Biological Evaluation of Jellyfish Collagen for Use in Biomedical Applications. *Mar. Drugs.* 2011;9:967–983.

74. Felician FF, Yu RH, Li MZ, Li CJ, Chen HQ, Jiang Y, et al. The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*. Chin. J. Traumatol. 2019;22:12–20. DOI: 10.1016/j.cjtee.2018.10.004
75. Cheng X, Shao Z, Li C, Yu L, Raja MA, Liu C. Isolation, characterization and evaluation of collagen from jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye for use in hemostatic applications. PloS One. 2017;12(1):e0169731.
76. Khong NM, Yusoff FM, Jamilah B, Basri M, Maznah I, Chan KW, et al. Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes. Food Chem. 2018;251:41–50.
77. Steinke JW, Platts-Mills TAE, Commins SP. The alpha-gal story: Lessons learned from connecting the dots. J Allergy Clin Immunol. 2015;135(3):589–596.
78. De Rinaldis G, Leone A, De Domenico S, Bosch-Belmar M, Slizyte R, Milisenda G, et al. Biochemical Characterization of *Cassiopea Andromeda* (Forsskal, 1775), Another Red Sea Jellyfish in the Western Mediterranean Sea. Mar. Drugs. 2021;19:498.
79. Nagai T, Worawattanamateekul W, Suzuki N, Nakamura T, Ito T, Fujiki K, et al. Isolation and characterization of collagen from *Rhizostomous jellyfish (Rhopilema asamushi)*. Food Chem. 2000;70:205–208.
80. Nagai T, Ogawa T, Nakamura T, Ito T, Nakagawa H, Fujiki K, et al. Collagen of edible jellyfish exumbrella. J. Sci. Food Agric. 1999;79:855–858.
81. Yang H, Shu Z. The extraction of collagen protein from pigskin. J. Chem. Pharm. Res. 2014;2:683–687.
82. Liu D, Nikoo M, Boran G, Zhou P, Regenstien JM. Collagen and gelatin. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2015;6:527–557.
83. Prestesa RC. Collagen and its derivatives: Characteristics and applications in meat products. UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde. 2013;15:65–74.
84. Almeida P, Vanalle R, Carlos J, Santana J. Produção de gelatina: Uma perspectiva competitiva para a cadeia produtiva de frango de corte. Prod. Produção. 2012;13:22–39.
85. Wahyuningsih R, Nurliyani R, Pertiwinigrum A, Rohman A, Fitriyanto NA, Erwanto Y. Optimization of acid soluble collagen extraction from Indonesian local “Kacang” goat skin and physico-chemical properties characterization. Chem. Eng. Trans. 2018;63:703–708.
86. Hakim TR, Jamhari PA, Fitriyanto NA, Abidin MZ, Matulesy DN, Erwanto Y. Extraction of collagen from the skin of Kacang goat and production of its hydrolysate as an inhibitor of angiotensin converting enzyme. Trop. Anim. Sci. J. 2021;44:222–228..
87. He L, Lan W, Zhao Y, Chen S, Liu S, Cen L, et al. Characterization of biocompatible pig skin collagen and application of collagen-based films for enzyme immobilization. RSC Adv. 2020;10:7170–7180..
88. Noorzai S, Verbeek CJR, Lay MC, Swan J. Collagen extraction from various waste bovine hide sources. Waste Biomass Valori. 2020;11:5687–5698.
89. Wang L, Yang B, Du X, Yang Y, Liu J. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2008;9:604–607.
90. Benjakul S, Oungbho K, Visessanguan W, Thiansilakul Y, Roytrakul S. Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. Food Chem. 2009;116:445–451.
91. Schmidt MM, Dornelles RCP, Mello RO, Kubota EH, Mazutti MA, Kempka AP, Demiate IM. Collagen extraction process. Int. Food Res. J. 2016;23:913–922.
92. Liu D, Wei G, Li T, Hu J, Lu N, Regenstien JM, Zhou P. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. Food Chem. 2015;172:836–843.
93. Skierka E, Sadowska M. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Chem. 2007;105:1302–1306.
94. Pal GK, Suresh PV. Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2016;37:201–215.

95. Suo-Lian W, Huai-Bin K, Dong-Jiao L. Technology for extracting effective components from fish scale. *J. Food Sci. Eng.* 2017;7:351–358.
96. Naomi R, Ridzuan PM, Bahari H. Current Insights into Collagen Type I. *Polymers.* 2021;13:2642.
97. Nabijon N, et al. Extraction of collagen from cattle skin and synthesis of collagen based flame retardant composition and introduction into cellulosic textile material by graft co-polymerization. *Asian J. Chem.* 2017;29:2470–2474.
98. Senadheera TRL, Dave D, Shahidi F. Sea cucumber derived type I collagen: A comprehensive review. *Mar. Drugs* 2020;18:471.
99. Yusoff FM, Bakar J, Basri M, Ismail M, Khong NMH. A method for extracting collagen and aquatic animals, collagen and products containing it. Malaysia: U. P. Malaysia. 2013.
100. Lin Y-J, Le G-W, Wang J-Y, Li Y-X, Shi Y-H, Sun J. Antioxidative peptides derived from enzyme hydrolysis of bone collagen after microwave assisted acid pre-treatment and nitrogen protection. *Int. J. Mol. Sci.* 2010;11:4297–4308.
101. Jin H-X, Xu H-P, Li Y, Zhang Q-W, Xie H. Preparation and evaluation of peptides with potential antioxidant activity by microwave assisted enzymatic hydrolysis of collagen from sea cucumber *Acaudina molpadioides* obtained from Zhejiang Province in China. *Mar. Drugs.* 2019;17:169.
102. Jankangram W, Chooluck S, Pomthong B. Comparison of the properties of collagen extracted from dried jellyfish and dried squid. *African Journal of Biotechnology.* 2016;15(16):642–648.
103. Soroushanova A, Skoufos I, Tzora A, Mullen AM, Zeugolis DI. The influence of animal species, gender and tissue on the structural, biophysical, biochemical and biological properties of collagen sponges. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2021;32:12.
104. Zhang X, Xu S, Shen L, Li G. Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification. *J. Soc. Leather Technol. Chem.* 2020;2:19.
105. Ran XG, Wang LY. Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by products. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2014;94(3):585–590.
106. Benjakul S, Sae-leaw T, Simpson BK. Byproducts from fish harvesting and processing. By-products from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels. 2019;179–217.
107. Ali AMM, Kishimura H, Benjakul S. Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as affected by ultrasonication. *Process Biochemistry.* 2018;66:237–244.
108. Zou Y, et al. Effect of ultrasound power on extraction kinetic model, and physicochemical and structural characteristics of collagen from chicken lung. *Food Prod. Process. Nutr.* 2020;2:1–12.
109. Chen J, Li M, Y, R, Bai K, Wang G, Tan R. et al. Electrodialysis extraction of pufferfish skin (*Takifugu flavidus*): A promising source of collagen. *Mar. Drugs.* 2019;17(1):25.
110. Lin X, Chen Y, Jin H, Zhao Q, Liu C, Li R, et al. Collagen extracted from bigeye tuna (*Thunnus obesus*) skin by isoelectric precipitation: Physicochemical properties, proliferation, and migration activities. *Mar. Drugs.* 2019;17(5):261.
111. Huang CY, Kuo JM, Wu SJ, Tsai HT. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion–hydro-extraction process. *Food chem.* 2016;190:997–1006.
112. Mohamad Razali UH, Ya'akob H, Sarbon NM, Zainan NH, Dailin DJ, Zaidel DN. Improving collagen processing towards a greener approach: Current progress. *JCTB.* 2023;98(5):063–1082.
113. Chuaychan S, Benjakul S, Kishimura H, Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). *LWT-Food Sci Technol.* 2015;63:71–76.
114. Jeevithan E, Wu W, Nanping W, Lan H, Bao B. Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone. *Process Biochem.* 2014;49:1767–1777.
115. Nurilmala M, Pertiwi RM, Nurhayati T, Fauzi S, Batubara I, Ochiai Y, Characterization of collagen and its hydrolysate from yellowfin tuna *Thunnus albacares* skin and their potencies as antioxidant and antiglycation agents. *Fish Sci.* 2019;85:591–599.

116. Jamilah B, Umi Hartina MR, Mat Hashim D, Sazili AQ, Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. Int Food Res J. 2013;20:835–842.
117. Jung KH, Choi YC, Chun JY, Min SG, Hong GP, Effects of concentration and reaction time of trypsin, pepsin, and chymotrypsin on the hydrolysis efficiency of porcine placenta. Korean J Food Sci Anim Resour. 2014;34:151–157.
118. 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;133:1441–1448.

Об авторах

Куликова Юлия Владимировна — старший научный сотрудник НОЦ «Промышленные биотехнологии» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта».

Сухих Станислав Алексеевич — заведующий лабораторией микробиологии и биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта».

Бабич Ольга Олеговна — директор НОЦ «Промышленные биотехнологии» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта».

Authors

Yuliya V. Kulikova — senior Researcher REC “Industrial Biotechnologies”, Immanuel Kant Baltic Federal University.

Stanislav A. Sukhikh — Head of the Laboratory of Microbiology and Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University.

Olga O. Babich — director of REC “Industrial Biotechnologies”, Immanuel Kant Baltic Federal University.