



## ارزیابی خصوصیات کلاژن پوست ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)

### بازیافت شده به روش رسوب ایزوالکتریک

سپیده فرعلیزاده<sup>۱</sup>، اسحق زکی پور رحیم‌آبادی<sup>۲\*</sup>، سید هژیر بهرامی<sup>۳</sup>، صادق حسن‌نیا<sup>۴</sup>

۱. دانشجو دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران

۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران

۳. استاد گروه شیمی و علوم الیاف، دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه امیرکبیر، تهران، ایران

۴. دانشیار گروه بیوشیمی، علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۶

### چکیده

هدف از این مطالعه استفاده از ضایعات پوست ماهی کپور نقره‌ای به‌عنوان منبع بالقوه کلاژن و بازیافت کلاژن محلول در اسید و آنزیم به روش رسوب ایزوالکتریک و بررسی خصوصیات فیزیکو-شیمیایی آن بود. از این رو، کلاژن از پوست ماهی کپور نقره‌ای به روش اسیدی و آنزیمی استخراج شد. سپس کلاژن‌های محلول با استفاده از روش‌های رسوب ایزوالکتریک (کلاژن محلول در اسید (I-ASC) و کلاژن محلول در پیپسین (I-PSC)) و Salting-out (کلاژن محلول در اسید (ASC) و کلاژن محلول در پیپسین (PSC)) بازیافت شدند. نتایج نشان داد بازده استخراج و محتوی پروتئین کل در نمونه‌های ASC و PSC نسبت به نمونه‌های I-ASC و I-PSC بیشتر بودند. اما بازده تولید در نمونه‌ها مشابه بود. خلوص بالا در کلاژن‌های I-ASC و I-PSC محتوی پروتئین کل و بازده استخراج متفاوت و بازده تولید مشابه را توجیه کرد. الگوی SDS-PAGE، ساختار I-ASC و I-PSC را به‌عنوان کلاژن نوع I تایید کرد. علاوه بر این بررسی ترکیب اسیدآمین، محتوی ایمینواسید بالاتر را برای I-PSC نشان داد. دمای تخریب حرارتی برای نمونه‌های I-ASC و I-PSC به ترتیب ۲۸/۷۰ و ۲۹/۹۹ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. در نهایت بررسی حالیت کلاژن در سطوح مختلف pH و غلظت‌های مختلف NaCl نشان داد که حالیت با افزایش غلظت یونی محلول کاهش و در pH بالا و پایین نقطه ایزوالکتریک افزایش می‌یابد. به طور کلی نتایج نشان داد رسوب ایزوالکتریک کلاژن محلول، پروتئین کلاژن با خلوص بالا را تولید می‌کند که می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین بالقوه کلاژن برای کلاژن پستاندارن باشد.

واژگان کلیدی: رسوب ایزوالکتریک، ماهی کپور نقره‌ای، کلاژن نوع I، حالیت، بازیافت پروتئین، ضایعات



## Evaluation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin collagen characteristics recovered by the isoelectric precipitation method

Sepideh Far Alizadeh<sup>1</sup>, Eshagh Zakipour Rahim Abadi<sup>2\*</sup>, Seyed Hazhir Bahrami<sup>3</sup>,  
Sadegh Hassannia<sup>4</sup>

1. PhD Student in Seafood Processing, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran
2. Associated Professor, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran
3. Professor, Department of Textile Chemistry and Fibre Sciences, Faculty of Textile Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran
4. Associated Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 16-Mar-2021

Accepted: 11-May-2021

### Abstract

The aim of this study was using the silver carp skin wastes as a potential source of collagen and recovering the soluble collagen in acid and enzyme solution by isoelectric precipitation method. The physicochemical properties of produced collagen investigated as well. Hence, collagen was extracted from the skin of silver carp by acidic and enzymatic methods. Then, soluble collagens were recovered using isoelectric precipitation (Isoelectric-Acid-soluble collagen (I-ASC) and Isoelectric-Pepsin-soluble collagen (I-PSC)) and salting-out (Acid-soluble collagen (ASC) and Pepsin-soluble collagen (PSC)) methods. The results showed that the extraction yield and total protein content of ASC and PSC samples were higher than I-ASC and I-PSC samples. But the production yield was the same in all the samples. The high purity of I-ASC and I-PSC collagens represented different total protein content and extraction yield, however similar production yield. The SDS-PAGE pattern confirmed the structure of I-ASC and I-PSC as type I collagen. In addition, the amino acid composition showed high amino acid content for I-PSC. It was estimated that the thermal denaturation temperatures for I-ASC and I-PSC samples laying at 28.70°C and 29.99°C, respectively. Finally, the investigation of collagen solubility at different pH levels and concentrations of NaCl showed that the solubility decreases with increasing ion concentration of the solution, and increases at the pH above and below the isoelectric point. Overall, the results showed that the isoelectric precipitation of soluble collagen produces a high-purity collagen protein that could be an alternative source to replace mammalian collagens.

**Keywords:** Isoelectric precipitation, Silver carp, Type I collagen, Solubility, Recovery of proteins, Waste

## ۱. مقدمه

می‌شوند. بنابراین استفاده از این ضایعات به‌عنوان منابع بالقوه کلاژن ضمن افزایش بازده اقتصادی برای صنایع شیلاتی از بروز مشکلات زیست محیطی جلوگیری می‌کند. استخراج کلاژن طی سه مرحله اصلی شامل آماده‌سازی، استخراج و بازیافت انجام می‌شود. در مرحله بازیافت، کلاژن محلول استخراجی با استفاده از NaCl تحت فرآیندی به‌نام Salting-out بازیافت می‌شود (Asghar and Henrickson, 1982). اما از خصوصیات پروتئین کلاژن ماهی و سایر آبزیان می‌توان به خصوصیات ایزوالکتریک آن‌ها در pH بین ۶-۹ اشاره نمود. در نقطه ایزوالکتریک، حلالیت و ظرفیت اتصال آب آن به کمترین مقدار خود رسیده و پروتئین رسوب می‌کند (Vojdani, 1996). از این رو، از این خاصیت پروتئین کلاژن و با استفاده از سیستم تغییر pH محیط می‌توان برای ترسیب پروتئین کلاژن استفاده کرد. در این روش امکان دستیابی به پروتئین کلاژن با خلوص بالا وجود دارد زیرا از رسوب پروتئین‌های ناخواسته دیگر جلوگیری می‌کند. در واقع با کنترل pH، پروتئین به صورت انتخابی رسوب خواهد کرد. بنابراین، در این مطالعه امکان استفاده از ضایعات حاصل از فرآوری ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)، که در ایران در بین ماهیان گرمابی بیشترین تولید را به خود اختصاص داده و حدود ۵۰ درصد از تولید کل ماهیان گرمابی است، به عنوان یک منبع بالقوه کلاژن مورد بررسی قرار گرفت. همچنین بازده بازیافت پروتئین کلاژن با استفاده از روش‌های رسوب ایزوالکتریک و Salting-out بررسی شدند و در نهایت خصوصیات فیزیکو-شیمیایی کلاژن بازیافت شده به روش رسوب ایزوالکتریک ارزیابی شد.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. استخراج کلاژن از ضایعات پوست ماهی

#### کپور نقره‌ای

پوست ماهی مورد استفاده در این پژوهش از ضایعات

کلاژن پروتئین غالب بافت پیوندی در حیوانات است که حدود ۳۰ درصد از پروتئین کل را تشکیل می‌دهد و از فراوان‌ترین ماکرومولکول‌های بیولوژیکی ماتریکس خارج سلولی است. این پروتئین کاربردهای گسترده‌ای در شاخه‌های مختلف صنعت دارویی و پزشکی مانند انواع کرم‌ها، نخ بخیه، گازها و باندهای ویژه پانسمان و ترمیم زخم، تهیه کپسول‌های دارویی و قرص‌ها دارد (Rodziewicz-Motowidło *et al.*, 2008). در میان انواع پروتئین‌های کلاژن، نوع I متداول‌ترین نوع آن است (Giraud-Guille *et al.*, 2000) که در صنایع دارویی، زیست پزشکی، آرایشی و غذایی کاربرد دارد (Chen *et al.*, 2016). به طور سنتی منابع عمده کلاژن نوع I مورد استفاده در صنعت، از پوست و استخوان گاو، خوک و مرغ است. اما در سال‌های اخیر به علت افزایش بروز آنفولانزای مرغی، بیماری جنون گاوی و بیماری‌های عفونی دیگر و همچنین محدودیت‌های مذهبی، استفاده از کلاژن نوع I حیوانات خشکی محدودیت‌هایی را ایجاد کرده است (Liu *et al.*, 2014). از این رو محققان به دنبال یافتن منابع جدید، ایمن و جایگزین کلاژن نوع I حیوانات خشکی اند (Chen *et al.*, 2016). اخیراً کلاژن مشتق شده از ماهیان به‌عنوان یک جایگزین برای کلاژن حیوانات توجه زیادی را به خود جلب کرده است زیرا هیچ بیماری که بتواند از ماهی به انسان منتقل شود در آن‌ها یافت نشده و همچنین دارای منابع بسیار وسیعی در مقایسه با حیوانات خشکی هستند (Kawaguchi *et al.*, 2011). بدین منظور در سال‌های اخیر ضایعات حاصل از فرآوری آبزیان به‌عنوان یک منبع بالقوه کلاژن مورد توجه محققان قرار گرفته است زیرا طی فرآوری آبزیان مقدار زیادی ضایعات در حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد از مواد خام اولیه تولید می‌شود که حدود ۳۰ درصد از آن‌ها از نظر کلاژن غنی هستند. به طور مرسوم این ضایعات یا به‌عنوان خوراک دام و کود (با ارزش پایین) استفاده می‌شوند یا با دفع نامناسب در محیط زیست، سبب آلودگی محیط زیست

محلول اسیداستیک ۰/۵ مولار حاوی ۱ درصد آنزیم پپسین (EC 3.4.23.1, 1:10,000، سیگما آلدریج، آمریکا) به نسبت ۱:۵۰ (w/w) در مدت زمان ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هضم شدند. سپس محلول ویسکوز بدست آمده با دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و عصاره به دست آمده در بافر  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ۰/۰۲ مولار (pH=۷/۲) به منظور غیرفعال کردن آنزیم پپسین به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شد. بعد از دیالیز رسوب بدست آمده در اسید استیک ۰/۵ مولار حل شد. ادامه مراحل همانند کلژن تولید شده به روش اسیدی انجام شد. کلژن حاصل PSC (Pepsin-soluble collagen) نامیده شد. در روش دوم از رسوب ایزوالکتریک برای بازیافت کلژن‌های محلول در اسید و آنزیم استفاده شد. برای این منظور ابتدا محدوده تقریبی نقطه ایزوالکتریک کلژن پوست ماهی کپور نقره‌ای با اندازه‌گیری پتانسیل زتای ASC و PSC بدست آمد. سپس کلژن‌های محلول به روش ایزوالکتریک با رساندن pH به نقطه ایزوالکتریک‌شان با استفاده از NaOH رسوب داده شدند. ادامه مراحل همانند روش Salting-out انجام شد. کلژن حاصل (Isoelectric-Acid-soluble collagen) I-ASC و (Isoelectric-Pepsin-soluble collagen) I-PSC نامیده شدند.

## ۲.۲. ترکیبات شیمیایی کلژن پوست ماهی کپور نقره‌ای

ترکیبات شیمیایی کلژن با استفاده از روش AOAC (۲۰۰۵) تعیین شد. برای تعیین محتوی هیدروکسی پرولین از روش Woessner Jr (۱۹۶۱) استفاده شد. L-هیدروکسی پرولین به‌عنوان استاندارد استفاده شد و محتوی هیدروکسی پرولین از منحنی استاندارد به دست آمد.

## ۳.۲. بازده استخراج کلژن از پوست ماهی کپور نقره‌ای

بازده کلژن استخراج شده به روش آنزیمی و اسیدی براساس وزن خشک پوست مورد استفاده محاسبه شد.

ماهی کپور نقره‌ای در بازار ماهی فروشان رشت جمع‌آوری و به‌وسیله جعبه‌های حاوی یخ به نسبت ۱:۲ (یخ/ پوست ماهی) به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلاتی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان منتقل شد. ضایعات پوست پس از آماده‌سازی‌های اولیه برای استخراج کلژن به روش اسیدی و آنزیمی با استفاده از روش Nagai و Suzuki (۲۰۰۲) استفاده شدند. در مرحله پیش تیمار، پوست به‌منظور حذف پروتئین‌های غیرکلژنی به مدت ۲۴ ساعت در محلول NaOH ۰/۱ مولار به نسبت ۱:۲۰ (w/v) قرار گرفت. محلول هر ۱۲ ساعت تعویض شد. سپس پوست‌ها تا رسیدن pH به حالت خنثی با آب مقطر شستشو شدند. چربی پوست با بوتیل الکل ۱۰ درصد به نسبت ۱:۲۰ (w/v) به مدت ۲۴ ساعت استخراج شد. بعد از چربی‌زدایی برای حذف موثرتر رنگدانه‌ها، پوست به مدت ۲۴ ساعت در محلول  $\text{H}_2\text{O}_2$  ۳ درصد به نسبت ۱:۲۰ (w/v) قرار گرفت. پوست آماده شده سپس با اسید استیک ۰/۵ مولار (pH= ۲/۵) به نسبت ۱:۵۰ (w/v) مخلوط و استخراج کلژن به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. عصاره کلژن با استفاده از سانتریفیوژ دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد (مدل PIT320R High-Speed Universal، شرکت پلی‌ایده‌آل تجهیز، ایران) جدا شد. سپس برای بازیافت کلژن از دو روش استفاده شد. در روش اول، کلژن‌های محلول به روش Salting-out (NaCl با یک غلظت نهایی ۲/۶ مولار در حضور Tris-HCl ۰/۰۵ مولار، pH=۷) رسوب داده شدند. سپس کلژن رسوب یافته با دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و جمع‌آوری شد. رسوب حاصل دوباره در اسید استیک ۰/۵ مولار حل شده و به ترتیب در اسیداستیک ۰/۱ مولار و آب مقطر به مدت ۴۸ ساعت دیالیز (cut-off of 14 kDa، سیگما آلدریج، آمریکا) شدند. در نهایت محلول کلژن دیالیز شده با دستگاه خشک‌کن انجمادی (مدل FD-5003-BT، شرکت دنا و کیوم، ایران) خشک شد. کلژن حاصل ASC (Acid-soluble collagen) نامیده شد. به منظور استخراج آنزیمی کلژن، پوست‌ها در

$$\text{بازده استخراج کلژن (\%)} = \frac{\text{وزن کلژن فریزد رایر شده (گرم)}}{\text{وزن پوست فریزد رایر شده (گرم)}} \times 100$$

## ۶.۲. ترکیب اسید آمینه کلاژن

ارزیابی اسید آمینه‌های کلاژن به روش Pico.Tag انجام شد (Bidlingmeyer *et al.*, 1984). کلاژن‌های فریزد رایر شده در HCl ۶ نرمال در ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت هیدرولیز شدند و سپس ترکیب اسید آمینه آنها توسط HPLC (Waters Assoc)، شیمادزو، کیوتو، ژاپن) بررسی شد.

## ۷.۲. بررسی حالیت کلاژن

حالیت کلاژن‌ها در اسید استیک ۰/۵ مولار در سطوح مختلف pH و غلظت‌های مختلف NaCl به روش Montero و همکاران (۱۹۹۱) با اندکی اصلاح بررسی شد. ۸ میلی‌لیتر محلول کلاژن (۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به یک فالدون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و pH آن در محدوده ۱ تا ۱۰ با محلول NaOH ۶ نرمال یا HCl ۶ نرمال تنظیم شد. سپس حجم محلول با استفاده از آب دیونیزه که pH آن از ۱ تا ۱۰ تنظیم شده بود، به ۱۰ میلی‌لیتر افزایش یافت. مخلوط به آرامی به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد و سپس با دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. غلظت پروتئین در سوپرناتانت به روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) با استفاده از سرم آلبومین گاوی به‌عنوان یک پروتئین استاندارد تعیین شد. ۵ میلی‌لیتر از محلول کلاژن (۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۵ میلی‌لیتر محلول NaCl سرد در غلظت‌های مختلف ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ درصد (w/v) مخلوط شدند. سپس مخلوط‌ها به آرامی در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه همزده شدند و با دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. غلظت پروتئین در سوپرناتانت با روشی که قبلاً در متن بالا توصیف شده اندازه‌گیری شد.

## ۸.۲. تعیین دمای تخریب حرارتی کلاژن

دمای تخریب حرارتی کلاژن در محلول بر اساس تغییرات ویسکوزیته با استفاده از روش Zhang و همکاران (۲۰۰۷) با اندکی اصلاح تعیین شد. بر این اساس

$$100 \times \frac{\text{محتوی هیدروکسی پرولین کلاژن فریزد رایر شده (میلی گرم)}}{\text{محتوی هیدروکسی پرولین پوست (میلی گرم)}} = \text{پایزه تولید (\%)}$$

## ۴.۲. پتانسیل زتا

برای تعیین نقطه ایزوالکتریک کلاژن‌های بازیافت شده به روش Salting-out از آزمون پتانسیل زتا استفاده شد. بدین منظور، pH کلاژن‌های حل شده در اسید استیک ۰/۵ مولار با یک غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در یک محدوده ۱۲-۲ تنظیم شد. سپس پتانسیل زتای آنها با استفاده از دستگاه زتا پتانسیل (مدل ZETA-check، شرکت COLLOID METRIX GmbH، آلمان) اندازه‌گیری و از منحنی بدست آمده نقطه ایزوالکتریک کلاژن‌ها بدست آمد.

## ۵.۲. الگوی پروتئین کلاژن

الگوی پروتئین کلاژن به روش Laemmli (۱۹۷۰) با استفاده از الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) تعیین شد. ابتدا نمونه‌های کلاژن در محلول SDS ۵ درصد (w/v) به مدت یک ساعت در ۸۵ درجه سانتی‌گراد حل شدند. سپس نمونه‌های حل شده به نسبت ۶:۱ (v/v) با بافر نمونه (HCl - Tris ۰/۵ مولار با pH ۶/۸، ۵ درصد SDS (w/v)، گلیسرول ۲۵ درصد، اوره ۴ مولار و برموفنول بلو ۰/۰۵ درصد) مخلوط و در آب جوش به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شدند. نمونه‌های کلاژن آماده (۱۶ میکرولیتر) داخل ژل پلی‌آکریل آمید (جدا کننده ۷/۵ درصد و متراکم کننده ۴ درصد) تزریق شدند و سپس الکتروفورز در جریان ثابت ۳۳ میلی‌آمپر با استفاده از دستگاه Mini-PROTEIN II (Bio-Rad Laboratories، آمریکا) انجام شد. نشانگر پروتئین (PM1700, SMOBIO Technology, Inc.) (Science Park, Hsinchu City 30075, Taiwan) برای تخمین وزن مولکولی پروتئین‌ها استفاده شد. کلاژن نوع I پوست گوساله (سیگما آلد ریچ، آمریکا) به‌عنوان استاندارد استفاده شد.

اختلاف بین تیمارها از آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای تعیین سطح معنی داری، از آزمون توکی (Tukey) در سطح ۵ درصد استفاده گردید.

### ۳. نتایج

#### ۳.۱. ترکیبات شیمیایی کلاژن پوست ماهی

نتایج حاصل از آنالیز ترکیب شیمیایی نمونه‌های کلاژن در جدول ۱ آورده شده است. براساس نتایج بدست آمده تفاوت معنی داری در مقادیر چربی و خاکستر بین نمونه‌ها مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). از نظر مقدار رطوبت، نمونه‌های آنزیمی (PSC و I-PSC) به طور معنی داری میزان رطوبت پایین تری را نسبت به نمونه‌های اسیدی (ASC و I-ASC) نشان دادند ( $P < 0.05$ ). قابل ذکر است که میزان پروتئین کل، بازدهی استخراج و تولید در نمونه‌های آنزیمی (PSC و I-PSC) نسبت به نمونه اسیدی (ASC و I-ASC) به طور معنی داری بالاتر بود ( $P < 0.05$ ). همچنین نمونه‌های بازیافت شده به روش رسوب ایزوالکتریک (I-PSC و I-ASC) نسبت روش Salting-out (ASC و PSC) خلوص بالاتری را نشان دادند ( $P < 0.05$ ).

نمونه‌های کلاژن در اسید استیک ۰/۵ مولار با غلظت ۰/۳ میلی گرم در میلی لیتر حل شدند. سپس ۱۵ میلی لیتر از محلول کلاژن برای اندازه گیری ویسکوزیته با استفاده از یک ویسکومتر (Ubbelohde، شرکت CANNON، آمریکا) از ۱۵ تا ۵۵ درجه سانتی گراد استفاده شد. به هنگام اندازه گیری ویسکوزیته دما مرحله به مرحله بالا رفت و به مدت ۱۰ دقیقه در هر دما باقی ماند. ویسکوزیته کلاژن در هر دما به شرح زیر محاسبه شد:

$$\text{ویسکوزیته حداقل} - \text{ویسکوزیته اندازه گیری شده} = \frac{\text{ویسکوزیته حداقل} - \text{ویسکوزیته حداکثر}}{\text{ویسکوزیته}}$$

ویسکوزیته، ویسکوزیته خاص ( $\eta_{sp}$ ) بود که از طریق معادله زیر محاسبه شد:

$$\eta_{sp} = (t - t_0) / t_0$$

$t$ ، زمان خروج محلول کلاژن و  $t_0$ ، زمان خروج حلال است. دمای تخریب حرارتی به دمایی گفته می شود که در آن ویسکوزیته به نصف مقدار حداکثر خود کاهش یابد.

#### ۹.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل نتایج و رسم نمودارها از نرم افزار آماری SPSS و Origin Pro استفاده شد. برای بررسی

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی و بازده استخراج و تولید کلاژن پوست ماهی کپور نقره‌ای (%).

I-PSC	PSC	I-ASC	ASC	ترکیب کلاژن
۸/۱۳ ± ۰/۰۱ <sup>a</sup>	۷/۶۰ ± ۰/۰۴	۱۰/۰ ± ۷۲/۱۳ <sup>b</sup>	۹/۴۶ ± ۰/۰۵ <sup>ab</sup>	رطوبت
۹۱/۸۳ ± ۰/۰۱ <sup>a</sup>	۹۲/۳۴ ± ۰/۰۹ <sup>a</sup>	۸۹/۲۳ ± ۰/۲۱ <sup>b</sup>	۹۰/۰ ± ۴۹/۱۰ <sup>ab</sup>	پروتئین کل
۰/۰۲ ± ۰/۰۱ <sup>a</sup>	۰/۰۲ ± ۰/۱۱ <sup>a</sup>	۰/±۰۱ ۰/۰۳ <sup>a</sup>	۰/۰۲ ± ۰/۰۱ <sup>a</sup>	خاکستر
۰/۰۱ ± ۰/۰۹ <sup>a</sup>	۰/۰۲ ± ۰/۰۵ <sup>a</sup>	۰/۰۱ ± ۰/۰۱ <sup>a</sup>	۰/۰۲ ± ۰/۰۶ <sup>a</sup>	چربی
۵۷/±۵۴ ۰/۱۳ <sup>a</sup>	۵۸/±۷۵ ۰/۱۵ <sup>a</sup>	۴۰/±۲۷ ۰/۵۰ <sup>c</sup>	۴۲/±۸۵ ۰/۰۵ <sup>b</sup>	بازده استخراج
۵۴/±۱۸ ۰/۰۹ <sup>a</sup>	۵۴/±۱۸ ۰/۱۰ <sup>a</sup>	۳۹/±۸۷ ۰/۱۱ <sup>b</sup>	۳۹/±۸۷ ۰/۰۷ <sup>b</sup>	بازده تولید
۹۶/±۳۸ ۰/۰۱ <sup>b</sup>	۸۵/±۰۱ ۰/۱۱ <sup>d</sup>	۹۴/±۱۳ ۰/۰۸ <sup>a</sup>	۸۲/±۳۴ ۰/۰۳ <sup>c</sup>	خلوص

اعداد داخل جدول بیانگر میانگین و انحراف معیار حاصل سه تکرار می باشند

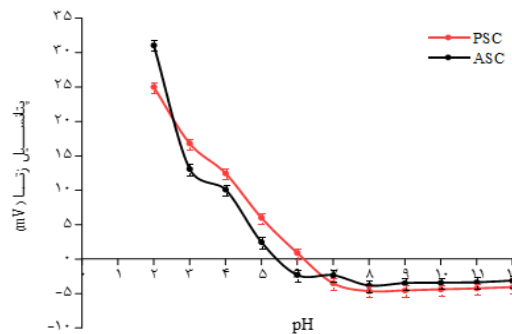
در pH ۲ تا ۶ هر دو کلاژن بار شبکه مثبت داشتند. اما با افزایش pH بار شبکه کلاژن‌ها کاهش (بار منفی) یافت. در نهایت نقطه ایزوالکتریک ASC و PSC به ترتیب در

#### ۲.۳. پتانسیل زتا

شکل ۱، پتانسیل زتای کلاژن‌های ASC و PSC در محدوده pH ۲ تا ۱۲ را نشان می دهد. با توجه به نمودار

کلاژن‌ها صفر بود بدست آمد.

محدوده ۵/۵۸ و ۶/۱۲ که در آن محدوده بار سطح شبکه



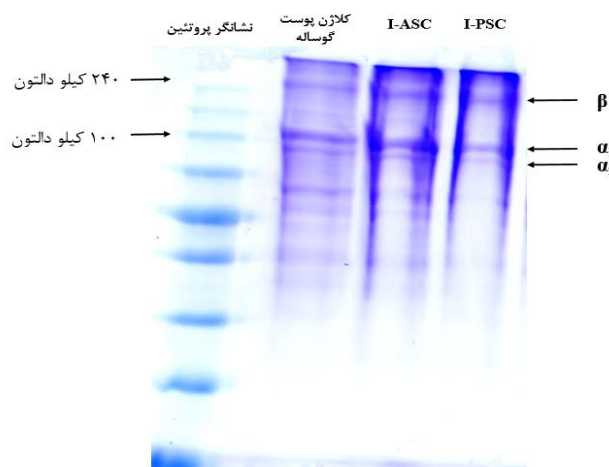
شکل ۱- نمودار بررسی پتانسیل زتای کلاژن پوست ماهی کپور نقره‌ای

#### ۴.۳. ترکیب اسیدآمینه

ترکیب اسیدآمینه کلاژن‌های I-PSC و I-ASC به وسیله HPLC تعیین و در جدول ۲ گزارش شده است. نتایج نشان داد که I-PSC و I-ASC ترکیب اسیدآمینه مشابه دارند. گلیسین بعنوان فراوان‌ترین اسیدآمینه در I-PSC و I-ASC به ترتیب به میزان ۳۱۳ و ۳۲۰ در ۱۰۰۰ اسیدآمینه یافت شد. علاوه بر این آنالیز HPLC مقادیر نسبتاً بالایی از اسیدآمینه‌های آلانین، پرولین و گلوتامیک اسید و مقادیر کمی از اسیدآمینه متیونین، تیروزین و هیستیدین را نشان داد. سیستمین نیز شناسایی نشد.

#### ۳.۳. الگوی SDS-PAGE

شکل ۲، مشخصات الگوی SDS-PAGE کلاژن‌های I-PSC و I-ASC و کلاژن نوع I پوست گوساله به همراه نشانگر پروتئینی برای تعیین وزن مولکولی را نشان می‌دهد. نتایج الگوی SDS-PAGE نشان داد که I-ASC و I-PSC همانند کلاژن نوع I پوست گوساله از دو زنجیره  $\alpha$  متفاوت  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  (۱۰۰ کیلو دالتون) تشکیل شده‌اند. علاوه بر این ترکیبات با وزن مولکولی بالا، زنجیره  $\beta$  نیز در I-PSC و I-ASC در ناحیه ۲۴۰ کیلو دالتون مشاهده شد.



شکل ۲- الگوی SDS-PAGE کلاژن پوست ماهی کپور نقره‌ای

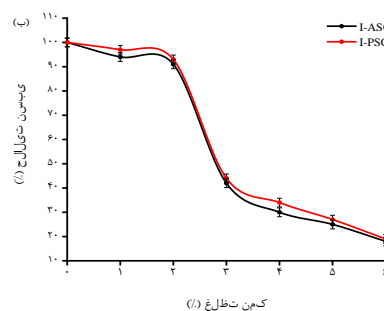
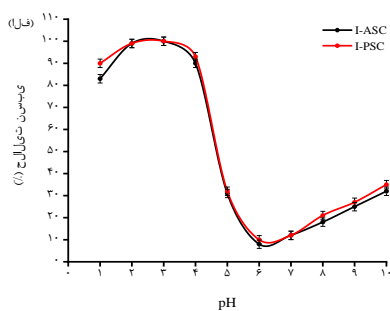
جدول ۲- ترکیب اسید آمینه کلاژن پوست کپور نقره‌ای (تعداد اسید آمینه در ۱۰۰۰ اسید آمینه)

کلاژن پوست ماهی کپور نقره‌ای		اسید آمینه
I-PSC	I-ASC	
۳۲۰	۳۱۳	گلیسین
۱۲۷	۱۲۴	آلانین
۱۲۳	۱۱۵/۰۶	پرولین
۲۲/۲۷	۲۳	والین
۱۱/۷۷	۱۰/۲۰	ایزولوسین
۱۹/۸	۲۱/۶	لوسین
۱۳/۵	۱۳	فنیل آلانین
۴/۲۳	۴/۹۸	متیونین
۴۲/۷۰	۴۹	آسپارتیک اسید
۸۳	۸۹	گلوتامیک اسید
۶۲/۸۲	۶۳/۹۰	آرژنین
۳۲	۳۱	لیزین
۳۳	۳۴/۱	سیرین
۵/۳۱	۷/۹۶	هیستیدین
۲۳	۲۵	ترئونین
۰	۰	سیستئین
۴/۸۰	۵/۲۰	تیروزین
۷۱/۸۰	۷۰	هیدروکسی پرولین
۱۰۰۰	۱۰۰۰	محتوی کل
۱۹۴/۸۰	۱۸۵/۰۶	ایمینو اسید

### ۵.۳. حالیت

بدست آمد. در نتیجه حالیت در pH قلیایی کمی افزایش یافت. اثر NaCl بر حالیت کلاژن‌ها در شکل ۳ (ب) نشان داده شده است. حالیت کلاژن‌ها در اسید استیک ۰/۵ مولار به ترتیب در غلظت NaCl ۱ درصد و ۲ درصد حفظ شد. در حالیکه حالیت با افزایش غلظت NaCl به ۳ درصد و بالاتر کاهش چشمگیری نشان داد ( $P < ۰/۰۵$ ).

شکل ۳ (الف)، حالیت کلاژن در سطوح مختلف pH را نشان می‌دهد، بالاترین حالیت کلاژن‌ها در pH ۲ و ۳ ( $P < ۰/۰۵$ ) مشاهده شد و یک کاهش چشمگیر در حالیت در نتیجه افزایش pH از ۵ تا ۷ ( $P < ۰/۰۵$ )



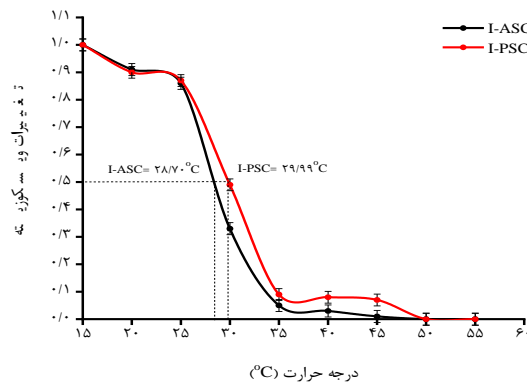
شکل ۳- نمودارهای تغییر حالیت پروتئین کلاژن در سطوح مختلف pH (الف) و غلظت‌های مختلف NaCl (ب)



### ۶.۳. تعیین دمای تخریب حرارتی

شکل ۴، تغییرات ویسکوزیته در برابر حرارتی برای کلاژن‌های I-ASC و I-PSC را نشان می‌دهد. هر دو کلاژن با افزایش دما از دست دادن سریع ویسکوزیته را

نشان دادند. با توجه به تغییرات ویسکوزیته در برابر تیمارهای حرارتی، دمای تخریب حرارتی حدود ۲۸/۷۰ درجه سانتی‌گراد برای I-ASC و ۲۹/۹۹ درجه سانتی‌گراد برای I-PSC از منحنی حرارتی به دست آمد.



شکل ۴- نمودار بررسی تغییرات ویسکوزیته پروتئین کلاژن به منظور تعیین دمای تخریب حرارتی

### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

مولکول‌های پروتئین در یک سیستم آبی در نقطه ایزوالکتریک‌شان بار شبکه صفر دارند. pH که بارهای مثبت و منفی روی پروتئین باهم برابر باشند، به عنوان نقطه ایزوالکتریک تعریف می‌شود (Ahmad *et al.*, 2010). برای رسوب کلاژن در نقطه ایزوالکتریک ابتدا با اندازه‌گیری پتانسیل زتای کلاژن‌های بازیافت شده به روش Salting-out، نقطه ایزوالکتریک کلاژن پوست کپور نقره‌ای تعیین شد. نقطه ایزوالکتریک کلاژن‌های ASC و PSC به ترتیب در pHهای ۵/۵۸ و ۶/۱۲ بدست آمد. مقدار نقطه ایزوالکتریک ASC نسبت به PSC کمی اسیدی‌تر بود. اسیدی بودن نقطه ایزوالکتریک به تراکم بالای گروه‌های کربوکسیل اسید آمینه‌های اسیدی مانند گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید نسبت داده می‌شود (Matmaroh *et al.*, 2011). کلاژن ضایعات ماهیان مختلف مقادیر نقطه ایزوالکتریک مختلف را نشان داده‌اند، برای مثال نقطه ایزوالکتریک کلاژن پوست تیلاپیا (Chen *et al.*, 2016) (ASC: ۶/۴۲)، پوست Unicorn leatherjacket (ASC: ۵/۵۸)

(Ahmad *et al.*, 2010)، پوست golden carp (۶/۱۱) و پوست blacktip shark (ASC: ۶/۷۸ و PSC: ۷/۰۲) (Ali *et al.*, 2018) و پوست (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010) بوده است. مقادیر نقطه ایزوالکتریک کلاژن ممکن است به علت سکوننس متنوع اسیدآمینه و توزیع اسیدهای آمینه متفاوت باشد (Chen *et al.*, 2016). طی فرآیند استخراج کلاژن مانع اصلی انحلال کلاژن از منبع استخراج اتصالات عرضی هستند. در واقع حلالیت کلاژن به وسیله پیوندهای کووالانسی از طریق تراکم گروه‌های آلدئیدی در ناحیه تلوپپتید و همچنین اتصالات عرضی بین مولکولی کاهش می‌یابد (Burghagen, 1999). در مطالعه حاضر بازده استخراج پایین در I-ASC (۴۰/۲۷ درصد) و ASC (۴۲/۸۵ درصد) نشان می‌دهد که اسید استیک ۰/۵ مولار نتوانسته پیوندهای کووالانسی را به طور کامل جدا کند. اما بخوبی شناخته شده است آنزیم پپسین می‌تواند کلاژن را بدون آسیب به ماریپچ سه‌گانه‌اش استخراج کند که این امر با بازده بالاتر در I-PSC (۵۷/۵۴ درصد) و PSC (۵۸/۷۵ درصد) تایید شد. نتایج بازده تولید نشان داد که

هیدروکسیل هیدروکسی پرولین به وسیله پیوند هیدروژنی بین زنجیره‌ای و پیوند هیدروژنی مستقیم با گروه کربونیل ساختار ماریچ سه گانه کلاژن را حفظ می‌کند. نتایج بدست آمده نشان داد مقدار کل ایمینواسید I-ASC و I-PSC به ترتیب ۱۸۵/۰۶ و ۱۹۴/۸۰ در ۱۰۰۰ اسیدآمین به بودند که این مقدار پایین‌تر از کلاژن پوست گوساله ۲۱۵ در ۱۰۰۰ اسیدآمین به بود (Giraud-Guille *et al.*, 2000). در نتیجه کلاژن پوست کپور نقره‌ای ثبات حرارتی پایین‌تر از کلاژن پستانداران دارد. تفاوت در مقادیر هیدروکسی پرولین بین گونه‌ها به محیط زیست و دمای بدن آنها بستگی دارد (Rigby, 1968). الگوی الکتروفورز نمونه‌های کلاژن پوست ماهی کپور نقره‌ای در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج الگوی SDS - PAGE نشان داد که هر دو کلاژن دارای زنجیره‌های  $\alpha$  و  $\beta$  (دی‌مر زنجیره  $\alpha$ ) با باندهای برجسته به ترتیب در ناحیه ۱۰۰ و ۲۵۰ کیلو دالتون‌اند. وجود دو زنجیره  $\alpha$  متفاوت  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$ ، که شدت باند  $\alpha_1$  بیشتر از  $\alpha_2$  است آنها را به عنوان کلاژن هتروتریمر طبقه‌بندی می‌کند. علاوه بر زنجیره  $\alpha$ ، مقداری زنجیره  $\beta$  نیز در الگوی SDS - PAGE کلاژن‌ها مشاهده شده است که نشان می‌دهد کلاژن‌ها از نظر اتصالات عرضی بین و دورن مولکولی غنی بودند. الگوی SDS - PAGE کلاژن‌های I-ASC و I-PSC شبیه بود. شباهت الگو نشان دهنده این است مولکول کلاژن آنزیمی بدون آسیب به یکپارچگی ساختار ماریچ سه گانه‌اش از پوست ماهی جدا شده است و آنزیم پیسین تاثیری بر ساختار آن نداشته است. با توجه به الگوی توزیع باند و تحرک الکتروفورز مشابه در I-ASC و I-PSC با کلاژن نوع I پوست گوساله می‌توان پیشنهاد کرد که کلاژن‌های پوست ماهی کپور نقره‌ای اساساً از نوع کلاژن I می‌باشند. این نتایج با نتایج الگوی SDS - PAGE کلاژن پوست bigeye snapper (Benjakul *et al.*, 2010) و کلاژن پوست کپور معمولی (Duan *et al.*, 2009) مطابقت دارد. رفتار حلالیت کلاژن با تغییرات در pH و غلظت NaCl نقش تعیین کننده‌ای را در پردازش و کاربردهای مختلف

میزان کلاژن استخراج شده از محتوی کلاژن اولیه پوست برای نمونه‌های PSC و I-PSC (۵۴/۱۸ درصد) باهم و همچنین در نمونه‌های ASC و I-ASC (۳۹/۸۷ درصد) باهم یکسان بودند. اما محتوی پروتئین کل در نمونه‌ها متفاوت بود. محتوی پروتئین کل در کلاژن‌های بازیافت شده به روش رسوب ایزوالکتریک پایین‌تر بود. پایین بودن محتوی پروتئین کل در I-PSC و I-ASC را می‌توان به رسوب ایزوالکتریک نسبت داد. در رسوب ایزوالکتریک، پروتئین‌ها براساس نقطه ایزوالکتریک‌شان و به‌صورتی انتخابی رسوب داده می‌شوند. از این رو مانع از رسوب پروتئین‌های ناخواسته شده و خلوص پروتئین را افزایش می‌دهند (جدول ۱). بنابراین تفاوت در بازده استخراج در نمونه‌های رسوب ایزوالکتریک و روش Salting-out احتمالاً به علت رسوب پروتئین‌های دیگر در روش Salting-out باشد. ترکیب اسیدآمین کلاژن مسئول خصوصیات فیزیکی-شیمیایی و ثبات حرارتی آن می‌باشد. گلیسین به عنوان فراوان‌ترین اسیدآمین در کلاژن‌های استخراجی نقش منحصربه‌فردی را در ساختار کلاژن ایفا می‌کند. به‌طور کلی گلیسین یک سوم از کل اسیدآمین را تشکیل می‌دهد و در هر باقی مانده در کلاژن به جزء ۱۴ اسیدآمین اول از N - ترمینال و ۱۰ اسیدآمین اول از C - ترمینال رخ می‌دهد (Burghagen, 1999). بعد از گلیسین مهم‌ترین اسیدآمین‌ها، ایمینواسیدها (پرولین و هیدرکسی پرولین) بودند که حدود ۳۵ درصد از موقعیت بدون گلیسین در واحد تکرار شونده Gly - X - Y را تشکیل می‌دهند (Friess, 1998). مقدار کل ایمینواسیدها فاکتور مهمی است که بر پایداری حرارتی ساختار کلاژن تاثیر می‌گذارد، به‌طوری‌که هر چه محتوی ایمینواسیدها بالاتر باشد ساختار کلاژن پایدارتر خواهد بود. در واقع تمامیت کلاژن به مقدار ایمینواسیدها بستگی دارد (Benjakul *et al.*, 2010). ایمینواسیدها با استفاده از حلقه‌های پیرولیدین پرولین و هیدروکسی پرولین ساختار دوم را با محدودیت‌هایی که روی ترکیب زنجیره پلی‌پپتید اعمال می‌کند با ثبات‌تر می‌کنند و از تغییرات احتمالی در ساختارشان جلوگیری می‌کنند. علاوه بر این گروه

ویسکوزیته تعیین شد. کلاژن‌ها در اسید استیک ۰/۵ مولار حل شدند و سپس در معرض تیمارهای حرارتی قرار گرفتند. باتوجه به بررسی تغییرات ویسکوزیته در تیمارهای حرارتی مختلف و نمودار حرارتی بدست آمده دمای تخریب حدود ۲۸/۷۰ درجه سانتی‌گراد برای I-ASC و ۲۹/۹۹ درجه سانتی‌گراد برای I-PSC تعیین شد. با افزایش دما پیوندهای هیدروژنی کلاژن به تدریج شکسته شده در نتیجه ساختار ماریپج سه گانه کلاژن که به وسیله پیوند هیدروژنی سازمان یافته به کویل‌های تصادفی به وسیله فرآیند دی پلیمریزاسیون تبدیل می‌شوند که با تغییر در خصوصیات فیزیکی مانند ویسکوزیته، رسوب‌گذاری، انتشار، پراکندگی نور و فعالیت نوری همراه هستند (Usha and Ramasami, 2004). دمای تخریب بالاتر I-PSC نسبت به I-ASC با محتوی بالاتر ایمینواسید آنها مرتبط است. نتایج نشان داد که دمای تخریب کلاژن پوست ماهی کپور نقره‌ای مشابه کلاژن‌های گونه‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری مانند balloon fish (۲۹/۰۱ درجه سانتی‌گراد: ASC, ۳۰/۰۱ درجه سانتی‌گراد: PSC)، common carp (۲۸ درجه سانتی‌گراد: ASC) (Duan et al., 2009; Huang et al., 2011) grass carp (۲۸/۴ درجه سانتی‌گراد: PSC) (Zhang et al., 2007) و بالاتر از کلاژن ماهیان آب سرد مانند Baltic cod (۱۵ درجه سانتی‌گراد) (Rigby, 1968)، Argentine hake (۱۰ درجه سانتی‌گراد)، Alaska Pollack (۱۶/۸ درجه سانتی‌گراد) و chum salmon (۱۹/۴ درجه سانتی‌گراد) (Chi et al., 2014) و پایین‌تر از کلاژن پوست گوساله (۳۶/۳ درجه سانتی‌گراد) (Ogawa et al., 2003) و خوک (۳۷ درجه سانتی‌گراد) (Nagai et al., 1999) است. تفاوت در دمای تخریب کلاژن گونه‌های مختلف به تفاوت در ترکیب اسیدآمینه آنها بر می‌گردد که با دمای بدن و محیط زندگی گونه در ارتباط است (Rigby, 1968).

پروتئین کلاژن بازی می‌کند. نمودار شکل ۳ (الف) تاثیر pH بر حلالیت کلاژن را نشان می‌دهد. هردو کلاژن الگوی حلالیت مشابه‌ای را نشان دادند. باتوجه به روند مشاهده شده بیشترین حلالیت در محدوده pH اسیدی از ۱ تا ۴ رخ داد که با نزدیک شدن به pH نقطه ایزوالکتریک به حداقل مقدار خود رسید. سپس با عبور از محدوده نقطه ایزوالکتریک به سمت pH قلیایی، حلالیت کمی افزایش یافت. اثر pH بر حلالیت پروتئین را می‌توان با استفاده از نقطه ایزوالکتریک توضیح داد. هنگامیکه pH محلول پروتئین بالا و پایین نقطه ایزوالکتریک است بار شبکه اسیدآمینه مولکول پروتئین بیشتر است که این امر سبب می‌شود حلالیت به وسیله نیروی دافعه بین زنجیره‌ها افزایش یابد (Vojdani, 1996). در مقابل در نقطه ایزوالکتریک بار شبکه صفر برهمکنش آب گریز - آب گریز پروتئین را افزایش می‌دهد و سبب رسوب و تجمع پروتئین می‌شود. از این رو تفاوت در pH تعیین کننده حلالیت پروتئین کلاژن به تفاوت در خصوصیات مولکولی و ساختار کلاژن بر می‌گردد (Kittiphattanabawon et al., 2005). نمودار شکل ۳ (ب) اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر میزان حلالیت پروتئین کلاژن را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد کلاژن محلول در اسید استیک ۰/۵ مولار در غلظت NaCl ۱ و ۲ درصد حلالیتش را در بالاترین سطح حفظ کرد اما با افزایش غلظت NaCl حلالیت به طور چشمگیری کاهش یافت. کاهش حلالیت کلاژن‌ها در غلظت‌های نسبتاً بالا NaCl را می‌توان به پدیده Salting-out نسبت داد (Asghar and Henrickson, 1982). با افزایش قدرت یونی، حلالیت پروتئین به وسیله برهمکنش‌های آب گریز - آب گریز بین زنجیره‌های پروتئین و افزایش جذب مولکول‌های آب توسط یون‌های نمک کاهش یافته و سبب رسوب پروتئین می‌گردد (Jongjareonrak et al., 2005). ثبات حرارتی کلاژن معمولاً به وسیله دمای تخریب در محلول توصیف می‌شود. دمای که ساختار ماریپج سه گانه کلاژن در محلول به کویل‌های تصادفی تجزیه شود را دمای تخریب می‌گویند (Usha and Ramasami, 2004). بدین منظور دمای تخریب کلاژن به وسیله اندازه‌گیری

## نتیجه گیری کلی

خلوص بالاتری را ارائه می‌دهد. بنابراین با استفاده از روش استخراج آنزیمی و رسوب ایزوالکتریک می‌توان پروتئین کلاژن با بازده و خلوص بالا را از پوست ماهی کپور نقره‌ای بدست آورد.

این مطالعه به منظور بررسی ضایعات پوست ماهی کپور نقره‌ای به‌عنوان یک منبع بالقوه کلاژن و استفاده از روش رسوب ایزوالکتریک به منظور بازیافت کلاژن محلول استخراجی صورت پذیرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که روش استخراج آنزیمی کلاژن از پوست ماهی کپور نقره‌ای می‌تواند بازده تولید بالا و پروتئین کلاژن با خصوصیات دمایی بهتر را بدون تاثیر آنزیم بر ساختاراش ارائه دهد. همچنین استفاده از روش رسوب ایزوالکتریک در در مرحله بازیافت کلاژن محلول، پروتئین کلاژن با

## تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور حمایت مالی شده است. بدین وسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور سپاسگزاری می‌شود.

## References

## ۵. منابع

- Ahmad, M., Benjakul, S., Nalinanon, S., 2010. Compositional and physicochemical characteristics of acid solubilized collagen extracted from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Hydrocolloids* 24(6-7), 588-594.
- Ali, A.M.M., Kishimura, H., Benjakul, S., 2018. Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus Jullieni*) as affected by ultrasonication. *Process Biochemistry* 66, 237-244.
- AOAC, 2005. AOAC-Association of official analytical chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International 18th ed, Gaithersburg, Maryland, USA 45, 75-76.
- Asghar, A., Henrickson, R., 1982. Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems. *Advances in food research* 28, 231-372.
- 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*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 132-138.
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L., 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 336, 93-104.
- Burghagen, M., 1999. Collagen. *Food chemistry*' (Eds HD Belitz, W Grosch) pp, 540-547.
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., Hong, B., 2016. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT-Food Science and Technology* 66, 453-459.
- Chi, C.F., Wang, B., Li, Z.R., Luo, H.Y., Ding, G.F., Wu, C.W., 2014. Characterization of Acid-soluble Collagen from the Skin of Hammerhead Shark (*Sphyrna lewini*). *Journal of food biochemistry* 38, 236-247.
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., Konno, K., 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food chemistry* 112, 702-706.

- Friess, W., 1998. Collagen–biomaterial for drug delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 45, 113-136.
- Giraud-Guille, M.-M., Besseau, L., Chopin, C., Durand, P., Herbage, D., 2000. Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterials* 21, 899-906.
- Huang, Y.-R., Shiau, 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 Hydrocolloids* 25, 1507-1513.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., Tanaka, M., 2005. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry* 93, 475-484.
- Kawaguchi, Y., Kondo, E., Kitamura, N., Arakaki, K., Tanaka, Y., Munekata, M., Nagai, N., Yasuda, K., 2011. In vivo effects of isolated implantation of salmon-derived crosslinked atelocollagen sponge into an osteochondral defect. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22, 397-404.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., Tanaka, M., 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food chemistry* 89, 363-372.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Shahidi, F., 2010. Isolation and properties of acid- and pepsin-soluble collagen from the skin of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *European Food Research and Technology* 230, 475-483.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Liu, D., Zhou, P., Li, T., Regenstein, J.M., 2014. Comparison of acid-soluble collagens from the skins and scales of four carp species. *Food Hydrocolloids* 41, 290-297.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1) 256-275.
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A.B., Kishimura, H., 2011. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food chemistry* 129, 1179-1186.
- Montero, P., Jiménez-Colmenero, F., Borderías, J., 1991. Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus Gibb*) muscle and skin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54, 137-146.
- Nagai, T., Ogawa, T., Nakamura, T., Ito, T., Nakagawa, H., Fujiki, K., Nakao, M., Yano, T., 1999. Collagen of edible jellyfish exumbrella. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 855-858.
- Nagai, T., Suzuki, N., 2002. Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, *Linnaeus*) outer skin. *Food Chemistry* 76, 149-153.
- Ogawa, M., Moody, M.W., Portier, R.J., Bell, J., Schexnayder, M.A., Losso, J.N., 2003. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 51, 8088-8092.
- Rigby, B., 1968. Amino-acid composition and thermal stability of the skin collagen of the Antarctic ice-fish. *Nature* 219, 166-167.
- Rodziewicz-Motowidło, S., Ślądowska, A., Mulkiewicz, E., Kołodziejczyk, A., Aleksandrowicz, A., Miskiewicz, J., Stepnowski, P., 2008. Isolation and characterization of a thermally stable collagen preparation from the outer skin of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Aquaculture* 285, 130-134.

- Usha, R., Ramasami, T., 2004. The effects of urea and n-propanol on collagen denaturation: using DSC, circular dichroism and viscosity. *Thermochimica Acta* 409, 201-206.
- Vojdani, F., 1996. Solubility. *Methods of testing protein functionality*, 11-60.
- Woessner Jr, J., 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of biochemistry and biophysics* 93, 440-447.
- Zhang, Y., Liu, W., Li, G., Shi, B., Miao, Y., Wu, X., 2007. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food chemistry* 103, 906-912.