

بررسی ساختار شیمیایی کلاژن ماهی سفید (*Rutilus Kutum*) از دریای خزر و کلاژن ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) از خلیج فارس

- سهیلا نادری قره قشلاق: گروه زیست شناسی دریا، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- شهلا جمیلی*: سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران
- محمد جواد فاطمی: گروه جراحی پلاستیک و ترمیمی، مرکز تحقیقات سوختگی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، بیمارستان حضرت فاطمه (س)، تهران، ایران
- علی محمد شریفی: گروه فارماکولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- محمدرضا نورانی: گروه میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۶

چکیده

کلاژن دارای کاربردهای فراوانی در زمینه داروسازی و پزشکی، تهیه محصولات بهداشتی و آرایشی و صنایع غذایی می‌باشد. در سال‌های اخیر توجه زیادی به جداسازی کلاژن از موجودات دریایی شده است که علت آن عدم محدودیت استفاده از آن در رژیم غذایی و عدم ایجاد خطر ابتلا به بیماری‌های مسری می‌باشد. در این مطالعه به استخراج کلاژن از پوست ماهی سفید از ماهیان اقتصادی دریای خزر و ماهی قباد یکی از گونه‌های تن ماهیان خلیج فارس پرداخته شده است. کلاژن پوست ماهی سفید و ماهی قباد به روش اسید و باز استخراج گردید و سپس به وسیله FTIR، SDS-PAGE، Pico.Tag و اسپکتروفوتوگرافی UV مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج براساس SDS-PAGE و ترکیبات اسیدهای آمینه نشان دادند که کلاژن پوست هر دو ماهی کلاژن نوع I و از دو زنجیره α (1α و 2α) با وزن مولکولی ۱۳۰ kDa و مقدار جری β تشکیل شده است. همچنین تجزیه و تحلیل FTIR، ترتیبات مارپیچی از هر دو کلاژن را نشان داد و اسپکتروفتومتری UV در هر دو نمونه کلاژن پوست ماهی سفید و ماهی قباد حداکثر جذب را در ۲۴۰ نانومتر نشان داد. میزان کلاژن استخراج شده از پوست ماهی سفید ۱۵/۶٪ و ماهی قباد ۱۴/۵٪ بود. تجزیه و تحلیل اسیدآمینه در کلاژن‌های استخراج شده، مقدار بالایی از گلیسین را در هر دو نمونه کلاژن، ماهی سفید ۱۸۲/۵ residues بر residues ۷۰۶/۱ و ماهی قباد ۱۸۸/۶ residues بر residues ۷۰۶/۱ را نشان داد که آن یک سوم از کل اسیدهای آمینه محاسبه گردید و همچنین مقدار پرولین به عنوان یک اسیدآمینه منحصر به فرد در کلاژن ماهی سفید ۸۹/۶ residues بر residues ۷۰۶/۱ و در ماهی قباد residues ۸۶/۸ بر residues ۷۰۶/۱ بود.

کلمات کلیدی: ماهی سفید، ماهی قباد، کلاژن پوست ماهی، ترکیب اسیدآمینه، دریای خزر، خلیج فارس



مقدمه

وجود کلاژن در تمامی بافت‌های پیوندی، آن‌را به یکی از مولکول‌های ماده‌ی خارج سلولی (ECM) تبدیل کرده است که بیش‌ترین مطالعه در مورد آن‌ها انجام شده است. این نوع پروتئین رشته‌ای جزء اصلی پوست و استخوان هستند و تقریباً ۲۵ درصد کل وزن خشک پستانداران را دربر می‌گیرند (Alberts و همکاران، ۲۰۰۲). تا به امروز ۲۹ نوع تشخیص داده شده و تمامی آن‌ها نوعی ساختار مارپیچی سه گانه را نمایش می‌دهند. انواع کلاژن I و II و III و V و XI تشکیل فیبرهای کلاژنی می‌دهند. مولکول‌های کلاژن متشکل از سه زنجیره‌ی α هستند که باهم به دلیل ساختار مولکولی شان جفت می‌شوند. هر زنجیره‌ی α تشکیل شده از بیش از ۱۰۰۰ آمینواسید بر پایه‌ی توالی Gly-X-Y می‌باشند. قرارگیری گلیسین هر از سه آمینواسید جهت تأمین اتصال محکم سه زنجیره‌ی α در مولکول تریپوکلاژن ضروری است و مکان‌های X و Y اغلب توسط پرولین و ۴-هیدروکسی پرولین پر می‌شود (Kivirikko و Prockop، ۱۹۹۵؛ Van der Rest و Garrone، ۱۹۹۱). کلاژن ماهی نوع I، به لحاظ حلالیت فوق‌العاده زیاد آن در اسید رقیق در مقایسه با کلاژن پستانداران و ماکیان منحصر به فرد است. در مقایسه با کلاژن نوع I گوساله، کلاژن نوع I مهره‌داران پست تر مشتق شده از ماهیان استخوانی و لامپری، میزان تشابه ساختاری زیادی را بین گونه‌ها با توجه به زنجیره‌های $\alpha 1$ و $\alpha 2$ نشان می‌دهد. پیش‌ماده‌های کلاژن با اثرگذاری بر ویژگی‌های رشد سلول‌ها و تنظیم جنبه‌های مختلف رفتار و عملکرد سلولی مانند الحاق سلولی، تکثیر و تمایز شناخته می‌شوند. مطالعات گذشته روشن کرده است که ترکیب کلاژن ماهی مشابه کلاژن پستانداران است (Bae و همکاران، ۲۰۰۸؛ Nagai و همکاران، ۲۰۰۴؛ Nagai و همکاران، ۲۰۰۱؛ Kimura و همکاران، ۱۹۸۸؛ Kimura و همکاران، ۱۹۸۳). برای مثال گلیسین فراوان‌ترین آمینواسید است، که بیش از ۳۰ درصد تمامی آمینواسیدها را شکل می‌دهد. به علاوه میزان هیدروکسیلاسیون پرولین ۴۸-۳۵ درصد محاسبه شده است، که مشابه میزان مشاهده شده در بافت‌های پستانداران (تقریباً ۴۵ درصد) است. به علاوه، ارتباطی خطی بین پایداری کلاژن و محتوای هیدروکسی پرولین عموماً دیده شده است. کلاژن در پزشکی برای تهیه انواع کرم‌ها، گاز و باندهای ویژه پانسمان و ترمیم زخم و در داروسازی برای تهیه کپسول‌های دارویی و قرص‌ها مصرف می‌شود (Reppond، ۱۹۹۸). به‌طور کلی، پوست و استخوان گاو و خوک، به‌عنوان منابع اصلی استخراج کلاژن و ژلاتین هستند. در سال‌های اخیر توجه زیادی به جداسازی کلاژن از موجودات دریایی شده است که علت آن عدم محدودیت استفاده از آن در رژیم غذایی و عدم ایجاد خطر ابتلا به بیماری‌های مسری که شامل جنون گاوی، آنفولانزای خوکی و مرغی و هم‌چنین

بیماری‌های گوارشی در گاو‌ها، خوک‌ها و بوفالوها می‌باشد (Yamada و همکاران، ۲۰۱۴). همه‌ساله مقادیر قابل توجهی کلاژن به کشور وارد شده و از این طریق ارز زیادی از کشور خارج می‌گردد. به‌علاوه ایران منابع عظیم دریایی (انواع ماهیان دریای شمال و جنوب) را دارد که می‌توان از ضایعات شیلات به‌عنوان ماده اولیه برای تولید کلاژن استفاده نمود. طبق آمار و ارقام شیلات کشور، هر ساله بیش از ۱۳ درصد کل ماهیان صید شده را ضایعات آن‌ها تشکیل می‌دهد (رحیمی و همکاران، ۱۳۸۹). ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) خزر از خانواده Cyprinidae، یکی از گونه‌های بومی دریای خزر است. اندازه آن بین ۴۵-۵۵ سانتی‌متر و وزن آن به‌ندرت به ۵ کیلوگرم می‌رسد. جمعیت آن به‌طور عمده در پاییز و بهار در رودخانه ایران و در آب‌های شیرین نواحی جنوب و جنوب‌غربی دریای خزر یافت می‌شود. ماهی سفید بیش از ۵ درصد از صید و بیش از ۶۰ درصد از درآمد صیادان ماهیان استخوانی را به‌خود اختصاص می‌دهد (عبدالمالکی و غنی‌نژاد، ۱۳۸۶؛ دریانبرد و همکاران، ۱۳۸۸). ماهی سفید فون خاص دریای خزر بوده و جزو گونه‌های قطب شمال محسوب می‌شود که بعد از دوران یخبندان یعنی ۱۲-۱۰ هزار سال پیش وارد این دریا شده و خصوصیات بومی دریای خزر کسب کرده است (قاسم‌اف، ۱۳۷۲). ماهی سفید در سواحل دریای خزر از رودخانه ترک در قسمت شمالی دریا تا سواحل جنوبی و به‌خصوص مناطق غربی و شرق آنزلی و نیز در رودخانه اترک پراکنده و زندگی می‌کند. در قسمت شمالی به‌ویژه ولگا و اورال بندرت دیده می‌شود (کازانچف، ۱۹۸۱). در سواحل ایران تجمع و پراکندگی این ماهی به شرایط فیزیکی از قبیل درجه حرارت، جریانات دریایی و مواد غذایی بستگی دارد. این ماهی جهت تخم‌ریزی و زاد و ولد وارد رودخانه‌ها و تالاب‌های گرد (رضوی‌صیاد، ۱۳۶۹). ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) نوعی گونه مهاجر پلاژیک-نر تیک است و در آب‌های ساحلی در اعماق بین ۱۵ تا ۲۰ متر زندگی می‌کند. این گونه دارای مهاجرت‌های بین اقیانوسی است و برخی مواقع وارد آب‌های گل‌آلود خورها نیز می‌شود. این ماهی در دسته‌های کوچک یافت می‌شود و در طول سواحل اقیانوس هند- غرب اقیانوس آرام در خلیج فارس، هند و سریلانکا تا جنوب شرق آسیا، شمال تا هنگ‌کنگ و هم‌چنین خلیج واکاسا و دریای ژاپن پراکنده است. بیش‌ترین میزان صید ماهی قباد در سواحل ایرانی خلیج فارس طی ماه‌های نوامبر و ژانویه صورت می‌گیرد (Collette، ۲۰۰۱).

مواد و روش‌ها

استخراج کلاژن از پوست ماهی قباد از خلیج فارس و ماهی سفید از دریای خزر (تمامی مراحل استخراج در دمای ۴ درجه انجام گردید).

دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. سپس با محلول رنگ بر شامل متانول، استیک اسید گلاسیال و آب مقطر رنگ‌بری صورت پذیرفت.

تجزیه و تحلیل اسیدهای آمینه: تمامی مراحل انجام این آزمایش در سازمان انرژی اتمی ایران انجام گردید. برای تجزیه و تحلیل اسیدهای آمینه از روش Pico.Tag استفاده گردید (Cohen و Tarvin, ۱۹۸۴) براساس این متد مشتق اسید آمینه و تعیین phenylthiocarbonyl مشتقی از اسیدهای آمینه با استفاده از فنیل ایزوتیوسیانات و فاز معکوس با کارایی بالای کروماتوگرافی مایع به ترتیب انجام گردید. کلژن خشک پوست ماهی (۱۰-۲۰ میلی گرم) با اسید کلریدریک ۶ M که حاوی ۱٪ فنول (v/v) مخلوط گردید. سپس مخلوط در معرض گاز N₂ قرار گرفت و قبل از هیدرولیز در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت، vacum گردید. بعد از هیدرولیز نمونه‌ها خنک شدند و با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شدند. ۲۵ میکرولیتر از پروتئین خشک و مشتق‌گیری شدند که ۱۰ میکرولیتر از مخلوط متانول، آب و تری متیل آمین با نسبت‌های ۱:۲:۲ اضافه شد. نمونه مخلوط گردید و سپس برای ۵ دقیقه خشک شد. پس از آن ۲۰ میکرولیتر از متانول، آب، تری متیل آمین و فنیل ایزوتیوسیانات با نسبت‌های ۱:۱:۱:۷ به آن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد) زیر وکیوم خشک گردید و سپس در ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات با pH ۷/۴ حل گردید و سپس با فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر شدند. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های فیلتر شده با استفاده از اتوماتیک (WISPTM) (Millipore Corp, Milford, MA, USA) به داخل ستون Pico.Tag برای آنالیز آمینواسید تزریق شدند.

تست IR-FT: طیف‌بینی مادون قرمز یکی از تکنیک‌های مورد استفاده برای تعیین ساختار ثانویه پلی‌پپتید و پروتئین‌ها است. این تکنیک طیف‌بینی، دارای قابلیت عدم تخریب نمونه می‌باشد. در این طیف‌بینی، گروه‌های عاملی موجود در ترکیبات مختلف، دارای قدرت جذب متفاوت اشعه‌های مادون قرمز در ناحیه‌های مختلف عدد موج را دارا می‌باشند. اطلاعات طیف‌بینی مادون قرمز تحت عنوان ارتعاشات واحد ساختاری (گروه‌های عاملی) نمودار می‌شوند. باندهای امید I و امید II از باندهای غالب در ساختار پروتئین و پلی‌پپتید می‌باشند. حساس‌ترین ناحیه در طیف باند آمیدی I با عدد موج ۱۶۰۰-۱۱۷۰۰ cm⁻¹ است که متعلق به ارتعاشات کششی پیوند C=O در اتصالات پپتیدی پلی‌پپتید یا پروتئین می‌باشد. در مقایسه با آن باندهای امید II متعلق به ارتعاشات پیوند CN می‌باشد (Kong و همکاران، ۲۰۰۷). به منظور بررسی طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) تست FTIR براساس روش Xu و همکاران (۲۰۱۲) انجام گرفت. طیف‌های FTIR در رزولوشن ۴ سانتی‌متر در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ سانتی‌متر در دمای

مواد: ماهی تازه از بازارهای ماهی فروشی خریداری شد، پولک‌ها کاملاً پاک شدند، پس از جدا نمودن پوست ماهی‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها با آب شستشو داده شدند و سپس به قطعات ریز (۵/۵×۰/۵ سانتی‌متر) خرد شدند. سپس با آب مقطر سرد شستشو داده شدند.

مواد شیمیایی: NaOH، B-mercaptoethanol، pursin pepsin، acetic acid، Bothyle alcohol (Butanol)، tris (Hydroxymethyl) aminomethane، sodium dodecyl sulfate (SDS)، coomassie Brilliant blu R-250

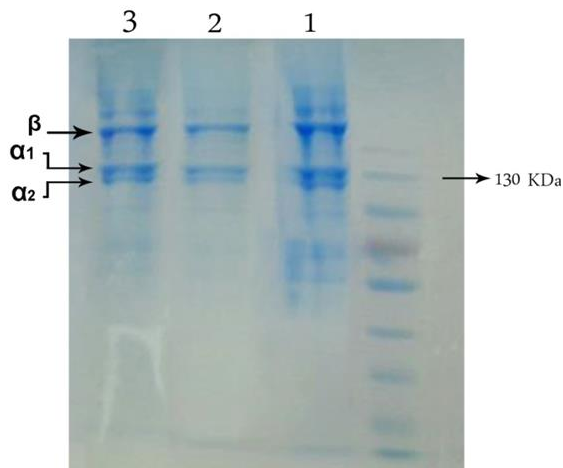
استخراج قلبیایی مواد پروتئینی غیر کلژنی: تمامی مراحل با استفاده از روش Nagai و Suzuki (۲۰۰۰) با مقدار کمی تغییر انجام داده شد. ابتدا نمونه‌های با استفاده از آب مقطر چندین بار شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها به NaOH ۰/۱ مولار با نسبت (w/v) ۱:۱۰ اضافه گردید. سوسپانسیون ۲۴ ساعت هم‌زده شد. محلول نهایی را از صافی رد کرده و با آب مقطر شستشو داده شد تا pH آن خنثی شود. **چربی‌زدایی از بافت:** نمونه در محلول بوتیل الکل (v/v) ۱:۱۰ با نسبت ۱:۱۰ به مدت ۲۴ ساعت استیرر شدند. هر ۸ ساعت محلول تعویض گردید. بافت بدون چربی با آب مقطر سرد به‌طور کامل شستشو داده شد.

آماده‌سازی کلژن محلول در اسید (ASC) از پوست ماهی قباد: برای استخراج کلژن، بافت آماده شده در اسیداستیک ۰/۵ M با نسبت (w/v) ۱:۱۵ به مدت ۳ روز روی استیرر قرار گرفت. مخلوط از طریق دو لایه پارچه پنبه صاف گردید. سپس سوپرناتانت جمع‌آوری گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. باقی‌مانده به همان روش قبلی مجدداً استخراج گردید. هر دو سوپرناتانت به‌دست آمده در NaCl ۰/۹ مولار به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس به NaCl برای به‌دست آمدن یک غلظت نهایی از ۲/۶ مولار در ۰/۰۵ تریس با pH ۷ (هیدروکسی متیل آمینومتان) اضافه گردید. رسوب حاصل به‌وسیله سانتریوفیوژ یخچال‌دار سیگما با ۱۰۰۰۰ برای مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری گردید. رسوب به‌دست آمده در کیسه دیالیز (کیسه دیالیز D116، D117) برای ۲۴ ساعت در آب مقطر دیالیز گردید که هر ۶ ساعت آب دیالیز تعویض شد تا زمانی که به pH طبیعی برسد. رسوب دیالیز شده به‌وسیله فریز درایر خشک گردید و به‌عنوان کلژن محلول در اسید معرفی گردید.

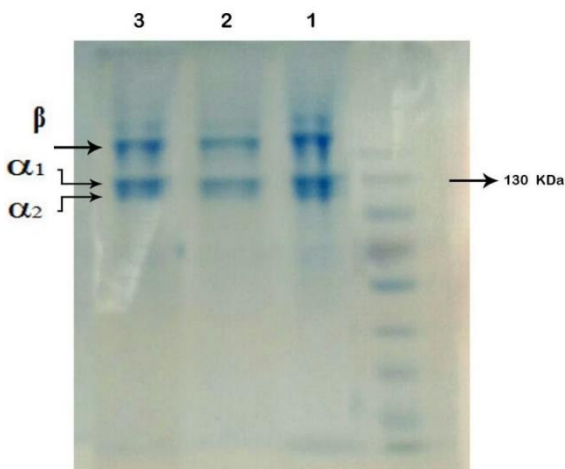
آزمون SDS-PAGE: برای انجام این آزمون از ژل پلی‌آکریل آمید ۳۰/۸٪ استفاده شد. در این مرحله از ژل پایین ۱۰٪ و از ژل بالای ۴٪ استفاده شد. هر دو کلژن ماهی سفید و ماهی قباد در اسیداستیک ۴٪ حل شده و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش گذاشته شدند و سپس هر دو روی ژل منتقل گردیدند و نهایتاً الکتروفورز با ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۴ ساعت انجام شد. بعد از الکتروفورز، ژل باکوماسی آبی به مدت ۲۰



قباد دارای وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون می‌باشد. هم‌چنین نتایج حاصل از آزمون SDS-PAGE نشان داد که کلاژن ماهی قباد از دو زنجیره α ($\alpha 1$ و $\alpha 2$) و β تشکیل شده است (شکل ۲).



شکل ۱: الگوی SDS-PAGE کلاژن محلول در اسید: ۱- مارکر پروتئین و ۲، ۳ ASC پوست ماهی *Rutilus kutum*



شکل ۲: الگوی SDS-PAGE کلاژن محلول در اسید: ۱- مارکر پروتئین و ۲، ۳ ASC پوست ماهی *Scomberomorus guttatus*

ترکیب اسید آمینه

کلاژن ماهی سفید (*Rutilus kutum*): ترکیب آمینواسید کلاژن ماهی سفید در جدول ۱ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل اسید آمینه مقدار بسیار بالایی از glycine را در کلاژن استخراج شده از پوست ماهی سفید نشان داد که حدود یک سوم از کل اسیدهای آمینه را شامل می‌شود. علاوه بر این پرولین به عنوان یک اسید آمینه منحصر به فرد در ASC می‌باشد که دارای مقدار مشخصی ۸۹/۶ residues

اتاق مورد بررسی قرار گرفت. در این رابطه، قرص‌های KBr شامل دو میلی‌گرم نمونه در حدود ۱۰۰ میلی‌گرم برمایدپتاسیم تهیه شد. سپس قرص‌های حاصله در سل مخصوص دستگاه FTIR مدل NEXUS ۸۷۰ ساخت شرکت Nicolet قرار داده شد و با استفاده از نرم‌افزار OPUS آنالیزهای مربوطه انجام شده و طیف مربوطه تهیه گردید.

اسپکتروفتومتری UV: جذب اتمی UV کلاژن در محدوده طول موج ۲۲۰-۳۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu انجام شد. کلاژن خالص در اسیداستیک ۰/۴٪ میلی‌گرم/میلی‌لیتر برای به دست ۰/۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر حل گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول در ۸۰۰ میکرولیتر از اسیداستیک ۰/۴ M حل گردید. سپس مقدار از محلول همگن شده داخل کوارتز سل برای تعیین طول موج جذب قرار داده شد.

نتایج

کلاژن

استخراج کلاژن از پوست ماهی سفید (*Rutilus kutum*):

کلاژن از پوست ماهی سفید به روش Nagia و Suzki (۲۰۰۰) استخراج گردید. میزان کلاژن استخراج شده از پوست ماهی سفید ۱۵/۶٪ بود. این نتیجه حاصل نشان داد که میزان کلاژن به دست آمده از پوست ماهی سفید خیلی بیش‌تر از میزان کلاژن پوست Brown stripe red snaper (۹٪) و کم‌تر از کلاژن پوست ماهی Japanese sea-bass (۵۰/۱٪)، bullhead shark (۵۰/۱٪) بود (Nagia و همکاران، ۲۰۰۰).

استخراج کلاژن از پوست ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) از خلیج فارس:

کلاژن از پوست ماهی قباد به روش Nagia و Suzki (۲۰۰۰) استخراج گردید. میزان کلاژن استخراج شده از پوست ماهی قباد ۱۴/۵٪ بود.

آزمون SDS-PAGE

ماهی سفید (*Rutilus kutum*): کلاژن استخراج شده از پوست

ماهی سفید به وسیله آزمون SDS-PAGE امتحان شد. نتیجه حاصل از آزمون نشان داد که کلاژن‌های استخراج شده از پوست ماهی سفید دارای وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون می‌باشد. هم‌چنین نتایج حاصل از آزمون SDS-PAGE نشان داد که کلاژن ماهی سفید از دو زنجیره α ($\alpha 1$ و $\alpha 2$) و β تشکیل شده است (شکل ۱).

ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*): کلاژن استخراج شده

از پوست ماهی قباد به وسیله آزمون SDS-PAGE امتحان شد. نتیجه حاصل از آزمون نشان داد که کلاژن‌های استخراج شده از پوست ماهی



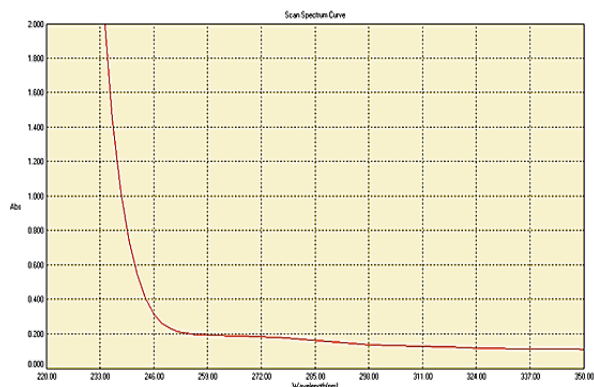
جدول ۲: ترکیب اسید آمینه کلآژن ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*)

اسید آمینه	مقدار
آلانین	۸۴/۳
آرژنین	۷۱/۸
اسپاراتات	۴۱/۱
سیستئین	۰
گلوتامات	۸۷/۸
گلیسین	۱۸۸/۶
هیستیدین	۹/۱
ایزولوسین	۱۰/۸
لوسین	۲۲/۱
لیزین	۳۳/۳
متیونین	۱۴/۱
فنیل آلانین	۲۰/۷
پرولین	۸۶/۸
سرین	۲۶/۳
ترئونین	۲۰/۷
تیروزین	۳/۹

مقادیر به صورت میانگین آورده شده است؛ انحراف معیار

اسپکتروفتومتری UV

ماهی سفید (*Rutilus kutum*): اسپکتروفتومتری کلآژن پوست ماهی سفید در شکل ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه جذب UV از ASC در طول موج ۲۲۰-۳۵۰ نانومتر می باشد. بیش تر پروتئین ها حداکثر جذب اشعه ماوراء بنفش را در ۲۸۰ نانومتر دارند که به تعداد تیروزین و باقی مانده های تریپتوفان در پروتئین ها ارتباط دارد. اما مقدار تیروزین در ASC ۴/۴ residues بر ۱۰۰۰ residues بود. اسپکتروفتومتری UV حداکثر جذب را در ۲۴۰ نانومتر نشان داد که این ممکن است به گروه های C=O, -COOH, CONH₂ در زنجیره های پلی پپتیدهای کلآژن مربوط باشد.



شکل ۱: نمودار جذب طیف UV ماهی سفید (*Rutilus kutum*)

۷۰۶/۱ residue می باشد. آلانین و گلوتامات و آرژنین و پرولین بیش ترین میزان از اسیدهای آمینه را دارا می باشند که می تواند به عنوان مشخصات کلآژن در این مطالعه به دست آمده باشد. در کلآژن استخراج شده تریپتوفان و سیستئین وجود نداشت و آمینواسیدهای متیونین و تیروزین و هیستیدین کم ترین میزان در کلآژن را دارا بودند.

جدول ۱: ترکیب اسید آمینه کلآژن ماهی سفید (*Rutilus kutum*)

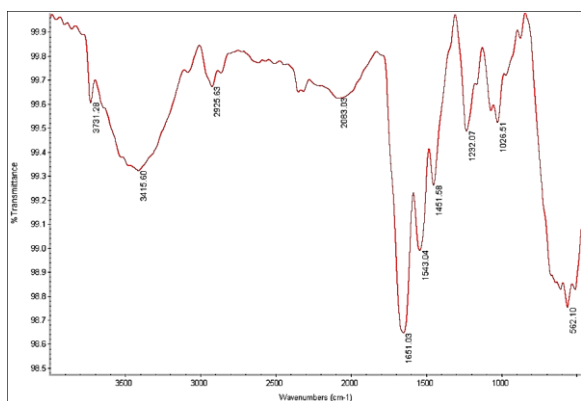
اسید آمینه	مقدار
آلانین	۷۳/۱
آرژنین	۷۰/۸
اسپاراتات	۴۲/۱
سیستئین	۰
گلوتامات	۸۱/۱
گلیسین	۱۸۲/۵
هیستیدین	۸/۸
ایزولوسین	۱۰/۷
لوسین	۲۱/۱
لیزین	۳۱/۱
متیونین	۱۴/۸
فنیل آلانین	۲۰/۶
پرولین	۸۹/۶
سرین	۳۴/۸
ترئونین	۲۰/۶
تیروزین	۴/۴

مقادیر به صورت میانگین آورده شده است؛ انحراف معیار

ترکیب اسید آمینه کلآژن ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*)

ترکیب اسید آمینه کلآژن ماهی قباد در جدول ۲ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل اسید آمینه مقدار بسیار بالایی از glycine را در کلآژن استخراج شده از پوست ماهی سفید نشان داد که حدود یک سوم از کل اسیدهای آمینه را شامل می شود. علاوه بر این پرولین به عنوان یک اسید آمینه منحصر به فرد در ASC می باشد که دارای مقدار مشخصی ۸۶/۸ residues بر ۷۰۶/۱ residue می باشد. آلانین و گلوتامات و آرژنین و پرولین بیش ترین میزان از اسیدهای آمینه را دارا می باشند که می تواند به عنوان مشخصات کلآژن در این مطالعه به دست آمده باشد. در کلآژن استخراج شده تریپتوفان و سیستئین وجود نداشت و آمینواسیدهای متیونین و تیروزین و هیستیدین کم ترین میزان در کلآژن را دارا بودند.

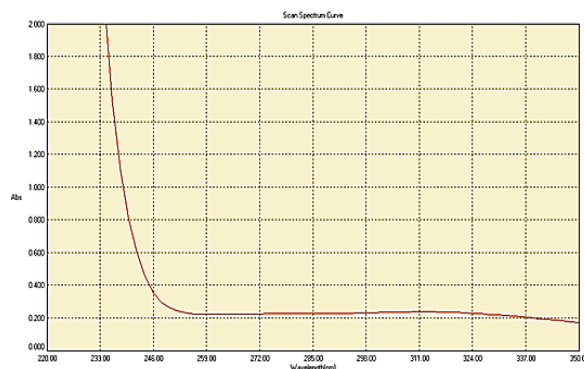
پیوند آمید I معمولاً در محدوده $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ می‌باشد که به وسیله ارتعاش کششی از $\text{C}=\text{O}$ در پلی پپتید پروتئین تولید می‌شود. این ناحیه به تغییرات ساختار دوم پروتئین حساس است و اغلب برای آنالیز ساختار دوم پروتئین استفاده می‌شود. پیک جذبی امید I در 1651 cm^{-1} به دست آمد. باند امید II در 1543 cm^{-1} دیده شد. پیک امید III در کمپلکس با عکس‌العمل‌های داخل سلولی در کلارژن است که شامل ترکیباتی از $\text{C}-\text{N}$ کششی و $\text{N}-\text{H}$ در سطح همواری از ارتباطات امید و همچنین جذب‌های ارتعاشی ناشی از تکان CH_2 می‌باشد.



شکل ۳: نمودار FTIR کلارژن ماهی سفید (*Rutilus kutum*)

ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*): طیف‌های FTIR در محدوده $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ از کلارژن محلول در اسید از ماهی قباد در شکل ۴ ارائه شده است. گروه امید A مربوط به فرکانس کششی $\text{N}-\text{H}$ می‌باشد. ارتعاش کششی $\text{N}-\text{H}$ در محدوده $3440\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ رخ می‌دهد. باند امید A پوست ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) در 3415 cm^{-1} مشاهده شد. گروه امید B کلارژن در 2925 cm^{-1} در ارتباط با کشش نامتقارن از CH_2 مشخص شد. موقعیت امید باند I در 1680 cm^{-1} جذب شد که در ارتباط با ارتعاش کششی $\text{C}=\text{O}$ از باند پیوند هیدروژن جفت شده با COO می‌باشد که آن به ساختار دوم پروتئین مرتبط می‌باشد. پیک امید III کلارژن در 1240 cm^{-1} و 1450 cm^{-1} جذب گردید که باندها ساختار مارپیچی را نشان دادند. طیف مادون قرمز ثبت شده برای فیلم‌های نازک ساخته شده از کلارژن ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) باندهای متداول برای کلارژن نوع I: امید A، امید B، امید I، امید II و امید III نشان داد. ویژگی‌های امید A معمولاً با ارتعاش کششی $\text{N}-\text{H}$ مربوط است که در محدوده $3440\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ رخ می‌دهد. ماکزیمم پیک جذب شده از کلارژن ماهی قباد *Scomberomorus guttatus* در 3501 cm^{-1} به دست آمد. هنگامی که گروه $\text{N}-\text{H}$ از یک پپتید شامل یک پیوند هیدروژنی باشد موقعیت شروع به تغییر جهت به فرکانس‌های پایین می‌کند. تعداد موج‌های مشخصه جذب شده در پیوند امید I معمولاً در محدوده

ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*): اسپکتروفتومتری کلارژن پوست ماهی قباد در شکل ۲ نشان داده شده است. در این مطالعه جذب UV از ASC در طول موج $220\text{--}350\text{ nm}$ نامتر می‌باشد. اسپکتروفتومتری UV حداکثر جذب را در 240 nm نشان داد که این ممکن است به گروه‌های $\text{C}=\text{O}$, $-\text{COOH}$, CONH_2 در زنجیره‌های پلی پپتیدهای کلارژن مربوط باشد.



شکل ۲: نمودار جذب طیف UV کلارژن ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*)

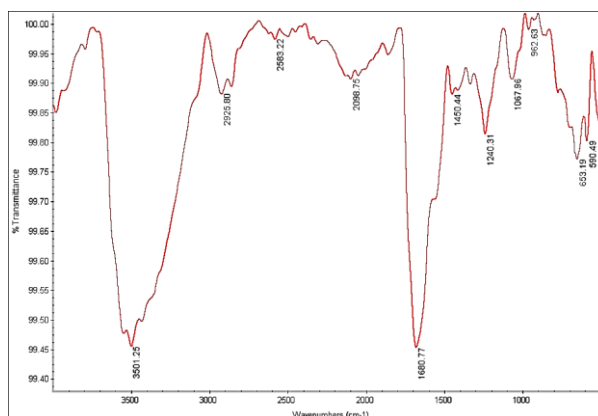
تست FTIR

ماهی سفید (*Rutilus kutum*): طیف‌های FTIR در محدوده $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ از کلارژن محلول در اسید از ماهی سفید در شکل ۳ ارائه شده است. گروه امید A مربوط به فرکانس کششی $\text{N}-\text{H}$ می‌باشد. ارتعاش کششی $\text{N}-\text{H}$ در محدوده $3440\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ رخ می‌دهد. باند امید A پوست ماهی سفید (*Rutilus kutum*) در 3415 cm^{-1} مشاهده شد. گروه امید B کلارژن در 2925 cm^{-1} در ارتباط با کشش نامتقارن از CH_2 مشخص شد. موقعیت امید باند I در 1651 cm^{-1} جذب شد که در ارتباط با ارتعاش کششی $\text{C}=\text{O}$ از باند پیوند هیدروژن جفت شده با COO می‌باشد که آن به ساختار دوم پروتئین مرتبط می‌باشد. پیک امید III کلارژن در 1232 cm^{-1} و 1451 cm^{-1} جذب گردید که باندها ساختار مارپیچی را نشان دادند. طیف مادون قرمز ثبت شده برای فیلم‌های نازک ساخته شده از کلارژن ماهی سفید (*Rutilus kutum*) باندهای متداول برای کلارژن نوع I: امید A، امید B، امید I، امید II و امید III نشان داد. ویژگی‌های امید A معمولاً با ارتعاش کششی $\text{N}-\text{H}$ مربوط است که در محدوده $3440\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ رخ می‌دهد. ماکزیمم پیک جذب شده از کلارژن ماهی سفید *Rutilus kutum* در 3415 cm^{-1} به دست آمد. هنگامی که گروه $\text{N}-\text{H}$ از یک پپتید شامل یک پیوند هیدروژنی باشد موقعیت شروع به تغییر جهت به فرکانس‌های پایین می‌کند. تعداد موج‌های مشخصه جذب شده در

به‌عنوان اسیدآمینه اصلی از گلايسين Salmon fish (Tylingo) و همکاران، (۲۰۱۶) کم‌تر بودند اما با نتایج Nile perch (Muyonga) و همکاران، (۲۰۰۴) و channel catfish (Guo و Liu، ۲۰۰۷) مشابهت داشتند. دلیل پایین بودن میزان گلايسين در ماهی *Scomberomorus gttatus* و *Rutilus kutum* نسبت به ماهی Salmon fish ممکن است به دلیل آلوده شدن توسط سایر پروتئين‌ها باشد. مشخصات هر دو نمونه کلاژن از جمله میزان بالای آلانين، اسیدهای آمينه گلوتامات- آرژينين و پرولين می‌تواند به‌عنوان یافته این مطالعه باشد. تیروزين، هیستيدين، متيونين و ایزولوسين در کلاژن هر دو ماهی بسیار پایین بود که با ماهی تون Albacore، ماهی Rohu و Lung Fish مشابهت داشت. سيستئين يا تريپتوفان در نمونه‌ها شناسایی نشد (Hema و همکاران، ۲۰۱۳؛ Eastoe، ۱۹۵۶). الگوی توزیع ترکیب اسیدآمینه کلاژن پوست هر دو ماهی سفید و قباد همانند کلاژن پوست channel catfish (Liu و همکاران، ۲۰۰۷) بود که ثابت کرد کلاژن ماهی *Rutilus kutum* و ماهی *Scomberomorus gttatus* می‌تواند به‌عنوان کلاژن نوع I دسته‌بندی گردد.

در این مطالعه طول موج جذبی کلاژن ماهی سفید (*Rutilus kutum*) و ماهی قباد (*Scomberomorus gttatus*) در ۲۴۰ نانومتر بود که به جذب کلاژن سایر ماهی‌ها مانند Nile tilapia، Walleye Pollock، black pomfret نزدیک‌تر بود (AlizadehNodeh و همکاران، ۲۰۱۴؛ Zeng و همکاران، ۲۰۰۹؛ Yan و همکاران، ۲۰۰۸). بیش‌تر پروتئين‌ها بیش‌ترین جذب فرابنفش را در ۲۸۰ نانومتر دارند. فنیل آلانين، تريپتوفان و تیروزين باندهای جذبی بين ۲۵۰ و ۲۹۰ دارند (Zhanh و همکاران، ۲۰۱۱؛ Yan و همکاران، ۲۰۰۸). در صورتی که طول موج جذب کلاژن ماهی سفید و کلاژن ماهی قباد کم‌تر بود که این ممکن است به دلیل گروه‌های C=O، COOH، CONH₂ در زنجیره‌های پپتیدهای کلاژن باشد (Zeng و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین آن‌سازگار با ویژگی‌های یک کلاژن می‌باشد. طیف‌های FTIR کلاژن ماهی *Rutilus kutum* و ماهی *Scomberomorus gttatus* در محدوده ۴۰۰۰-۴۰۰ cm⁻¹ بود که مشابه به کلاژن ماهی‌های Nile، channel catfish، Walleye Pollock، perch بودند (Liu و همکاران، ۲۰۰۸؛ Yan و همکاران، ۲۰۰۸؛ Muyonga و همکاران، ۲۰۰۴). گروه امید A مربوط به فرکانس کششی N-H می‌باشد. ارتعاش کششی N-H در محدوده ۳۴۴۰-۳۴۰۰ رخ می‌دهد. باند گروه امید A و B کلاژن پوست ماهی سفید (*Rutilus kutum*) در ۳۴۱۵ cm⁻¹ و ۲۹۲۵ cm⁻¹ و کلاژن پوست ماهی قباد (*Scomberomorus gttatus*) در ۳۵۰۱ cm⁻¹ و ۲۹۲۵ cm⁻¹ مشاهده شد که به کشش نامتقارن از CH₂ نسبت داده شد (Muyonga و همکاران، ۲۰۰۴). موقعیت امید باند I کلاژن ماهی سفید در ۱۶۵۱ cm⁻¹ و در ماهی قباد در ۱۶۸۰ cm⁻¹ جذب شد که

۱۷۰۰-۱۶۰۰ cm⁻¹ می‌باشد که به‌وسیله ارتعاش کششی از C=O در پلی‌پپتید پروتئين تولید می‌شود. این ناحیه به تغییرات ساختار دوم پروتئين حساس است و اغلب برای آنالیز ساختار دوم پروتئين استفاده می‌شود. پیک جذبی امید I در ۱۶۸۰ cm⁻¹ به‌دست آمد. باند امید II در ۱۴۵۰ cm⁻¹ دیده شد. پیک امید III در کمپلکس باعکس‌العمل‌های داخل سلولی در کلاژن است که شامل ترکیباتی از C-N کششی و N-H در سطح همواری از ارتباطات امید و هم‌چنین جذب‌های ارتعاشی ناشی از تکان CH₂ می‌باشد.



شکل ۴: نمودار FTIR کلاژن ماهی قباد (*Scomberomorus gttatus*)

بحث

ASC (کلاژن محلول در اسید) از پوست ماهی قباد (*Scomberomorus gttatus*) و پوست ماهی سفید استخراج شد که به‌عنوان trimmers از دو زنجیره متفاوت α (1α و 2α) تشکیل شده بودند. بر این اساس موقعیت ارتعاشی الکتروفورز 1α متفاوت از 2α در هر دو نمونه بود که زنجیره 1α فضای ارتعاشی بیش‌تری داشت. که این نشان داد وزن مولکولی 2α کوچک‌تر از وزن مولکولی 1α می‌باشد. بنابراین براساس ترکیب زبر واحد و ارتعاش الکتروفورز نشان می‌دهد که کلاژن پوست ماهی *Scomberomorus gttatus* و پوست ماهی *Rutilus kutum* کلاژن نوع I و شامل دو زنجیره 1α و 2α می‌باشند. یافته‌های این تحقیق با مطالعات (Tylingo، ۲۰۱۶؛ Alizadeh Nodeh، ۲۰۱۴؛ Singh و همکاران، ۲۰۱۰؛ Duan و همکاران، ۲۰۰۹؛ Zhang و همکاران، ۲۰۰۹؛ Yan و همکاران، ۲۰۰۸؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۷؛ Senaratne و همکاران، ۲۰۰۶؛ Jongjareonrak و همکاران، ۲۰۰۵؛ Ogawa و همکاران، ۲۰۰۴) مشابهت داشت. تجزیه و تحلیل اسیدآمینه در کلاژن‌های استخراج شده، مقدار بالایی از گلايسين در هر دو نمونه ماهی سفید و ماهی قباد را نشان داد که آن یک سوم از کل اسیدهای آمينه محاسبه گردید و به‌طور قابل توجهی

- characterisation of associated bioactive peptidic fractions. Meat Science. Vol. 90, No. 1, pp: 226-235.
۱۱. **Bidlingmeyer, B.A.; Cohen, S.A. and Tarvin, L., 1984.** Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatisation. Journal of Chromatography. Vol. 336, pp: 93-104.
 ۱۲. **Cao, H. and Xu, S.Y., 2008.** Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage. Food Chem. Vol. 108, pp: 439-445.
 ۱۳. **Collette, B.B.; Carpenter, K.E. and Niem, V., 2001.** The Living Marine Resources of the Western Central Pacific, Scombridae, Tunas (also, albacore, bonitos, mackerels, seerfishes and Wahoo). FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. FAO Publication, Rome. pp: 3721-3756.
 ۱۴. **Ding J.F.; Li, Y.Y.; Xu, J.J.; Su, X.R.; Gao, X. and Yue, F.P., 2011.** Study on effect of jelly fish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation. Food Hydrocolloids. Vol. 25, No. 5, pp: 1350-1353.
 ۱۵. **Duan, R.; Zhang, J.; Du, X.; Yao, X. and Konno, K., 2009.** Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*) food chemistry. Vol. 112, pp: 702-706.
 ۱۶. **Edwards, H.G.M.; Farwell, D.W.; Holder, J.M. and Lawson, E.E., 1997.** Fouriertransform Raman spectroscopy of ivory: II. Spectroscopic analysis and assignments. Journal of Molecular Structure. Vol. 435, pp: 49-58.
 ۱۷. **Eastoe, J.E., 1958.** The Amino Aside Composition of Fish Collagen and Gelatin. The British Gelatin and Glue Research Association, 2a Dalmeny Avenue, London. No. 7, 57 p.
 ۱۸. **Friess, W., 1998.** Collagen biomaterial for drug delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. Vol. 45, pp: 113-136.
 ۱۹. **Falihatkar, B.; Poursaeid, S.; Ershad Langrodi, H.; Efatpanah, I.; Meknatkhah, B. and Rahmati, M., 2013.** Spawning induction in Kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamensky), with different hormones: Analysis of hormone profiles and induced spawning success., Arch. Pol. Fish. Vol. 21, pp: 271-281,
 ۲۰. **Foegeding, E.; Lanier, T.C. and Hultin, H.O., 1996.** Characteristics of edible muscle tissue. In O. R. Fennema (Ed.), Food chemistry (3rd ed.,). New York: Marcel Dekker. pp: 879-942
 ۲۱. **Gómez-Guillén, M.C.; Giménez, B.; López-Caballero, M.A. and Montero, M.P., 2011.** Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Food Hydrocolloids. Vol. 25, No. 8, pp: 1813-1827.
 ۲۲. **Hema, G.S.; Shyni, K.; Suseela Mathew, R.; Ninan, G. and Lakshmanan, P.T., 2013.** A simple method for isolation of fish skin collagen- biochemical characterization of skin collagen extracted from Albacore Tuna (*Thunnus Alalunga*), Dog Shark (*Scoliodon Sorrakowah*), and Rohu (Labeo Rohita). Scholars Research Library, Annals of Biological Research. Vol. 4, No. 1, pp: 271-278.
- در ارتباط با ارتعاش کششی C=O از باند پیوند هیدروژن جفت شده با COO می‌باشد (Payne و Veis, ۱۹۹۸) که آن به ساختار دوم پروتئین مرتبط می‌باشد. پیک آمید III کلاژن پوست ماهی سفید در ۱۲۳۲ cm⁻¹ و ۱۴۵۱ cm⁻¹ و برای ماهی قباد در ۱۲۴۰ cm⁻¹ و ۱۴۵۰ cm⁻¹ جذب گردید که نشان‌دهنده ساختار مارپیچی باندها بود (Le و همکاران, ۲۰۰۷). بنابراین بررسی‌های FTIR ترتیبات مارپیچی از کلاژن پوست ماهی *Rutilus kutum* و ماهی *Scomberomorus guttatus* را نشان داد.

منابع

۱. رحیمی، م.؛ خواجوی، ر. و مهدوی‌هزاوه، م.، ۱۳۸۹. تولید کلاژن نوع اول و به‌کارگیری آن در مصارف پزشکی. مجله علوم پزشکی دانشگاه تهران. شماره ۴، صفحات ۲۴۶ تا ۲۵۱.
۲. رضوی‌صیاد، پ.، ۱۳۶۹. ارزیابی ذخایر و مدیریت ماهیان استخوانی و اقتصادی دریای مازندران. شرکت سهامی شیلات ایران.
۳. قاسم‌اف، س.، ۱۳۷۲. دریای خزر. ترجمه: عادل، ا.، ۱۳۷۹. مرکز تحقیقات شیلاتی انزلی. ۵۶ صفحه.
۴. کازانچف، ان.، ۱۹۸۱. ماهیان دریای خزر و حوزه آبریز آن. ترجمه: شریعتی، ا.، ۱۳۷۱. شرکت سهامی شیلات ایران. ۱۷۱ صفحه.
۵. **Abdoli, A., 1999.** The Inland Water Fishes of Iran. Natural and Wild Life Museum of Iran, Tehran. pp: 198-200.
۶. **Abedin, M.Z.; Karim, A.A.; Gan, C.Y.; Ghazali, F.C.; Barzideh, Z.; Zzaman, W. and Zaidul, I.S.M., 2015.** Identification of angiotensin I converting enzyme inhibitory and radical scavenging bioactive peptides from sea cucumber (*Stichopus vastus*) collagen hydrolysates through optimization. International Food Research Journal. Vol. 22, No. 3, pp: 1074-1082.
۷. **AlizadehNodeh, M.; Moradi, Z. and Nourani, MR., 2014.** Isolation and Purification of Collagen from the Skin of Black Pomfret (*Parastromateus niger*) for Tissue Engineering Purpose. Journal of Appleid Tissue Engineering. Vol. 1, No. 1, pp: 18-21.
۸. **Barzideh, Z.; Latiff, A.A.; Gan, C.Y.; Abedin, M. and Alias, A.K., 2014.** ACE inhibitory and antioxidant activities of collagen hydrolysates from the ribbon jelly fish (*Chrysaora* sp.). Food Technology and Biotechnology. Vol. 52, No. 4, pp: 495-504.
۹. **Balian, G.; Bowes, JH.; In, A.G.; Ward, K. and Courts, A., 1977.** The science and technology of gelatin. London: Academic Press. pp: 1-30.
۱۰. **Bernardini, R.D.; Mullen, A.M.; Bolton, D.; Kerry, J.; O'neill, E. and Hayes, M., 2012.** Assessment of the Angiotensin-I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmic proteins produced by papain and



- isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepsheadseabream (*Archosargus probatocephalus*). food chemistry. Vol. 88, pp: 495-501.
۳۸. **Pachence, J.M., 1996.** Collagen-Based Devices for Soft Tissue Repair. J. Biomed. Res. (Applied Biomaterials). Vol. 33, pp: 35-40.
۳۹. **Payne, K.J. and Veis, A., 1988.** Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the Amide I band for conformational studies. Biopolymers. Vol. 27, pp: 1749-1760.
۴۰. **Palpandi, C.; Ramasamy, P.; Rajinikanth, T.; Vairamani, S. and Shanmugam, A., 2010.** Extraction of Collagen from Mangrove Archeogastropod *Nerita* (Dostia) *crepidularia* Lamarck, 1822. American-Eurasian Journal of Scientific Research. Vol. 5, No. 1, pp: 23-30.
۴۱. **Saiga, A.; Iwai, K.; Hayakawa, T.; Takahata, Y.; Kitamura, S.; Nishimura, T. and Morimatsu, F., 2008.** Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 56, No. 20, pp: 9586-9591.
۴۲. **Shahidi, F., 1994.** Seafood processing by-products. In: Shahidi F, Botta JR, editors. Seafoods chemistry, processing, technology and quality. Glasgow: Blackie Academic Professional. pp: 11-26.
۴۳. **Sato, K.; Yoshinaka, R.; Sato, M. and Ikeda, S., 1986.** A Simplified Method for Determining Collagen in Fish Muscle. Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries. Vol. 52, No. 5, pp: 889-893.
۴۴. **Senaratne, L.S.; Park, P.J. and Kim, S.K., 2006.** Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lago cephalus gloveri*) skin. Bioresource Technology. Vol. 97, pp: 191-197.
۴۵. **Siddeek, M.S.M.; Fouda, M.M. and Hermosa Jr., G.V., 1999.** Demersal fisheries of the Arabian Sea, the Gulf of Oman and the Persian Gulf. Estuar. Coast. Shelf Sci. Vol. 49, pp: 87-97.
۴۶. **Singh, P.; Benjakul, S.; Maqsood, S. and Kishimura, H., 2011.** Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Food Chemistry. Vol. 124, No. 1, pp: 97-105.
۴۷. **Sionkowska, A.; Kozłowska, J.; Skorupska, M. and Michalska, M., 2015.** Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. Int J Biol Macromol. Vol. 80, pp: 605-609.
۴۸. **Tylingo, R.; Mania, S.; Panek, R.; Piatek, R. and Pawłowicz, R., 2016.** Isolation and Characterization of Acid Soluble Collagen from the skin of African Catfish (*Clarias gariepinus*), Salmon (*Salmo salar*) and Baltic Cod (*Gadus morhua*). J Biotechnol Biomater. Vol. 6, pp: 234-239.
۴۹. **Voet, D.; Voet, J. and Pratt, C.F.D.B., 2006.** Fundamentos de bioquímica. 3ª Ed. Porto Alegre: Arned. 42 p.
۲۳. **Jayakrishnan, A. and Jameel, S.R., 1996.** Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. Biomaterials. Vol. 17, pp: 471-484.
۲۴. **Jongjareonrak, A.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Nagai, T. and Tanaka, M., 2005.** Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstriped snapper (*Lutjanus vitta*). food chemistry. Vol. 93, pp: 475-484.
۲۵. **Jongjareonrak, A.; Benjakul, S.; Visessanguan, W. and Tanaka, M., 2005.** Isolation and characterization of collagen from big eye snapper (*Priacanthus marcracanthus*) skin. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 85, pp: 1203-1210.
۲۶. **Kim, S.K. and Mendis, E., 2006.** Bioactive compounds from marine processing byproducts a review. Food Research Intl. Vol. 39, pp: 383-393.
۲۷. **Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. nature. Vol. 227, pp: 680-685.
۲۸. **Lafarga, T. and Hayes, M., 2014.** Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. Meat Science. Vol. 98, No. 2, pp: 227-239.
۲۹. **Love, R.M.; Yamaguchi, K.; Creach, Y. and Lavety, J., 1976.** The connective tissue and collagen of cod during starvation. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Vol. 55, pp: 487-492.
۳۰. **Lee, C.H.; Singla, A. and Lee, Y., 2002.** Biomedical applications of collagen. Int. J. Pharm. Vol. 221, pp: 1-22.
۳۱. **wang, L.; An, X.; Xin, Z.; Zhao, L. and Hu, Q., 2007.** Isolation and Characterization of Collagen from the Skin of Deep Sea Red fish (*Sebastes mentella*). Journal of food Science. Vol. 72, pp: 450-455.
۳۲. **Liu, H.Y.; Li, D. and Guo, S.D., 2007.** Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Food Chemistry. Vol. 101, pp: 621-625.
۳۳. **Montero, P.; Borderias, J.; Turnay, J. and Leyzarbe, N.A., 1990.** Characterization of hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb) collagen. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 38, pp: 604-609.
۳۴. **Muyonga, J.H.; Cole, C.G.B. and Duodu, K.G., 2004.** Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). Food Chemistry. Vol. 85, pp: 81-89.
۳۵. **Nagai, T. and Suzuki, N., 2000.** Isolation of collagen from fish waste material skin, bone and fins food chemistry. Vol. 68, pp: 277-281.
۳۶. **Nagai, T.; Araki, Y. and Suzuki, N., 2002.** Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). Food Chemistry. Vol. 78, pp: 173-177.
۳۷. **Ogawa, M.; Portier, R.J.; Moody, M.W.; Bell, J.; Schexnayder, M.A. and Losso, J.N., 2004.** Biochemical properties of bone and scale collagens



۵۰. Wang, J.; Wang, Y.; Tang, Q.; Wang, Y.; Chang, Y.; Zhao, Q. and Xue, C., 2010. Antioxidation activities of low-molecular-weight gelatin hydrolysate isolated from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. Journal of Ocean University of China. Vol. 9, No. 1, pp: 94-98.
۵۱. Ward, A.G. and Courts, A., 1977. The Science and Technology of Gelatin. Academic Press, London. 564 p.
۵۲. Xu, R.; Chen, Y.J.; Wan, D.R. and Wang, J., 2012. Identification of four Sedum plant medicines by fourier transform infrared spectra. Phcog Mag. Vol. 8, pp: 107-110.
۵۳. Yan, M.; Li, B.; Zhao, X.; Ren, G.; Zhuang, Y.; Hou, H.; Zhang, X.; Chen, L. and Fan, Y., 2008. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). Food Chemistry. Vol. 107, pp: 1581-1586.
۵۴. Zhang, J.; Duan, R.; Tian, Y. and Konno, K., 2009. Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Journal of food chemistry. Vol. 116, pp: 318-322.
۵۵. Zeng, S.K.; Zhang, C.H.; Lin, H.; Yang, P.; Hong, P.Z. and Jiang, Z., 2009. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of food chemistry. Vol. 116, pp: 879-883.
۵۶. Falahatkar, B.; Poursaeid, S.; Ershad Langrodi, H.; Efatpanah, I.; Meknatkhah, B. and Rahmati, M., 2013. Spawning induction in Kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamensky), with different hormones: Analysis of hormone profiles and induced spawning success., Arch. Pol. Fish. Vol. 21, pp: 271-281.
۵۷. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M. and Roberts, K., 2002. Molecular Biology of the Cell. Garland Science: New York, USA.
۵۸. Van der Rest, M. and Garrone, R., 1991. Collagen family of proteins. FASEB J. Vol. 5, pp: 2814-2823.
۵۹. Prockop, D.J. and Kivirikko, K.I., 1995. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem. Vol. 64, pp: 403-434.
۶۰. Yamada, S.; Yamamoto, K.; Ikeda, T.; Yanagiguchi, K. and Hayashi, Y., 2014. Potency of Fish Collagen as a Scaffold for Regenerative Medicine. Hindawi Publishing Corporation. 8 p.

