

# ارزیابی تاثیر روش‌های استخراج اسیدی و آنزیمی در بازیابی کلاژن از پوست طوطی ماهی (*Scarus ghobban*) و بررسی ویژگی‌های ساختاری، شیمیایی، ضداکسیدانی و عملکردی آن‌ها

شیمای عباسی<sup>۱</sup>، شهاب نقدی<sup>۲\*</sup>، رضوان موسوی ندوشن<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، ایران.  
<sup>۲</sup>گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.  
<sup>۳</sup>گروه شیلات، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد واحد تهران-شمال، تهران، ایران.

\*نویسنده مسئول shahab\_naghdi@modares.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۸

## چکیده

در پژوهش حاضر تاثیر روش‌های استخراج اسیدی و آنزیمی کلاژن از پوست طوطی ماهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بازده استخراج نشان داد که در روش آنزیمی مقدار بازده استخراج سه برابر روش اسیدی بود. به منظور بررسی بیشتر کلاژن‌های به‌دست آمده تست‌های FTIR و SEM مورد استفاده قرار گرفت که نتایج حاکی از آن بود که آمیدهای A و B در نواحی مشابهی برای نمونه‌های به‌دست آمده ظاهر شده بودند و همچنین کلاژن استخراج شده به روش آنزیمی (PSC) در مقایسه با کلاژن استخراج شده به روش اسیدی (ASC) ساختار منظم تری داشت. الگوی الکتروفورز کلاژن‌های استخراج شده مشخص کرد که کلاژن‌های به‌دست آمده نوع I بوده و شامل دو زنجیره ۱α و یک زنجیره ۲α که دانسیته ۱α بیشتر از ۲α می‌باشد. نتایج درصد خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH کلاژن‌های به‌دست آمده نشان داد که در بین غلظت‌های ۰/۱-۰/۰۱-۰/۰۰۱ بالاترین غلظت بهترین عملکرد را داشتند و برای نمونه (ASC) ۳۴/۳۵٪ و در نمونه (ASC<sub>H</sub>) ۵۳/۸۶٪ بود ( $P < 0/05$ ). بررسی خواص امولسیون‌کنندگی نمونه‌های به‌دست آمده مشخص کرد که در شرایط اسیدی در هر دو نمونه فعالیت امولسیون‌کنندگی بالاتری مشاهده شد که بالاترین مقدار آن در کلاژن اسیدی ۶۷/۴۸٪ و در کلاژن آنزیمی ۱۷/۳۲٪ بود ( $P < 0/05$ ). نتایج پایداری امولسیون نشان داد که نمونه‌های کلاژن هیدرولیز شده در تمامی pH ها عملکرد بالاتری را نسبت به نمونه‌های هیدرولیز نشده داشت ( $P < 0/05$ ). حلالیت نمونه‌ها در pH های مختلف متفاوت بود و بالاترین حلالیت نمونه‌ها در pH اسیدی با مقدار ۲/۳۸٪ برای کلاژن اسیدی و ۵/۳٪ برای کلاژن آنزیمی بود ( $P < 0/05$ ). نتایج نشان داد که روش آنزیمی می‌تواند عملکرد مناسب‌تری در استخراج کلاژن از پوست طوطی ماهی داشته باشد.

واژگان کلیدی: طوطی ماهی، کلاژن، DPPH، خواص کارکردی.

## مقدمه

حدوداً شامل ۷۵٪ وزن کل ماهی می‌شود. به همین منظور این مقادیر عظیم ضایعات توجه محققین و صنعت را برای استخراج کلاژن بخود معطوف کرده است، بنابراین مطالعات متنوع و گسترده‌ای در این زمینه انجام شده است (Shahidi and Zhong, 2007). کلاژن و ژلاتین ترکیبات پروتئینی ارزشمندی هستند که عمدتاً در تمامی بافت‌های پیوندی شامل پوست حیوانات، استخوان، غضروف، تاندون و سلول‌های خونی وجود دارد و نیز در تشکیل

در چند دهه‌ی گذشته با توجه به روند رو به رشد جمعیت جهان و افزایش نیاز به پروتئین در برنامه غذایی توجه محققان و صنعت به منابع دریایی جلب شده است که در نتیجه آن مصرف بیشتر آبزیان به خصوص ماهی را در پی داشته است. در همین راستا پس از فرآوری ماهیان مقادیر بسیار زیادی باقی مانده‌های خام حاصل از فرآوری که شامل سر، پوست، باله، فلس و امعاء و احشاء است به جا می‌ماند که

(Huo *et al.*, 2009). آزمایش‌ها نشان داده‌اند که حداکثر خواص ژله‌کنندگی و ویسکوزیته کلاژن نوع اول زمانی حاصل می‌شود که پوست ماهی در مجاورت هیدروکسید سدیم رقیق باشد (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای مشخص شد که ظرفیت اسیدهای آمینه پرولین و هیدرکسی پرولین کلاژن در ماهی سیاه کاملاً نزدیک به پایداری دمایی است، همچنین کلاژن ماهیان نیمه گرمسیری پایداری دمایی نسبتاً بالایی دارند (Huo *et al.*, 2009). تحقیق انجام شده توسط Ikoma و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که در پوست ماهی کپور چینی گلايسين به عنوان اسید آمینه اصلی و متیونین بسیار کم بود در حالی که تیروزین و هیستیدین مانند سایر کلاژن‌ها بودند (Ikoma *et al.*, 2005). با این وجود کلاژن محلول پوست ماهی به‌طور وسیعی مطالعه شده است و به‌طور غیر معمول ۳ زنجیر اصلی آن همگی متفاوت بود (Morrissey *et al.*, 2000).

به‌طور کلی کلاژن‌های ماهی مقدار اسید آمینه کمتری نسبت به کلاژن‌های پستانداران دارند. جالب توجه است که کلاژن محلول به‌دست آمده از پوست کوسه ماهی و ماهیان غضروفی بسیار مشابه با کلاژن مهره‌داران است (Nagai *et al.*, 2002). تاکنون مطالعات گسترده‌ای در زمینه استخراج کلاژن صورت گرفته که از جمله آن‌ها می‌توان اشاره کرده به خواص بیوشیمیایی کلاژن استخراج شده از پوست و استخوان ماهی قزل‌آلای رنگین کمان که توسط هدی شهیری طبرستانی (۱۳۸۷) به‌منظور استفاده بهینه از فرآورده‌های جانبی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) انجام گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد که بازده استخراج کلاژن از پوست استخوان به ترتیب ۹/۴۸۸ و ۱/۱۲۲ درصد براساس وزن مرطوب بود. همچنین استخراج کلاژن از پوست ماهی کاد تحت تاثیر واکنش و عملکرد شیمیایی اسید سیتریک ۰/۷ درصد و غلظت های کم سولفوریک اسید و هیدروکسید سدیم قرار گرفته بود

شبکه‌های فیبریلی و میکروفیبریلی ماتریس فوق سلولی و غشاهای زیرین شرکت دارد (Cheng *et al.*, 2009). عموماً منابعی که به‌صورت صنعتی برای استخراج کلاژن مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل ضایعات کشتارگاهی گاو و خوک است که امروزه به دلیل خطر ابتلا به انسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی (BES) و نیز کلاژن خوکی به دلیل عدم مصرف در کشورهای اسلامی دارای محدودیت‌هایی در مصرف هستند که این معایب باعث توجه بیشتر محققین و صنعت به سمت کلاژن حاصل از جانوران دریایی معطوف گشته است (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014).

کلاژن دارای مقدار زیادی اسید آمینه هیدروکسی پرولین و هیدروکسی لیزین و مقدار بسیار کم اسید آمینه سولفوردار است (Morrissey *et al.*, 2000). همچنین، ژلاتین مخلوطی از پپتیدها و پروتئین‌هاست که توسط هیدرولیز جزئی کلاژن تهیه می‌گردد. در واقع ژلاتین فرم شکسته شده‌ی کلاژن است که وزن مولکولی کمتری نسبت به کلاژن دارد. کلاژن با وجود خواصی چون آنتالپی بالا، ساختار شبکه‌ای بزرگتر از فیبریل، نقطه ایزوالکتریک پایه و مقاومت بالا در برابر هیدرولیز پروتئاز نسبت به ژلاتین ارجحیت دارد (Zhang *et al.*, 2006). به‌علاوه، مارپیچ‌های سه گانه و شبکه‌های فیبریلی موجود در غشاء کلاژن محکم تر از ژلاتین است و قدرت مکانیکی و قابلیت برگشت‌پذیری خوبی دارد در حالی که ژلاتین در توصیف خواص رئولوژیکی مانند استحکام ژل، ثبات حرارتی و خواص ویسکوالاستیک منحصر به فرد است (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). کلاژن نوع I در ماهی همانند پستانداران و پرندگان شامل سه زنجیره پلی‌پپتیدی است که هر کدام از ۱۰۰۰ آمینواسید تشکیل شده و وزنی حدود ۱۰۰kDa دارند. همچنین کلاژن ماهی مقادیر کمتری هیدروکسی پرولین دارد که باعث کاهش سازگاری اتصالات عرضی و کاهش پایداری آن‌ها نسبت به کلاژن به‌دست آمده از مهره‌داران می‌شود

۱/۱۰ (w/v) غوطه‌ور شد و به مدت ۴۸ ساعت هم زدن مداوم انجام شد. پس از این مرحله پوست از سود خارج و توسط آب مقطر سرد به خوبی شستشو داده شد تا زمانی که pH پوست خنثی شد. در ادامه جهت حذف چربی، پوست در بوتیل الکل ۱۰٪ با نسبت جامد / حلال ۱/۲۰ (w/v) به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. این مرحله مانند مرحله قبل در ۴ درجه سانتی‌گراد و با همزدن مداوم صورت گرفت و محلول هر ۶ ساعت تعویض شد. در پایان این مرحله پوست مجدداً چندین بار توسط آب مقطر شستشو داده شد تا pH آن به حالت خنثی رسید. در مرحله بعد پوست در اسید استیک ۰/۵ مولار با نسبت جامد / حلال ۱/۱۵ (w/v) به مدت ۷۲ ساعت غوطه‌ور گردید. این مرحله در ۴ درجه سانتی‌گراد و با همزدن مداوم انجام شد. سپس مخلوط پوست و اسید از دولایه صافی عبور داده و پوست باقی مانده بر روی صافی تحت شرایط مشابه استخراج گردید. در ادامه هر دو مخلوط عبوری از صافی با یکدیگر مخلوط شدند. به این مخلوط، ۲/۶ مولار NaCl اضافه شد که موجب رسوب کلاژن شد، پس از مشاهده رسوب و رسیدن pH به محدوده خنثی جهت جداسازی رسوب از سانتریفوژ ۱۸۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. رسوب حاصل از این مرحله با دستگاه (Alpha 1-2 LDplus) لیوفیلیزه شد و پس از خشک شدن، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**استخراج کلاژن به روش آنزیمی (پپسین):** مقدار مشابه روش قبل پوست ماهی برای استخراج آنزیمی (PSC) با استفاده از روش Matmaroh و همکاران (۲۰۱۱) با کمی تغییر استفاده شد. در این مرحله باقی مانده پوست در محلول اسید استیک ۰/۵ مولار با نسبت جامد/حلال ۱/۱۵ (w/v) و پپسین تهیه شده از سیگما به مقدار ۱٪ w/w غوطه‌ور شد. مخلوط به مدت ۴۸ ساعت در ۴۰°C و با همزدن مداوم نگهداری شد، مراحل صاف کردن، رسوب دادن و سانتریفوژ همانند روش استخراج اسیدی (ASC) انجام شد. رسوب حاصل توسط فریز درایر خشک شده

که بیشترین بازده را نیز داشت (Hafsteinnsson and Gudmundsson, 1997).

بیش از ۸۰ گونه از خانواده طوطی ماهیان (Scaridae) در جهان شناسایی شده‌اند که به علت وجود دندان‌های آروارهای که به یک منقار سفت شبیه منقار طوطی جوش خورده است به راحتی قابل شناسایی هستند، همچنین این ساختارها به طوطی ماهیان امکان می‌دهند که جلبک‌ها و بی‌مهرگان را از سطوح سخت صخره‌ها خراش داده و سپس مواد بلعیده شده را خرد کنند (Aronov and Goren, 2002). طوطی ماهی (*Scarus ghobban*) در نواحی جنوبی کشور به دلیل نداشتن تیغ ریز و طعم مطلوب برای سرخ کردن بسیار مناسب است و از ماهیان خوشمزه و پر طرفدار محسوب می‌شود که زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرد. در همین راستا در مطالعه حاضر کلاژن از پوست طوطی ماهی با روش‌های اسیدی و آنزیمی استخراج شده و ویژگی‌های ساختاری و عملکردی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

**آماده‌سازی نمونه:** طوطی ماهی‌های (*Scarus ghobban*) صید شده از آب‌های هندیجان (رودخانه ای واقع در جنوب شرقی خوزستان و شمال خلیج فارس) از بازار ماهی بعثت شهر تهران تهیه شد. با دقت پوست ماهی و فلس آن از گوشت جدا شد، به این صورت که پوست فاقد گوشت و یا فلس ماهی بود. در ادامه پوست توسط آب مقطر سه الی چهار مرتبه شسته شده و سپس آب اضافی آن کاملاً خارج شد. پس از این مرحله پوست را به قطعات  $0.5 \text{ cm}^2$  × ۰/۵ برش داده شد و بلافاصله در ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند.

**استخراج کلاژن به روش اسیدی:** استخراج کلاژن محلول اسیدی (ASC) با استفاده از روش Nagai و همکاران (۲۰۰۲) با کمی تغییرات انجام شد. در ابتدا برای حذف پروتئین‌های غیر کلاژنی، حدود ۴۰ گرم از پوست در سود ۰/۱ مولار با نسبت پوست/سود

بافر حل کننده ( Tris HCL 0.5 مولار با ۲ درصد SDS pH= 6/8 و ۲۵ درصد گلیسرول) و ۲ درصد ۲-مرکاپتواتانول حل شد. ۲۰ میکرولیتر از پروتئین حل شده بر روی ژل الکتروفورز بارگذاری و با شدت جریان الکتریکی ۱۵۰ ولت به مدت ۴ ساعت انجام گردید. رنگ آمیزی ژل‌ها براساس رنگ آمیزی نیترات نقره آورده شد.

### خواص امولسیون کنندگی (Emulsifying properties)

بررسی خواص امولسیون کنندگی نمونه‌های هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده با روش Pearce و Kinsella (۱۹۷۸) با کمی تغییرات انجام شد. این آزمایش در pHهای ۴، ۷ و ۱۰ صورت گرفت. به این صورت که ۶ سی‌سی از محلول ۰/۱ مولار نمونه کلاژن هیدرولیز شده و کلاژن هیدرولیز نشده را برداشته و به هر نمونه ۱ میلی‌لیتر از بافر ۴.۷، ۱۰ و ۲ میلی‌لیتر روغن سویا به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ هموژن شد. ۲۰ میکرولیتر از فاز آبی نمونه‌ها برداشت و ۲ میلی‌لیتر از محلول SDS ۰/۱ درصد به آن اضافه شد و بلافاصله جذب نمونه‌ها را در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که این زمان صفر در نظر گرفته شد و سپس ۱۰ دقیقه بعد مجدد جذب نمونه‌ها را اندازه‌گیری شد. نهایتاً خواص امولسیون کنندگی از فرمول زیر محاسبه شد.

$$EAI (m^2/g) = (2 \times 2.303 \times A_{500}) \times (0.25 \times \text{Protein Concentration})$$

$$ESI (min) = (A_0 \times \Delta t) / \Delta A$$

که EAI، ESI، A<sub>0</sub> و A<sub>10</sub> و Δt به ترتیب شاخص ثبات امولسیون کنندگی، شاخص فعالیت امولسیون کنندگی، جذب در زمان صفر، جذب بعد از ۱۰ دقیقه و ۱۰ دقیقه می‌باشند.

حلالیت (Solubility): این شاخص براساس روش Pearce و Kinsella (۱۹۷۸) با اندکی تغییرات انجام شد. به این صورت که ۰/۰۵ میکروگرم از نمونه لیوفیلیزه کلاژن هیدرولیز شده و کلاژن هیدرولیز نشده را در آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه هم زده، پس

و سپس دردمای ۲۰°C نگهداری شد.

استخراج کلاژن هیدرولیز شده از کلاژن بدست آمده با روش اسیدی پوست طوطی ماهی برا اساس روش Wang و همکاران (۲۰۱۳) صورت گرفت. محلول ASC (۳/۵ مولار) توسط اسید استیک ۰/۵ مولار (pH=۲/۵) آماده‌سازی شد. سپس پپسین با نسبت آنزیم به کلاژن ۱/۲۰ (وزنی/وزنی) اضافه و محلول به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. برای غیر فعال‌سازی آنزیم پپسین محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰°C حرارت داده و سپس به دمای محیط رسید. سپس مخلوط با دور ۵۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. فاز مایع توسط خشک‌کن انجمادی خشک شده و در دمای ۲۰°C نگهداری شد.

### طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه

(FTIR): یک میلی‌گرم نمونه خشک با mg KBR ۱۰۰ خشک به صورت دیسک برای ثبت طیف فشرده شد. محدوده تقریبی طیف FTIR برای نمونه‌ها ۴۰۰-۴۰۰۰ cm<sup>-1</sup> بود. قرص‌های حاصل در سل مخصوص دستگاه FTIR (Nicolet 8700) قرار داده شده و آنالیزهای مربوطه انجام شد (Kong et al., 2007).

### میکروسکوپ الکترون روبشی (SEM): نمونه‌های

کلاژن در اسید استیک (۰/۵ مولار، ۵٪ وزنی-حجمی) حل شده و توسط آب مقطر دیالیز شده و توسط خشک‌کن انجمادی خشک شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه با طلا پوشانده و توسط میکروسکوپ الکترونی (Phenom prox) مشاهده و سپس تصویربرداری شدند.

### الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE):

الگوی SDS page طبق روش Nagai و همکاران (۲۰۰۲) با دو لایه ژل بالایی و پایینی به ترتیب ۴ و ۸ درصد انجام شد. مقدار ۵ میلی‌گرم از پودر لیوفیلیزه شده کلاژن استخراج شده در ۱ میلی‌لیتر از

استخراجی از هر ۴۰ گرم پوست طوطی ماهی در روش آنزیمی ۵/۰۳۵ گرم و در روش اسیدی ۲/۲۱۰ گرم بود. نتایج مشابه در مطالعه *Matmaroh* و همکاران (۲۰۱۲) بدست آمد که این نتایج را می‌توان به حلالیت کم پیوندهای عرضی تشکیل شده از طریق واکنش آلدهید با لیزین و هیدروکسیلیزین در محل‌های مارپیچی تلوپیتید نسبت داد. همچنین این نتایج می‌تواند به دلیل هضم بیشتر مولکول‌های متصل در منطقه تلوپیتید توسط عملکرد بیشتر آنزیم پپسین نسبت داد (Nagai *et al.*, 2002).

**طیف‌سنجی مادون قرمز FTIR:** نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) کلاژن ASC نشان داد که کلاژن پوست طوطی ماهی بسیار مقاوم می‌باشد، به این صورت که اولین پیک با عدد موج  $cm^{-1}$  ۳۲۱۷ آزاد شده که مربوط به آمید A می‌باشد (شکل ۱ الف). آمید B نیز به صورت یک پیک ضعیف در طول موج  $cm^{-1}$  ۳۱۰۰ به سختی قابل تشخیص است که نشان‌دهنده کشش‌های نامتقارن در اطراف زنجیره  $CH_2$  می‌باشد. سایر گروه‌های آمیدی به‌صورت خیلی ضعیف ظاهر شده‌اند، همان‌طور که بیان شد دلیل بر مقاوم بودن پوست طوطی ماهی در استخراج اسیدی می‌باشد. پیک ظاهر شده در  $cm^{-1}$  ۵۹۷ مربوط به کشش اسکلتی زنجیره اصلی آمینو اسید می‌باشد. طیف FTIR مربوط به کلاژن استخراج شده با پپسین در شکل ۱ (ب) نیز قابل مشاهده است که اولین پیک با فرکانس  $cm^{-1}$  ۳۲۲۱ مربوط به آمید A بود. آمید B پیک جداگانه نداشته و به شکل ضعیف در فرکانسی مشابه با ASC دیده شد. دومین نقطه اوج در فرکانس  $cm^{-1}$  ۱۶۵۳ مربوط به آمید I می‌باشد و این باند جذبی مربوط به ارتعاشات کششی گروه کربونیل C=O به همراه ارتعاشات خمشی N-H و کششی CN و تغییر شکل CNN می‌باشد و در نهایت سومین نقطه اوج در فرکانس  $cm^{-1}$  ۵۹۸ ظاهر شد که مربوط به کشش اسکلتی گروه‌های غیر عاملی می‌باشد. در کلاژن استخراج شده با آنزیم از پوست طوطی ماهی، گروه آمید III در طیف FTIR به

از تهیه رقت نمونه‌ها، آن‌ها را در فالكون‌های مورد نظر برای بررسی در pH های ۴ و ۷ و ۱۰ ریخته و به هریک بافر آن نیز اضافه گردید. مجدد توسط هموژنایزر همزدن انجام شد، سپس به محلول ۱۰ دقیقه استراحت داده شد و در نهایت نمونه‌های محلول را از کاغذ صافی که قبلاً توزین شده فرصت داده شد که نمونه‌ها بر روی کاغذ صافی خشک شوند. در ادامه وزن کاغذ صافی به‌مراه نمونه‌ها را تعیین شد و با بررسی اختلاف این اوزان حلالیت کلاژن‌ها را مورد بحث قرار گرفت.

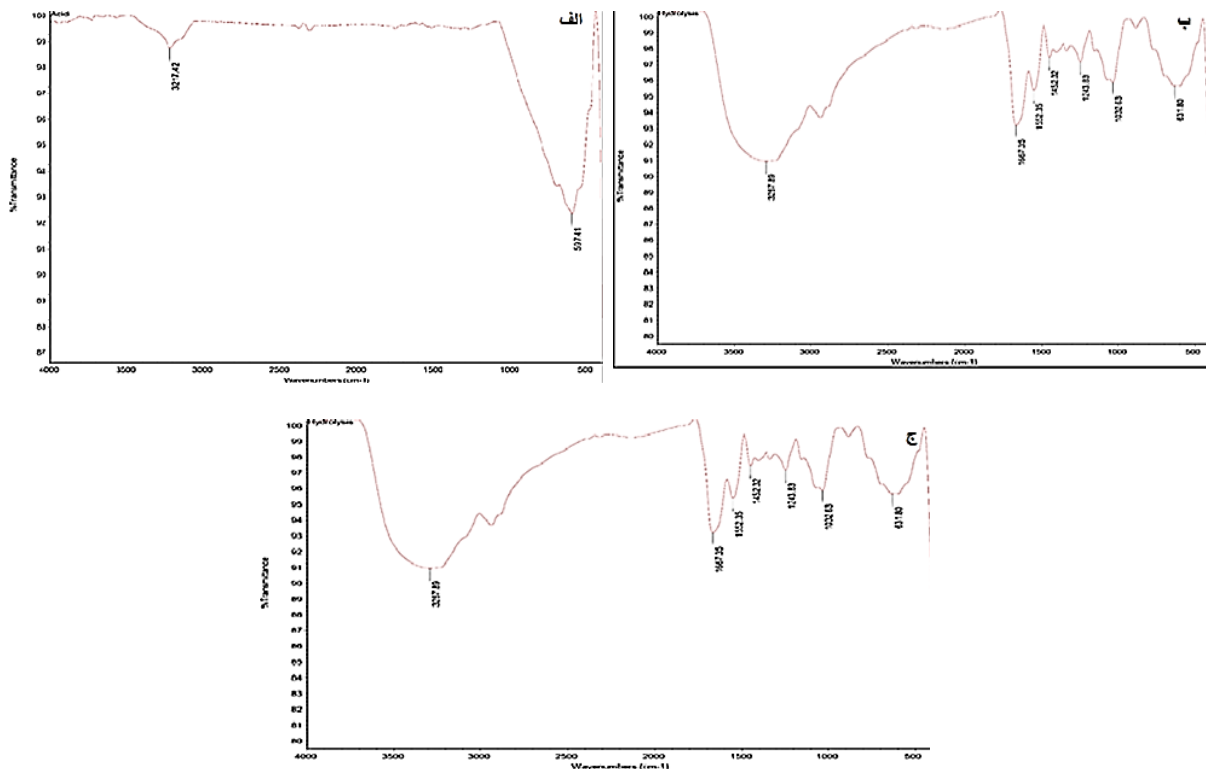
**فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH):** قابلیت مهار رادیکال‌ها با بی‌رنگ شدن رنگ بنفش محلول متانول توسط DPPH اندازه‌گیری شد. دستگاه اسپکتروفتومتر برای ارزیابی پایداری رادیکال DPPH استفاده گردید (Burits and Bucar, 2000). به طور خلاصه ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف (۰/۱-۰/۰۱-۰/۰۰۱) مولار از کلاژن‌های هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده را به ۴ میلی‌لیتر محلول اتانولی DPPH (۰/۰۰۴ درصد) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و محل تاریک نگهداری شدند. بعد از این مدت، میزان جذب در طول موج ۵۱۷nm خوانده شد. مهار رادیکال‌های آزاد توسط DPPH توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$RSA = [1 - ((A \text{ sample} - A \text{ blank}) / A \text{ control})] \times 100$$

که A sample و A control، A sample به ترتیب جذب نمونه بعد از زمان موردنظر (نمونه و محلول حاوی رادیکال‌های آزاد)، جذب محلول حاوی رادیکال‌های آزاد بدون نمونه و جذب نمونه بعد از زمان موردنظر (نمونه بدون محلول حاوی رادیکال‌های آزاد هستند).

### نتایج و بحث

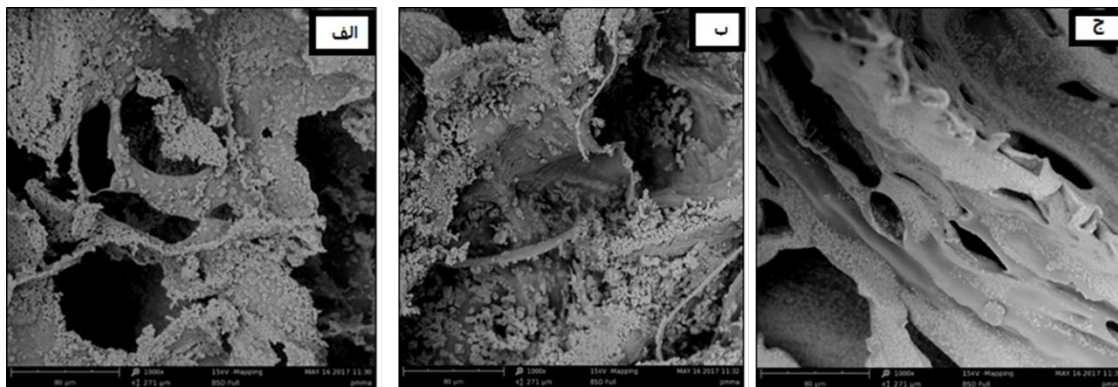
در این مطالعه انجام شده بر روی پوست طوطی ماهی، میزان کلاژن براساس استخراج آنزیمی تقریباً ۳ برابر روش اسیدی بود. به این صورت که کلاژن



شکل ۱- نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) الف) کلاژن اسیدی و ب) کلاژن... حاصل... آنزیمی و ج) کلاژن اسیدی هیدرولیز شده

ناحیه  $1243 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات کششی C-N و N-H از گروه  $\text{CH}_2$  گلیسین و زنجیره‌های جانبی پرولین است که در ساختار مارپیچ سه گانه کلاژن درگیر هستند (Wang *et al.*, 2008). ارتعاش جذبی C-O در طول موج  $1032 \text{ cm}^{-1}$  و طول موج  $631 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه خمشی O=C-N می‌باشد. امید I ساختارهای مربوط به پیوندها و جنبش‌های مولکولی و ارتعاشات کششی پیوند C=O به N-H و ارتعاشات خمشی داخل صفحه ای و کششی C-N می‌باشد. امید II مربوط به ارتعاشات خمشی N-H و اتصالات آمیدی حول محور و زنجیره اصلی آمینو اسیدها می‌باشند و هر چه تعداد و توالی ساختارهای  $\beta$ -sheet بیشتر باشد طیف به سمت محدوده  $\text{cm}^{-1}$  ۱۲۳۵ نزدیک می‌شود و هرچه توالی و تعداد ساختارهای فضایی مارپیچ آلفا بیشتر باشد، طیف به محدوده  $1300 \text{ cm}^{-1}$  نزدیک می‌شود (Chi *et al.*, 2014). پیوندهای آمیدی A نشان‌دهنده ارتعاشات کششی پیوند های آزاد N-H آمینو اسیدها در

صورت ادغام شده با طیف گروه‌های اسکلتی ظاهر شده، بنابراین به نظر می‌رسد گروه امید III از پیوندهای اسکلتی آزاد نشده است. طیف FTIR مربوط به کلاژن هیدرولیز شده حاصل از روش اسیدی  $\text{ASCH}$  از پوست طوطی ماهی در شکل ۱ (ج) نشان داده شده است که پیک نخستین امید A با عدد موج  $3287 \text{ cm}^{-1}$  می‌باشد (Okazaki and Osako, 2014). دومین پیک باند جذبی، امید B با عدد موج  $2900 \text{ cm}^{-1}$  ناشی از فرکانس ارتعاشی کششی نامتقارن  $\text{CH}_2$  می‌باشد که به صورت ضعیف مشاهده می‌شود. پیک جذبی مربوط به گروه امید I در ناحیه  $1667 \text{ cm}^{-1}$  که در نتیجه (PSC) ظاهر شده است. پیک جذبی مربوط به گروه امید II در موقعیت  $1552 \text{ cm}^{-1}$  که مربوط به ارتعاشات خمشی N-H و کششی C-N و بخشی دیگر با عدد موج  $1452 \text{ cm}^{-1}$  آزاد شده است که جدا شدن این پیک به دلیل پیوندهای قوی هیدروژنی است (Joseph *et al.*, 2008). پیک جذبی مربوط به گروه امید III در سه فرکانس  $1243$ ،  $1032$ ،  $631 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده شد.

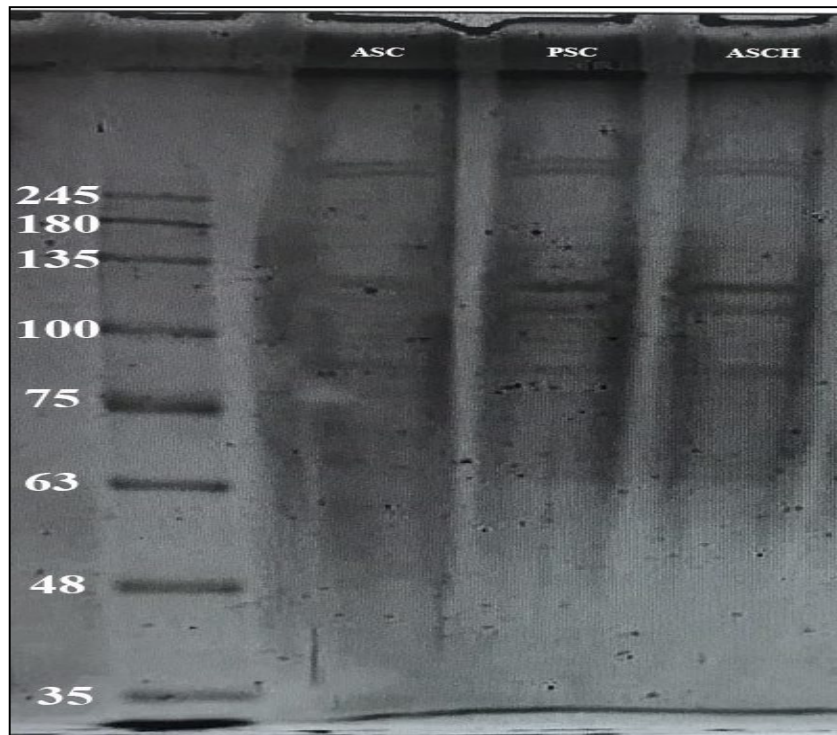


شکل ۲- نتایج میکروسکوپ الکترونی (SEM) کلاژن اسیدی، (ب) کلاژن حاصل آنزیمی و (ج) کلاژن اسیدی هیدرولیز شده.

به روش آنزیمی (PSC) درمقایسه با کلاژن استخراج شده به روش اسیدی (ASC) ساختار منظم‌تری دارد و اندازه منافذ نیز با افزایش مقدار آب طی فرایند آماده سازی افزایش پیدا کرده است (George *et al.*, 2008). ASC و PSC هر دو شامل تعداد زیادی لایه‌اند که به صورت لایه لایه یا متورق با پراکنش تصادفی هستند، اما در کلاژن ASC لایه‌ها ضخیم، سنگین و حفره‌ها بسته و خوابیده به نظر می‌رسند. در مورد نمونه هیدرولیز شده، هیدرولیز منجر به تکمیل روند استخراج و تولید کلاژن با ساختار مناسب شبکه‌ای و رشته‌ای گردیده است. کلاژن بدست آمده به روش ASC از پوست ماهی خالی اسپانیایی مانند پوست طوطی ماهی به صورت ورقه‌ای و یک دست بود که بعد از هیدرولیز توسط پیپسین شکسته شد. در همین راستا PSC حاصل از پوست و استخوان ماهی خالی اسپانیایی به دلیل تبخیر مایع سست و نرم شده و مانند PSC پوست طوطی ماهی به صورت حفره‌ای شکل درآمده بود. در غلظت یکسان، یکنواختی و نظم ساختار شبکه‌ای کلاژن استخراج شده به روش اسیدی (ASC) کمتر از کلاژن استخراج شده به روش آنزیمی (PSC) بود (Chi *et al.*, 2014). به علاوه، در مطالعه Jeevithan و همکاران (۲۰۱۴) بر روی جداسازی و تعیین کلاژن محلول پیپسینی از استخوان سر و

ساختار پلی پپتیدی کلاژن می‌باشد. همچنین تعداد زیادی از گروه‌های N-H در کلاژن‌ها حاصل از پوست طوطی ماهی درگیر پیوندهای هیدروژنی هستند، زیرا براساس Doyle و همکاران (۱۹۷۵) ارتعاش کششی پیوندهای آزاد N-H معمولاً در محدوده  $3440-3400\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده بود و هرچه گروه‌های NH بیشتری در پپتید درگیر باندهای هیدروژنی شوند به فرکانس پایین‌تری منتقل می‌شوند. باند آمید I که در کلاژن‌های PSC و ASC مشاهده می‌شود و نیز در کلاژن ASC آزاد شده است ولی پیک قوی را نشان نمی‌دهد.

**نتایج میکروسکوپ الکترونی (SEM):** در کلاژن محلول اسیدی (ASC) (شکل ۲ الف) حضور فیبر کلاژن را در پوست طوطی ماهی تأیید می‌کند که دارای یک ساختار مشبک و ورقه‌ای و با حفظ تمامیت ساختاری است (شکل ۲). در شکل (ب) که متعلق به کلاژن استخراج شده آنزیمی (PSC) نیز فیبر کلاژن مشخص بوده و کلاژن نیز ساختار ورقه‌ای و پیچ خورده خود را حفظ کرده است. ولی همان‌طور که در شکل (ج) قابل مشاهده است، کلاژن پس از هیدرولیز آنزیمی ساختاری متفاوت از دو کلاژن دیگر را دارا می‌باشد. این کلاژن دارای ورقه‌های برش خورده یکنواخت طولی و مشبک است که در یک امتداد مشخص دیواره‌های شبکه کلاژن اولیه به لایه‌های نازک تر متورق شده‌اند. کلاژن استخراج شده



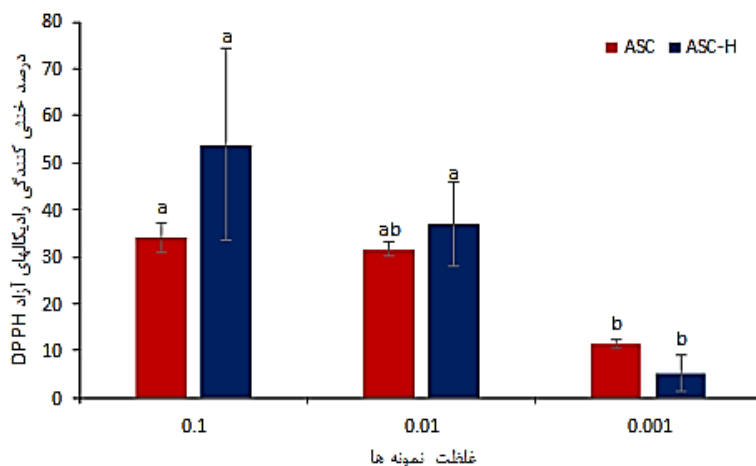
شکل ۳- الگوی الکتروفورز (SDS-PAGE) کلاژن اسیدی، کلاژن حاصل آنزیمی و کلاژن اسیدی هیدرولیز شده.

PAGE) از پوست طوطی ماهی مربوط به کلاژن استخراج شده به روش اسیدی (ASC) و آنزیمی (PSC) و نمونه هیدرولیز شده آنها (ASC<sub>H</sub>) در شکل ۳ نشان داده شده است. کلاژن های استخراج شده کلاژن نوع I بوده و شامل دو زنجیره  $\alpha 1$  و یک زنجیره  $\alpha 2$  که دانسیته  $\alpha 1$  بیشتر از  $\alpha 2$  بود. وزن مولکولی برآورد شده برای زنجیره های  $\alpha$ ، ASC و PSC به ترتیب ۱۳۰ و ۱۱۵ کیلو دالتون تخمین زده شد. الگوی SDS-PAGE پوست طوطی ماهی در شکل ۳ نشان داده شد، که در این الگو ASC و PSC هر دو دارای حداقل دو زنجیره مختلف  $\alpha$ ، ( $\alpha 1$  و  $\alpha 2$ ) می باشند که گروه زنجیره  $\alpha 1$  حدود دو برابر بزرگتر از زنجیره  $\alpha 2$  بود (Chi et al., 2014). علاوه براین، از دیگر زیر واحد پیوندهای عرضی با وزن مولکولی بالا که در هر دو کلاژن ASC و PSC دیده شد زنجیره  $\beta$  (دیمر زنجیره  $\alpha 1$ ) و زنجیره  $\gamma$  (تریمر زنجیره  $\alpha 1$ ) است. شایان ذکر است

اسکلت کوسه، ساختار میکروسکوپی SEM نشان داد کلاژن استخوان سر از نوع کلاژن نوع II بوده است که یک ساختار همگن و چند لایه متراکم بود که این نوع از کلاژن تا حدود زیادی به کلاژن محلول آنزیمی استخراج شده از پوست طوطی ماهی شباهت داشت. هم چنین ساختار کوچک کلاژن اسکلت کوسه ماهی دارای ساختار ورقه‌ای و نیز ساختار شبکه‌ای با اندازه منافذ متفاوتی بود، این نوع نیز با کلاژن محلول اسیدی (ASC) پوست طوطی ماهی همسو می‌باشد. ساختار ریختی ASC و PSC جدا شده از پوست ماهیان خاویاری آموور و ماهی قزل آلا نیز دارای ساختار شبکه ای متصل بهم با اندازه منافذ ۹۰ تا ۲۵۰ میکرومتر بودند که این ساختار نیز با کلاژن ASC و PSC استخراج شده از پوست طوطی ماهی همخوانی دارد (Bae et al., 2008; Wang et al., 2014).

نتایج SDS-page: الگوی الکتروفورز (SDS-)

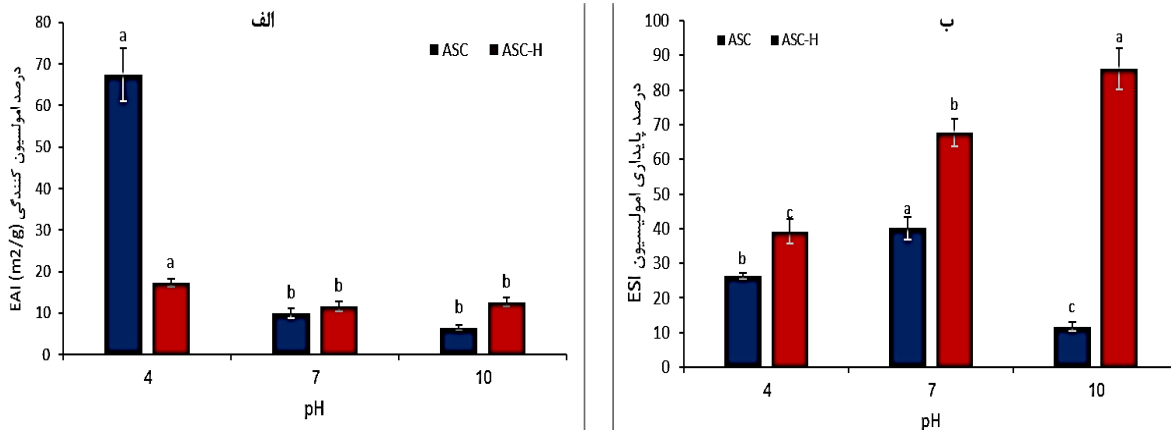




شکل ۴- نتایج حاصل از خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH.

(Sato *et al.*, 2000). Wang و همکاران (۲۰۱۴) تحقیقی بر روی ASC و PSC استخراج شده از پوست و استخوان ماهی خالی اسپانیایی (*Scomberomorous nipponius*) انجام دادند و دریافتند که ASC پوست و استخوان شامل دو زنجیره  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ) است که ضخامت باند زنجیره-های  $\alpha 1$  تقریباً دو برابر زنجیره‌های  $\alpha 2$  است. اجزایی با وزن ملکولی بالا به خصوص  $\beta$ ، مقدار کمی از  $\gamma$  و نیز ملکول‌هایی با اتصالات عرضی در ASC-S (Hydrolysates of acid soluble collagen ) و ASC-B (skin Hydrolysates of acid soluble collagen bone) مشاهده شد. Jeong و همکاران (۲۰۱۳) نیز الگوی الکتروفورز کلاژن ASC و PSC استخوان ماهی (*Thunnus obesus*) را مورد بررسی قرار داده و دریافتند که حداقل دو زنجیره متفاوت  $\alpha$  ( $\alpha 1$  و  $\alpha 2$ )، اتصالات عرضی و قطعات  $\gamma$  در دو نوع کلاژن یافت میشود که اتصالات عرضی درون و بین ملکولی و قطعات  $\gamma$  و  $\alpha$  در کلاژن ASC غنی‌تر از PSC بود. زنجیره  $\alpha 3$  نیز به دلیل قرار گرفتن در موقعیت یکسان با  $\alpha 1$  قابل تشخیص نبود. آن‌ها همچنین دریافتند که کلاژن غالب در استخوان نوع I می‌باشد (Matsui *et al.*, 1991; Kimura,

برخی از پیوندهای عرضی  $\beta$  و  $\gamma$  در کلاژن پوست طوطی ماهی توسط آنزیم پپسین به زنجیره  $\alpha$  تبدیل شده‌اند (Jongjareonrak *et al.*, 2006; Kaewdang *et al.*, 2014). وزن مولکولی برآورد شده برای زنجیره  $\alpha 1$  کلاژن با استفاده از پروتئین‌های کروی استاندارد حدود ۱۳۰ کیلودالتون و برای  $\alpha 2$  ۱۱۵ کیلودالتون تخمین زده شد. براساس ترکیب زیر واحدها و الگوهای SDS-PAGE می‌توان تعیین کرد که کلاژن از نوع I است. این موضوع ثابت شده است که جزء اصلی کلاژن نوع I از دو زنجیره  $\alpha 1$  و یک زنجیره  $\alpha 2$  تشکیل شده است، با این حال یک هتروتریم دیگری به نام  $\alpha 3$  به عنوان جزئی از کلاژن نوع I ماهیان یافت شده است (Kimura, 1992). زنجیره  $\alpha 3$  با وزن مولکولی مشابه  $\alpha 1$  نمی‌تواند از زنجیره  $\alpha 1$  جدا شود و در همان موقعیت  $\alpha 1$  می‌ماند (Matsui *et al.*, 1991; Kimura, 1992). نمونه هیدرولیزی پس از فرآیند هیدرولیز توسط پپسین باندهای زنجیره  $\beta$  و ترکیباتی با وزن مولکولی بالا از بین رفتند، زیرا آنزیم پپسین پیوندهای تلوپیتید را حذف و همزمان زنجیره  $\beta$  را به دو زنجیره  $\alpha$  تبدیل می‌کند، در نتیجه در کلاژن هیدرولیز شده ترکیباتی با وزن مولکولی بالا مشاهده نمی‌شود



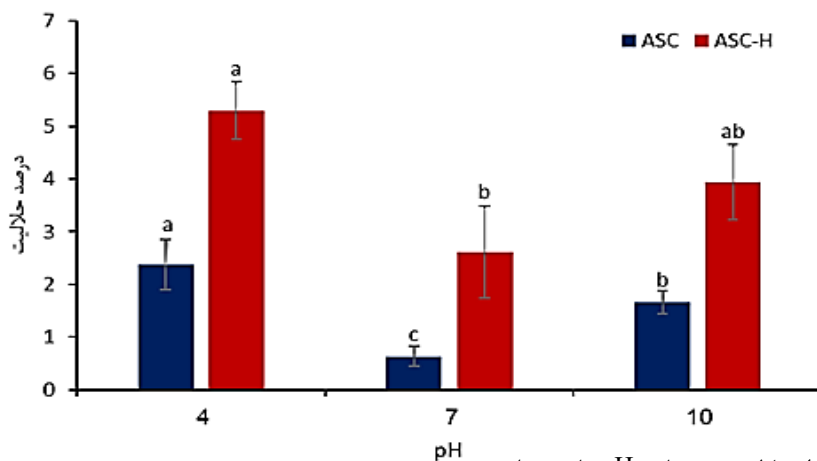
شکل ۵- نتایج حاصل از قدرت امولسیون کنندگی (شکل الف) و پایداری امولسیون (شکل ب).

عدد ۳۴/۳۵٪ و در نمونه (ASC<sub>H</sub>) کلژن نیز با غلظت ۰/۱ مجدداً بالاترین درصد خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH (۵۳/۸۶ درصد) را نشان داد ( $P < 0.05$ ). امروزه این یک امر مشخص شده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه ای دارند (Klompong *et al.*, 2007; Taheri *et al.*, 2014; Elavarasan *et al.*, 2014). در برخی گزارشها قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده قابل مقایسه با بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) و بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) بود (Elavarasan *et al.*, 2014). همچنین تحقیقات بیشتر مشخص نمود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده به نوع پروتئاز و شرایط هیدرولیز بستگی دارد (Jao and Ko, 2002; Jun *et al.*, 2004; Elavarasan *et al.*, 2014). در طول هیدرولیز بسته به نوع آنزیم استفاده شده دامنه وسیعی از پپتیدهای کوچک و آمینواسیدهای آزاد تولید می‌شوند که تغییر اندازه و سطح آمینواسیدهای آزاد و پپتیدهای کوچک روی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده اثر می‌گذارد (Wu *et al.*, 2003). مطالعه‌ای که درباره بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی از کلژن پوست ماهی خالی اسپانیایی تحت تأثیر میانگین وزن مولکولی انجام شد، جزء آخر هیدرولیز با کمترین وزن مولکولی بالاترین مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در غلظت

(1992)

### نتایج خواص ضد اکسیدانی علیه رادیکال‌های

آزاد DPPH: DPPH از معدود رادیکال‌هایی است که در دمای اتاق پایدار است (Zhong *et al.*, 2011). DPPH ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختارش به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می‌باشند. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی‌اکسیدان، از رنگ بنفش به زرد تغییر رنگ می‌دهد. رادیکال‌های آزاد موجود در DPPH در ۵۱۷ نانومتر جذب دارند که از قانون بیر لامبرت پیروی می‌کنند و کاهش جذب آن با میزان ماده آنتی‌اکسیدان رابطه خطی دارد. هر چه بر مقدار ماده آنتی‌اکسیدان افزوده شود، DPPH بیشتری مصرف شده و رنگ بنفش بیشتر به سمت زرد متمایل می‌شود (Zhong *et al.*, 2011). آزمایش خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH، ساده تر، کارآمدتر و سریع‌تر از روش‌های دیگر است به همین علت رایج‌ترین روش مورد استفاده در ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی است (Krishnan and Peruma, 2013). نتایج این تحقیق در سه غلظت (۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱) بر روی کلژن محلول اسیدی (ASC) و کلژن هیدرولیز شده (ASC<sub>H</sub>) به دست آمده از پوست طوطی ماهی انجام شد، که نتایج نشان داد در بین غلظت‌های نمونه ASC، غلظت ۰/۱ بیشترین درصد خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH با



شکل ۶- نتایج حاصل از حلالیت نمونه‌ها در pH های مختلف.

۳۲/۸۷ را گزارش دادند. به علاوه نیز همین روند برای ESI نیز گزارش شد. نهایتاً نتایج آن‌ها بدین صورت جمع‌بندی شد که همبستگی مثبتی بین میانگین وزن مولکولی با ESI و EAI وجود دارد (Jridi *et al.*, 2014). پلی پپتیدهای بزرگتر و کلاژن‌ها می‌توانند تأثیر بیشتری بر پایداری پروتئین داشته باشند و پپتیدهای کوچکتر که پروتئین‌های هیدرولیز شده هستند و از مواد فعال سطحی می‌باشند می‌توانند سبب ترویج امولسیون روغن در آب باشند زیرا آنها دارای یک سر آب دوست و یک سر آب گریز می‌باشند (Tang *et al.*, 2009; Jridi *et al.*, 2014). در پژوهشی مشابه فعالیت امولسیون از پروتئین هیدرولیز شده با افزایش غلظت کاهش یافت و کاهش در زمان پایداری امولسیون پروتئین هیدرولیز شده در غلظت بالای ۰/۵ درصد نیز مشاهده شد. بنابراین تحقیق حاضر که بر روی پوست طوطی ماهی در غلظت ۰/۱ درصد انجام شد نیز با مطالعات انجام شده همسو بوده و بالاترین فعالیت امولسیون را در کلاژن محلول اسیدی (ASC) که وزن مولکولی بالاتری از کلاژن هیدرولیز شده دارد، گزارش شد (Tang *et al.*, 2009). تنها وجه تمایز کلاژن پوست طوطی ماهی با سایر مطالعات انجام شده در پایداری امولسیون می‌باشد که نمونه هیدرولیز شده پایداری بیشتری را نشان داد که با نمونه کلاژن اسیدی در فعالیت امولسیون متفاوت بود. بدین معنی که در مطالعات پیشین نمونه کلاژنی

۵mg/ml (۶۵/۷۲ درصد) و اولین فرکشن با بالاترین وزن مولکولی، پایین‌ترین توانایی مهار (DPPH) (۳۵/۸۲ درصد) را نشان داد (Chi *et al.*, 2014). در پژوهشی مشابه کلاژن هیدرولیز شده ماهیچه ماهی (*Mustelus mustelus*) را مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که بین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH و غلظت پروتئین هیدرولیزی رابطه مستقیم وجود دارد؛ نتایج فوق در پوست طوطی ماهی نیز مشاهده شد (Pires *et al.*, 2013).

**خواص امولسیون کنندگی:** نتایج خواص امولسیون کنندگی (EAI) و پایداری امولسیون (ESI) نمونه‌ها در pH های ۴، ۷ و ۱۰ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). همان طوری که از نتایج پیداست هر دو نمونه کلاژن به‌دست آمده در شرایط اسیدی قدرت امولسیون کنندگی بالاتری را نشان دادند ( $P < 0.05$ ). نتایج پایداری امولسیون نشان داد که نمونه‌های کلاژن هیدرولیز شده در تمامی pH ها عملکرد بالاتری را نسبت به نمونه‌های هیدرولیز نشده داشتند. در مطالعه‌ای که بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی از کلاژن هیدرولیز شده ماهی اسپانیایی خال‌خالی انجام شد، نتایج نشان داد با افزایش میانگین وزن مولکولی خواص امولسیون کنندگی EAI در غلظت ۰/۱ درصد افزایش یافت. بدین‌صورت که برای اولین جزء هیدرولیزی که بالاترین وزن مولکولی را دارد، عدد ۹۷/۴۴ و برای جزء هیدرولیزی آخر با کمترین وزن مولکولی عدد

غلظت NaCl بر کلژن محلول اسیدی و آنزیمی استخراج شده بررسی شد و به این مهم دست یافتند که هر دو کلژن محلول اسیدی و آنزیمی بالاترین حلالیت را در رنج pH اسیدی محدوده بین ۱ تا ۵ را نشان دادند و کاهش چشمگیر حلالیت در pH خنثی مشاهده شد. به علاوه آن‌ها بیان کردند که از بین دو کلژن به دست آمده، کلژن محلول آنزیمی حلالیت بالاتری از کلژن محلول اسیدی در تمام pH‌های تست شده به جز ۳-۱ pH را نشان داد (Singh *et al.*, 2011). هم چنین در تحقیقات دیگری که بر روی حلالیت کلژن از پوست سفره ماهی چشم‌بزرگ (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005)، سفره ماهی قرمز و سفره ماهی قهوه‌ای (Jongjareonrak *et al.*, 2005) انجام شده است با افزایش pH حلالیت کاهش یافته است. نتایج مطالعات بیان شده کاملاً همسو با تحقیقات انجام شده می باشد بدین صورت که هر دو کلژن محلول اسیدی (ASC) و کلژن حلالیت و در بین هر دو کلژن، کلژن هیدرولیز شده حلالیت بالاتری داشت. که براساس موارد فوق افزایش pH می تواند در کاهش حلالیت پروتئین با افزایش پیوندهای آب‌گریز-آب‌گریز و تجمع بین زنجیره‌ها همراه باشد.

#### نتیجه گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مقدار بازده کلژن استخراج شده از روش آنزیمی تقریباً سه برابر روش اسیدی بود. نتایج تست FTIR نمونه‌ها نیز نشان داد که آمیدهای A و B در نواحی مشابهی ظاهر شده بود. همچنین تصاویر SEM کلژن استخراج شده به روش آنزیمی (PSC) در مقایسه با کلژن استخراج شده به روش اسیدی (ASC) ساختار منظم‌تری نشان داد. خواص ضداکسیداسیونی نمونه‌ها علیه رادیکال‌های آزاد DPPH نشان داد که این ویژگی وابسته به غلظت نمونه‌ها بود. نتایج خواص امولسیون کنندگی (EAI) مشخص کرد که در هر دو نمونه

که وزن مولکولی بالاتری را داشته فعالیت و پایداری امولسیون بیشتری را نشان داده است ولی در پوست طوطی ماهی پایداری کلژن هیدرولیزی با وزن مولکولی کمتر، بالاتر از کلژن محلول اسیدی بود که این می‌تواند به دلیل ارتباطات بهتر و قوی‌تر در بین کلژن‌های هیدرولیز شده و محلول مورد مطالعه بوده باشد.

**حلالیت نمونه‌ها:** تأثیر pH بر حلالیت کلژن محلول اسیدی و کلژن هیدرولیز شده از پوست طوطی ماهی به این صورت گزارش شد که هر دو نمونه کلژن هیدرولیز شده و کلژن اسیدی بالاترین حلالیت را در محدوده اسیدی به ترتیب ۵/۳ و ۲/۳۸ درصد نشان دادند و کاهش شدید حلالیت در pH خنثی در هر دو نمونه مشاهده شد. با این حال افزایش اندک حلالیت در محدوده pH قلیایی مشاهده گردید. در بین دو کلژن بیان شده همان طور که در شکل ۶ قابل مشاهده است، کلژن هیدرولیز شده (ASC<sub>H</sub>) نسبت به کلژن محلول اسیدی (ASC) در تمام محدوده‌ها حلالیت بیشتری را از خود نشان داد. علت این حالت به این صورت مشخص شده است که کاهش یا افزایش pH بار منفی یا مثبت پروتئین را افزایش می‌دهد و در نتیجه حلالیت توسط نیروی دافعه بین زنجیره‌ها تغییر می‌کند (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005). یکی از خواص پروتئین‌ها حلالیت آن‌ها می‌باشد که بر جذب آب پروتئین اثر منفی می‌گذارد. خاصیت امولسیون کنندگی و ایجاد کف منوط به حلالیت اولیه پروتئین‌ها است. در همین راستا به‌طور کلی پروتئین‌ها در حلال‌های قطبی قوی محلول هستند و با کاهش میزان قطبی بودن حلال از مقدار حلالیت آن‌ها کاسته می‌شود. میزان حل شدن پروتئین در آب بستگی به pH و غلظت نمک موجود در محیط دارد (Elavarasan *et al.*, 2014). نمک یون‌های دو ظرفیتی مثل MgCl<sub>2</sub> از نمک یون‌های یک ظرفیتی مثل NaCl موثرترند در مطالعه‌ای که با عنوان جداسازی و تعیین کلژن محلول اسیدی و آنزیمی از پوست گربه ماهی انجام شد، تأثیر pH و

- weight. *Molecules* 19(8), 11211-11230.
- Doyle, B.B., Bendit, E.G., Blout, E.R. 1975. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* 14(5), 937-957.
- Elavarasan, K., Naveen Kumar, V., Shamasundar, B.A. 2014. Antioxidant and Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Fresh Water Carp (*Catla catla*) as Influenced by the Nature of Enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation* 38(3), 1207-1214.
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.A., Montero, M.P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* 25(8), 1813-1827.
- George, J., Onodera, J., Miyata, T. 2008. Biodegradable honeycomb collagen scaffold for dermal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 87(4), 1103-1111.
- Gudmundsson, M., Hafsteinnsson, H. 1997. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal of Food Science* 62(1), 37-39.
- Goren, M., Aronov, A. 2002. First record of the Indo-Pacific parrot fish *Scarus ghobban* in the Eastern Mediterranean. *Cybiurn* 26(3), 239-240.
- Huo, J. X., Zheng, Z.H.A.O. 2009. Study on enzymatic hydrolysis of *Gadus morrhua* skin collagen and molecular weight distribution of hydrolysates. *Agricultural Sciences in China* 8(6), 723-729.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., Mann, S. 2003. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *International journal of Biological Macromolecules* 32(3-5), 199-204.
- Jao, C.L., Ko, W.C. 2002. 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Science* 68(2), 430-435.
- Jeevithan, E., Bao, B., Bu, Y., Zhou, Y., Zhao, Q., Wu, W. 2014. Type II collagen and کلاژن به‌دست آمده در شرایط اسیدی قدرت امولسیون‌کنندگی بالاتری را داشتند. نتایج پایداری امولسیون نشان داد که نمونه‌های کلاژن هیدرولیز شده در تمامی pH ها عملکرد بالاتری را نسبت به نمونه‌های هیدرولیز نشده نشان دادند. حلالیت نمونه‌ها در pH های مختلف متفاوت بود و بالاترین حلالیت نمونه‌ها در pH اسیدی بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد که روش آنزیمی کارایی بهتری در استخراج کلاژن از پوست طوطی ماهی دارد، همچنین کلاژن به‌دست آمده می‌تواند به عنوان منبع بالقوه به منظور کاربردهای غذایی و آرایشی مورد توجه قرار گیرند.
- ### سپاسگزاری
- نویسندگان از تمامی کمک‌های مالی و معنوی دانشگاه آزاد واحد تهران-شمال کمال تشکر و قدردانی را دارند.
- ### منابع
- شهیری طبرستانی ه. ۱۳۸۷. خواص بیوشیمیایی کلاژن استخراج شده از پوست و استخوان ماهی قزل آلی رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*): هجدهمین کنگره علوم و صنایع غذایی ایران؛ ۲۴-۲۵ مهرماه؛ مشهد.
- Bae I., Osatomi K., Yoshida A., Osako K., Yamaguchi A., Hara K. 2008. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chemistry* 108(1), 49-54.
- Burits M., Bucar F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 14(5), 323-328.
- Cheng F.Y., Hsu F.W., Chang H.S., Lin L.C., Sakata R. 2009. Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. *Food Chemistry* 113(2), 563-567.
- Chi C.F., Cao Z.H., Wang B., Hu F.Y., Li Z.R., Zhang B. 2014. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular

- secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 39(8), 549-559.
- Krishnan, S., Perumal, P. 2013. Preparation and biomedical characterization of jellyfish (*Chrysaora Quinquecirrha*) collagen from southeast coast of India. *Structure* 8, 11.
- Liu, H., Li, D., Guo, S. 2007. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Chemistry* 101(2), 621-625.
- 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(3), 1179-1186.
- Matsui, R., Ishida, M., & Kimura, S. 1991. Characterization of an  $\alpha 3$  chain from the skin type I collagen of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 99(1), 171-174.
- Morrissey, M.T., Park, J.W., Huang, L. 2000. Surimi processing waste. *Surimi and Surimi Seafood*, 127-166.
- Nagai, T., Araki, Y., Suzuki, N. 2002. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food Chemistry* 78(2), 173-177.
- Okazaki, E., & Osako, K. 2014. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chemistry* 149, 264-270.
- Pearce, K.N., & Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(3), 716-723.
- Pires, C., Clemente, T., Batista, I. 2013. Functional and antioxidative properties of protein hydrolysates from *Cape hake* by-products prepared by three different methodologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(4), 771-780.
- Sato, K., Ebihara, T., Adachi, E., Kawashima, S., Hattori, S., Irie, S. 2000. Possible involvement of aminotelopeptide in self-assembly and thermal stability of collagen I as revealed by its removal with proteases. *Journal of Biological Chemistry* 275(33), 25870-25875.
- Shahidi, F., Zhong, Y. 2007. Antioxidants from marine by-products. In *Maximising gelatin from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) cartilage: Isolation, purification, physicochemical and antioxidant properties. *Marine Drugs* 12(7), 3852-3873.*
- Jeong, H. S., Venkatesan, J., Kim, S.K. 2013. Isolation and characterization of collagen from marine fish (*Thunnus obesus*). *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 18(6), 1185-1191.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M. 2006. Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids* 20(8), 1216-1222.
- Jridi, M., Lassoued, I., Nasri, R., Ayadi, M. A., Nasri, M., Souissi, N. 2014. Characterization and potential use of cuttlefish skin gelatin hydrolysates prepared by different microbial proteases. *BioMed Research International* 2014.
- Jun, S.Y., Park, P.J., Jung, W. K., & Kim, S.K. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology* 219(1), 20-26.
- Kaewdang, O., Benjakul, S., Kaewmanee, T., Kishimura, H. 2014. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Chemistry* 155, 264-270.
- Kimura, S. 1992. Wide distribution of the skin type I collagen alpha 3 chain in bony fish. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative Biochemistry* 102(2), 255-260.
- 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(3), 363-372.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry* 102(4), 1317-1327.
- Kong, J., Yu, S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein

126(4), 1636-1642.

- the value of marine by-products* (pp. 397-412). Woodhead Publishing.
- Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., Kishimura, H. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry* 124(1), 97-105.
- Taheri, A., Farvin, K. S., Jacobsen, C., & Baron, C.P. 2014. Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. *Food Chemistry* 142, 318-326.
- Tang, C.H., Wang, X.S., & Yang, X.Q. 2009. Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry* 114(4), 1484-1490.
- Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L., Hu, Q. 2008. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry* 108(2), 616-623.
- Wang, L., Liang, Q., Chen, T., Wang, Z., Xu, J., & Ma, H. 2014. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocolloids* 38, 104-109.
- Wang S., Hou H., Hou J., Tao Y., Lu Y., Yang X., Li B. 2013. Characterization of acid-soluble collagen from bone of pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology* 22(4), 407-420.
- Wu H.C., Chen H.M., Shiau C.Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International* 36(9-10), 949-957.
- Zhang Z., Li G., Shi B.I. 2006. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal-society of Leather Technologists and Chemists* 90(1), 23.
- Zhong S., Ma C., Lin Y.C., Luo Y. 2011. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Food Chemistry*

## Evaluation of the effect of acidic and enzymatic extraction methods on collagen recovery from parrot fish (*Scarus ghobban*) skin and evaluation of their structural, chemical, antioxidant and functional properties

Shima Abbasi<sup>1</sup>, Shahab Naghdi<sup>2\*</sup>, Rezvan Mosavai Nadoshan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Industry Science and Engineering, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University of Medical Sciences of Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Department of Seafood Processing, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

<sup>3</sup>Department of Fishery, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industry, Azad University, Tehran-Shomal Branch. Tehran, Iran.

\*Corresponding author: shahab\_naghdi@modares.ac.ir

Received: 2021/1/28

Accepted: 2021/8/31

### Abstract

In the present study, the effect of acidic and enzymatic extraction of collagen from fish parrot skin was investigated. The results of extraction efficiency showed that the enzymatic method was three times more effective than acidic method. FTIR and SEM tests were used to further investigate the obtained collagens. The results showed that amides A and B appeared in similar regions for the obtained samples. Also, enzymes extracted by enzymatic method (PSC) had a more regular structure than collagen extracted by acidic method (ASC). The electrophoresis pattern of the extracted collagens revealed that the obtained collagens were type I and consisted of two  $1\alpha$  chains and one  $2\alpha$  chain with a density of  $1\alpha$  greater than  $2\alpha$ . The results of the percentage of neutralization of DPPH free radicals of the obtained collagens showed that among the concentrations of 0.1, 0.01 and 0.001 the highest concentration had the best performance and for ASC sample 34.35% and in the sample (ASCH) It was 53.86 % ( $P<0.05$ ). Examination of emulsifying properties (EAI) of the obtained samples showed that both samples in acidic conditions showed higher emulsifying activity, the highest value of this index in acidic collagen 67.48% and enzymatic collagen 32/17%, respectively ( $P<0.05$ ). The results of emulsion stability showed that hydrolyzed collagen samples at all pHs showed higher performance than non-hydrolyzed samples ( $P<0.05$ ). The solubility of the samples was different at different pHs and the highest solubility of the samples was acidic pH with 2.38% for acidic collagen and 5.3% for enzymatic collagen ( $P<0.05$ ). The results showed that the enzymatic method can have a better performance in extracting collagen from the skin of *Scarus ghobban* fish and also the obtained collagen can be used for food and cosmetic applications.

**Keywords:** Parrot, Collagen, DPPH, Functional properties.