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

- **سهیلا نادری‌قره‌قشلاق**: گروه زیست شناسی دریا، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **شهلا جمیلی***: سازمان تحقیقات آموزش وترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران
- **محمدجواد فاطمی**: گروه جراحی پلاستیک و ترمیمی، مرکز تحقیقات سوختگی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، بیمارستان حضرت فاطمه (س)، تهران، ایران
- **علی‌محمد 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 ازپوست 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 به‌روش اسید و باز استخراج گردید و سپس به‌وسیله Pico.Tag، SDS-PAGE، FTIR و اسپکتوفوتوگرافی UV مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج براساس SDS-PAGE و ترکیبات اسیدهای آمینه نشان دادندکه کلاژن پوست هر دو ماهی کلاژن نوع I و از دو زنجیره α (۱α و۲α) با وزن مولکولی ۱۳۰ kDa و مقدار جزئی 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 گلایسین را در هر دو نمونه کلاژن، ماهی سفید ۱۸۲/۵ residues بر ۷۰۶/۱ residues و ماهی قباد ۱۸۸/۶ residues بر ۷۰۶/۱ residues را نشان داد که آن یک سوم از کل اسیدهای آمینه محاسبه گردید و هم‌چنین مقدار پرولین به‌عنوان یک اسیدآمینه منحصر به‌فرد در کلاژن ماهی سفید ۸۹/۶ residues بر ۷۰۶/۱ residues و در ماهی قباد residues ۸۶/۸ بر ۷۰۶/۱ residues بود.

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

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: shahlajamili45@yahoo.com

مقدمه

وجود کلاژن در تمامی بافت‌های پیوندی، آن‌را به یکی از مولکول‌های مادهٔ 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 زنجیرهٔ α هستند که باهم به‌دلیل ساختار مولکولی‌شان جفت می‌شوند. هر زنجیرهٔ α تشکیل شده از بیش از ۱۰۰۰ آمینواسید بر پایهٔ توالی Gly-X-Y- می‌باشند. قرارگیری گلیسین هر از سه آمینواسید جهت تأمین اتصال محکم سه زنجیرهٔ α در مولکول تروپوکلاژن ضروری است و مکان‌های X و Y اغلب توسط پرولین و ۴-هیدروکسی پرولین پر می‌شود (Prockop و Kivirikko، ۱۹۹۵؛ Van der Rest و Garrone، ۱۹۹۱). کلاژن ماهی نوع I، به‌لحاظ حلالیت فوق‌العاده زیاد آن در اسید رقیق در مقایسه با کلاژن پستانداران و ماکیان منحصربه‌فرد است. در مقایسه با کلاژن نوع I گوساله، کلاژن نوع I مهره‌داران پست‌تر مشتق شده از ماهیان استخوانی و لامپری، میزان تشابه ساختاری زیادی را بین گونه‌ها با توجه به زنجیره‌های α1 و α2 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 کرده‌است 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. به‌علاوه میزان هیدروکسیلاسیون پرولین ۴۸-۳۵ درصد محاسبه شده است، که مشابه میزان مشاهده‌شده در بافت‌های پستانداران (تقریباً ۴۵ درصد) است. به‌علاوه، ارتباطی خطی بین پایداری کلاژن و محتوای هیدروکسی پرولین عموماً دیده‌شده 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). به‌طورکلی، 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 ۵۵-۴۵ 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 قطب‌شمال محسوب می‌شود که بعد از دوران یخبندان یعنی ۱۲-۱۰ هزار سال پیش وارد این دریا شده و خصوصیات بومی دریای خزر کسب کرده‌است(قاسم‌اف، ۱۳۷۲). ماهی سفید در سواحل دریای خزر از رودخانه ترک در قسمت شمالی دریا تا سواحل جنوبی و به‌خصوص مناطق غربی و شرق انزلی 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 تالاب‌ها می‌گردد(رضوی‌صیاد، ۱۳۶۹). ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) نوعی گونه مهاجر پلاژیک- نرتیک است و در آب‌های ساحلی در اعماق بین ۱۵ تا ۲۰۰ متر زندگی می‌کند. این گونه دارای مهاجرت‌های بین‌اقیانوسی 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).

مواد: ماهی تازه از بازارهای ماهی فروشی خریداری شد، پولک‌ها کاملاً پاک‌شدند، پس از جدا نمودن پوست ماهی‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها با آب شستشو داده شدند و سپس به قطعات ریز (۰/۵×۰/۵ 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 قلیایی مواد پروتئینی غیرکلاژنی: 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) ۱۰٪ با نسبت ۱:۱۰ به‌مدت ۲۴ ساعت استیرر شدند. هر ۸ ساعت محلول تعویض گردید. بافت بدون چربی با آب مقطر سرد به‌طور کامل شستشو داده شد.

آماده‌سازی کلاژن محلول در اسید (ASC) از پوست ماهی قباد: برای استخراج کلاژن، بافت آماده شده در اسیداستیک M ۰/۵ با نسبت (w/v) ۱:۱۵ به‌مدت ۳ روز روی استیرر قرار گرفت. مخلوط از طریق دو لایه پارچه پنیر صاف گردید. سپس سوپرناتانت جمع‌آوری گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. باقی‌مانده به همان روش قبلی مجددا استخراج گردید. هر دو سوپرناتانت به‌دست آمده در NaCl ۰/۹ مولار به‌مدت 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 زمانی‌که به pH طبیعی برسد. رسوب دیالیز شده به‌وسیله فریز درایر خشک گردید و به‌عنوان کلاژن 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 کلاژن ماهی سفید و ماهی قباد در اسیداستیک ۴٪ حل شده و به‌مدت ۵ دقیقه در آب جوش گذاشته شدند و سپس هر دو روی ژل منتقل گردیدند و نهایتاً الکتروفورز با ولتاژ ۱۲۰ به‌مدت ۴ ساعت انجام شد. بعد از الکتروفورز، ژل باکوماسی آبی به‌مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. سپس با محلول رنگ بر شامل متانول، استیک اسیدگلاسیال 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 اسیدآمینه و تعیین phenylthiocarbamyl مشتقی از اسیدهای آمینه با استفاده از فنیل ایزوتیوسیانات و فاز معکوس با کارایی بالای کروماتوگرافی مایع به‌ترتیب انجام گردید. کلاژن خشک پوست ماهی(۱۰-۲۰ میلی‌گرم) با اسیدکلریدریک M ۶ که حاوی ۱٪ فنول(v/v) مخلوط گردید. سپس مخلوط در معرض گاز N۲ 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 به‌مدت 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 loader اتوماتیک (WISPTM)(Millipore Corp, Milford, MA, USA) به‌داخل 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 آمید I و آمید II از باندهای غالب در ساختار پروتئین و پلی‌پپتید می‌باشند. حساس‌ترین ناحیه در طیف باند آمیدی I با عدد موج cm-1 ۱۶۰۰-۱۱۷۰۰ است که متعلق به ارتعاشات کششی پیوند C=O در اتصالات پپتیدی پلی‌پپتید یا پروتئین می‌باشد. در مقایسه با آن باندهای آمید II متعلق به ارتعاشات پیوند CN می‌باشد (Kong و همکاران، ۲۰۰۷). به‌منظور 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

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 Nicoiet قرار داده شد و با استفاده از نرم‌افزار OPUS آنالیزهای مربوطه انجام شده و طیف مربوطه تهیه گردید.

اسپکتروفتومتری UV: جذب اتمی UV کلاژن درمحدوده طول موج ۳۵۰-۲۲۰نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu انجام شد. کلاژن خالص در اسیداستیک ۰/۴٪ میلی‌گرم/میلی‌لیتر برای به‌دست 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

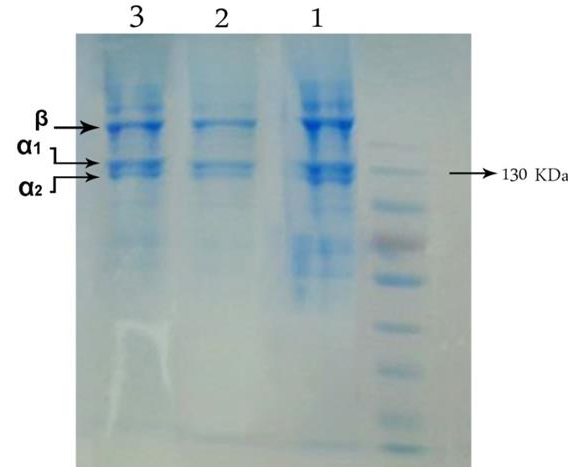
استخراج کلاژن از پوست ماهی سفید (*Rutilus kutum*): کلاژن از پوست ماهی‌سفید به‌روش Nagia و Suzki(۲۰۰۰) استخراج گردید. میزان کلاژن استخراج شده از پوست ماهی سفید ۱۵/۶٪ بود. این نتیجه حاصل نشان داد که میزان کلاژن به‌دست آمده از پوست ماهی سفید خیلی بیش‌تر از میزان کلاژن پوست Brown stripe red snaper (۹٪) و کم‌تر از کلاژن پوست ماهی Japanese sea-bass (۵۰/۱٪)، chub mackerel (۴۹/۸٪)، 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 به‌روش Nagia و Suzki(۲۰۰۰) استخراج گردید. میزان کلاژن‌استخراج شده از پوست ماهی قباد ۱۴/۵٪ بود.

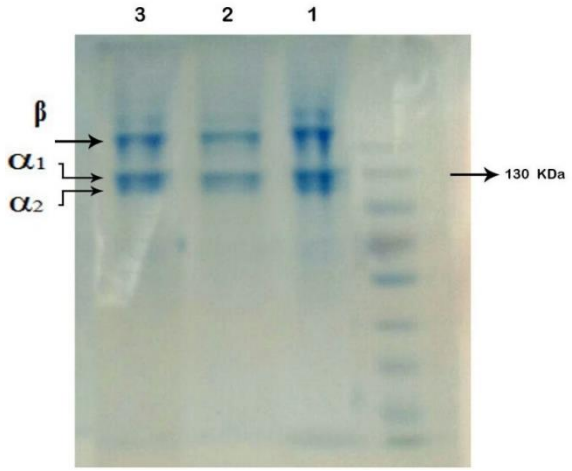
آزمون SDS-PAGE

ماهی سفید (*Rutilus kutum*): کلاژن استخراج شده از پوست ماهی سفید به‌وسیله آزمون SDS-PAGE امتحان شد. نتیجه حاصل از آزمون نشان داد که کلاژن‌های استخراج شده از پوست ماهی سفید دارای وزن مولکولی ۱۳۰ کیلو دالتون می‌باشد. هم‌چنین نتایج حاصل از آزمون SDS-PAGE نشان داد که کلاژن ماهی سفید از دو زنجیره α (۱α و ۲α) و β تشکیل شده است (شکل ۱).

ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*): کلاژن استخراج شده از پوست ماهی قباد به‌وسیله آزمون SDS-PAGE امتحان شد. نتیجه حاصل از آزمون نشان داد که کلاژن های استخراج شده ازپوست ماهی قباد دارای وزن مولکولی ۱۳۰ کیلودالتون می‌باشد. هم‌چنین نتایج حاصل از آزمون SDS-PAGE نشان داد که کلاژن ماهی قباد از دو زنجیره α (۱α و ۲α) و β تشکیل شده است (شکل ۲).



شکل۱ : الگوی SDS-PAGE کلاژن محلول در اسید: ۱- مارکر پروتئین و ۱،۲، ۳ ASC پوست ماهی *Rutilus kutum*



شکل۲ : الگوی SDS-PAGE کلاژن محلول در اسید: ۱- مارکر پروتئین و ۱،۲، ۳ ASC پوست *Scomberomorus guttatus*

ترکیب اسیدآمینه

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 glaycin را در کلاژن استخراج‌شده‌از پوست ماهی سفید نشان داد که حدود یک سوم از کل اسیدهای آمینه را شامل می‌شود. علاوه بر این پرولین به‌عنوان یک اسیدآمینه منحصر به‌فرد در ASC می‌باشد که دارای مقدار مشخصی ۸۹/۶ redidues بر

۷۰۶/۱ residuse می‌باشد. آلانین و گلوتامات و آرژنین و پرولین بیش‌ترین میزان از اسیدهای آمینه را دارا می‌باشند که می‌تواند به‌عنوان مشخصات کلاژن در این مطالعه به‌دست آمده‌باشد. در کلاژن استخراج شده تریپتوفان و سیستئن وجود نداشت و آمینواسیدهای متیونین و تیروزین و هیستیدین کم‌ترین میزان در کلاژن را دارا بودند.

جدول ۱: ترکیب اسیدآمینه کلاژن ماهی سفید (*Rutilus kutum*)

اسیدآمینه	مقدار
آلانین	۷۳/۱
آرژنین	۷۰/۸
اسپارتات	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
فنیل‌آلانین	۲۰/۶
پرولین	۸۹/۶
سرین	۳۴/۸
ترئونین	۲۰/۶
تیروزین	۴/۴

مقادیر به‌صورت میانگین آورده شده است±انحراف معیار

ترکیب اسیدآمینه کلاژن ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*): ترکیب اسیدآمینه کلاژن ماهی قباد در جدول ۲ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل اسیدآمینه مقدار بسیار بالایی از glaycin 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 به‌عنوان یک اسیدآمینه منحصر به‌فرد در ASC می‌باشد که دارای مقدار مشخصی ۸۶/۸ redidues بر ۷۰۶/۱ residuse می‌باشد. آلانین و گلوتامات و آرژنین و پرولین بیش‌ترین میزان از اسیدهای آمینه را دارا می‌باشند که می‌تواند به‌عنوان مشخصات کلاژن در این مطالعه به‌دست آمده‌باشد. در کلاژن استخراج شده تریپتوفان و سیستئن وجودنداشت و آمینواسیدهای متیونین و تیروزین و هیستیدین کم‌ترین میزان در کلاژن را دارا بودند.

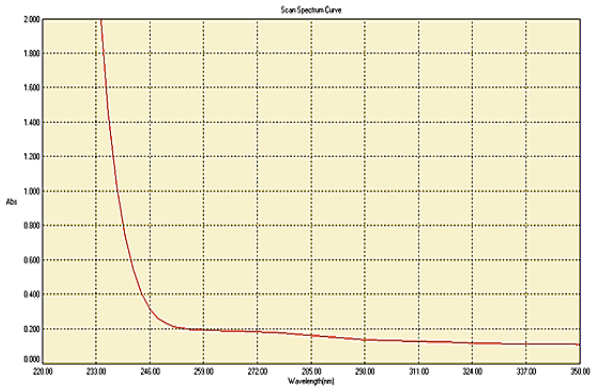
جدول ۲: ترکیب اسیدآمینه کلاژن ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*)

اسیدآمینه	مقدار
آلانین	۸۴/۳
آرژنین	۷۱/۸
اسپارتات	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
فنیل‌آلانین	۲۰/۷
پرولین	۸۶/۸
سرین	۲۶/۳
ترئونین	۲۰/۷
تیروزین	۳/۹

مقادیر به‌صورت میانگین آورده شده است±انحراف معیار

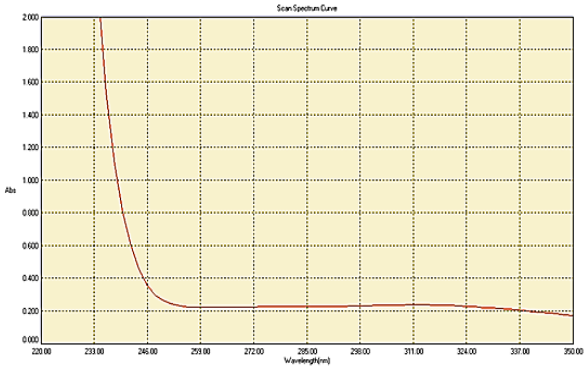
اسپکتروفتومتری UV

ماهی سفید (*Rutilus kutum*): اسپکتروفتومتری کلاژن پوست ماهی سفید در شکل ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه جذب UV از ASC در طول موج ۳۵۰-۲۲۰ نانومتر می‌باشد. بیش‌تر پروتئین‌ها حداکثر جذب اشعه ماوراء بنفش را در ۲۸۰ نانومتر دارند که به تعداد تیروزین و باقی‌مانده‌های تریپتوفان در پروتئین‌ها ارتباط دارد. اما مقدار تیروزین در ASC ۴/۴ residues بر ۱۰۰۰ residues بود. اسپیکتوفتومتری UV حداکثر جذب را در ۲۴۰ نانومتر نشان داد که این ممکن است به گروه‌های C=O, -COOH, CONH2 در زنجیره‌های پلی‌پپتیدهای کلاژن مربوط باشد.



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

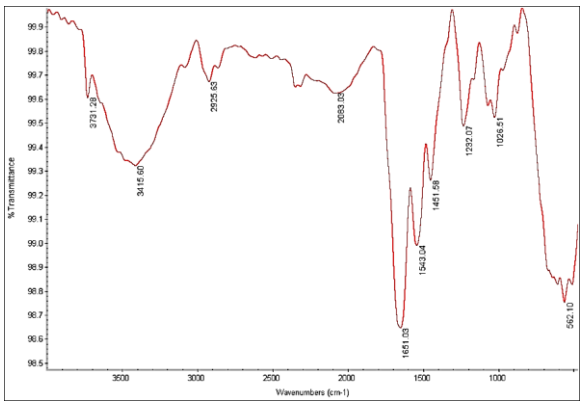
ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*): اسپکتروفتومتری کلاژن پوست ماهی قباد در شکل ۲ نشان داده شده است. در این مطالعه جذب UV از ASC در طول موج ۳۵۰-۲۲۰ نامتر می‌باشد. اسپیکتوفتومتری UV حداکثر جذب را در ۲۴۰ نانومتر نشان داد که این ممکن است به گروه‌های C=O, -COOH, CONH2 در زنجیره‌های پلی‌پپتیدهای کلاژن مربوط باشد.



شکل۲: نمودار جذب طیف UV کلاژن ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*)

تست FTIR

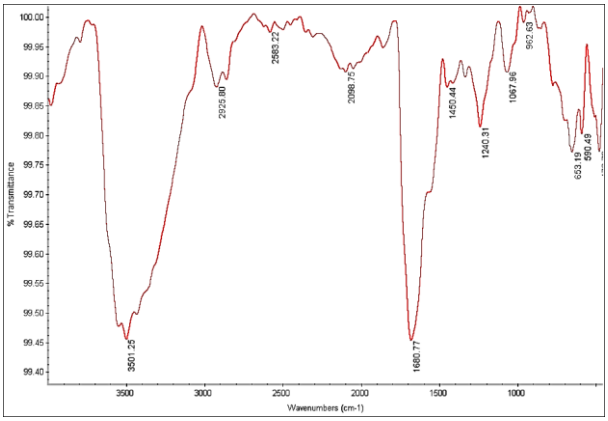
ماهی سفید (*Rutilus kutum*): طیف‌های FTIR در محدوده ۴۰۰۰-۴۰۰ cm-1 از کلاژن محلول در اسید از ماهی سفید در شکل ۳ ارائه شده است. گروه آمید A مربوط به فرکانس کششی N-H می‌باشد. ارتعاش کششی N-H در محدوده ۳۴۴۰-۳۴۰۰ cm-1 رخ می‌دهد. باند آمید A پوست ماهی سفید (*Rutilus kutum*) در ۳۴۱۵ cm-1 مشاهده شد. گروه آمید باند B کلاژن در ۲۹۲۵ cm-1 در ارتباط با کشش نامتقارن از CH2 مشخص شد. موقعیت آمید باند I در ۱۶۵۱ cm-1 جذب شد که در ارتباط با ارتعاش کششی C=O از باند پیوند هیدروژن جفت شده با COO می‌باشد که آن به ساختار دوم پروتئین مرتبط می‌باشد. پیک آمید III کلاژن در ۱۲۳۲ cm-1 و ۱۴۵۱ cm-1 جذب گردید که باندها ساختار مارپیچی را نشان دادند. طیف مادون قرمز ثبت شده برای فیلم‌های نازک ساخته شده از کلاژن ماهی سفید (*Rutilus kutum*) باندهای متداول برای کلاژن نوع I: آمید A، آمید B، آمید I، آمید II و آمید III نشان داد. ویژگی‌های آمید A معمولاً با ارتعاش کششی N-H مربوط است که در محدوده ۳۴۴۰~۳۴۰۰ cm-1 رخ می‌دهد. ماکزیمم پیک جذب شده از کلاژن ماهی قباد *Rutilus kutum* در ۳۴۱۵ cm-1 به‌دست آمد. هنگامی‌که گروه N-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 آمید I معمولاً در محدوده ۱۷۰۰~۱۶۰۰ cm-1 می‌باشد که به‌وسیله ارتعاش کششی از C=O در پلی‌پپتید پروتئین تولید می‌شود. این ناحیه به تغییرات ساختار دوم پروتئین حساس است و اغلب برای آنالیز ساختار دوم پروتئین استفاده می‌شود. پیک جذبی آمید I در ۱۶۵۱ cm-1 به‌دست آمد. باند آمید II در ۱۵۴۳ cm-1 دیده شد. پیک آمید III در کمپلکس با عکس‌العمل‌های داخل سلولی در کلاژن است که شامل ترکیباتی از C-N کششی و N-H در سطح همواری از ارتباطات آمید و هم‌چنین جذب‌های ارتعاشی ناشی از تکان CH2 می‌باشد.



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

ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*): طیف‌های FTIR در محدوده ۴۰۰۰-۴۰۰ cm-1 از کلاژن محلول در اسید از ماهی قباد در شکل ۴ ارائه شده است. گروه آمید A مربوط به فرکانس کششی N-H می‌باشد. ارتعاش کششی N-H در محدوده ۳۴۴۰-۳۴۰۰ cm-1 رخ می‌دهد. باند آمید A پوست ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) در ۳۵۰۱ cm-1 مشاهده شد. گروه آمید باند B کلاژن در ۲۹۲۵ cm-1 در ارتباط با کشش نامتقارن از CH2 مشخص شد. موقعیت آمید باند I در ۱۶۸۰ cm-1 جذب شد که در ارتباط با ارتعاش کششی C=O از باند پیوند هیدروژن جفت شده با COO می‌باشد که آن به ساختار دوم پروتئین مرتبط می‌باشد. پیک آمید III کلاژن در ۱۲۴۰ cm-1 و ۱۴۵۰ cm-1 جذب گردید که باندها ساختار مارپیچی را نشان دادند. طیف مادون قرمز ثبت شده برای فیلم‌های نازک ساخته شده از کلاژن ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) باندهای متداول برای کلاژن نوع I: آمید A، آمید B، آمید I، آمید II و آمید III نشان داد. ویژگی‌های آمید A معمولاً با ارتعاش کششی N-H مربوط است که در محدوده ۳۴۴۰~۳۴۰۰ cm-1 رخ می‌دهد. ماکزیمم پیک جذب شده از کلاژن ماهی قباد *Scomberomorus guttatus* در ۳۵۰۱ cm-1 به‌دست آمد. هنگامی‌که گروه N-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 آمید I معمولاً در محدوده

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



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

بحث

ASC (کلاژن محلول در اسید) از پوست ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) و پوست ماهی سفید استخراج شد که به‌عنوان trimmers از دو زنجیره متفاوت α (۱α و ۲α) تشکیل شده بودند. بر این اساس موقعیت ارتعاشی الکتروفورز ۱α متفاوت از ۲α در هر دو نمونه بود که زنجیره ۱α فضای ارتعاشی بیش‌تری داشت. که این نشان داد وزن مولکولی ۲α کوچک‌تر از وزن مولکولی ۱α 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 ۱α و ۲α می‌باشند. یافته‌های این تحقیق با مطالعات Tylingo(۲۰۱۶)؛ Alizadeh Node(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 گلایسین در هر دو نمونه ماهی سفید و ماهی قباد را نشان داد که آن یک سوم از کل اسیدهای آمینه محاسبه گردید و به‌طور قابل توجهی به‌عنوان اسیدآمینه اصلی از گلایسین Salmon fish (Tylingo و همکاران، ۲۰۱۶) کم‌تر بودند اما با نتایج Nile perch (Muyonga و همکاران، ۲۰۰۴) و channel catfish (Liu و Guo، ۲۰۰۷) مشابهت داشتند. دلیل پایین بودن میزان گلایسین در ماهی *Scomberomorus gttatus* و *Rutilus kutum* نسبت به ماهی Salmon fish ممکن است به‌دلیل آلوده‌شدن توسط سایر پروتئین‌ها باشد. مشخصات هر دو نمونه کلاژن ازجمله میزان بالای آلانین، اسیدهای آمینه گلوتامات- آرژنین و پرولین می‌تواند به‌عنوان یافته این مطالعه باشد. تیروزین، هیستیدین، متیونین و ایزولوسین در کلاژن هر دو ماهی بسیار پایین بود که با ماهی تون Albacore، ماهی Rohu و Lung Fish مشابهت داشت. سیستئین یا تریپتوفان 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 به‌جذب کلاژن سایر ماهی‌ها مانند Nile tilapia، walleye Pollock و black pomfret نزدیک‌تر بود (AlizadehNodeh و همکاران، ۲۰۱۴؛ Zeng و همکاران، ۲۰۰۹؛ Yan و همکاران، ۲۰۰۸). بیش‌تر پروتئین‌ها بیش‌ترین جذب فرابنفش را در ۲۸۰ نانومتر دارند. فنیل‌آلانین، تریپتوفان و تیروزین باندهای جذبی بین ۲۵۰ و ۲۹۰ دارند (Zhanh و همکاران، ۲۰۱۱؛ Yan و همکاران، ۲۰۰۸). درصورتی‌که طول موج جذب کلاژن ماهی سفید و کلاژن ماهی قباد کم‌تر بود که این ممکن است به‌دلیل 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 guttatus* در محدوده ۴۰۰۰-۴۰۰ cm-1 بود که مشابه به کلاژن ماهی‌های Walleye Pollock، channel catfish، Nile perch بودند (Liu و همکاران، ۲۰۰۸؛ Yan و همکاران، ۲۰۰۸؛ Muyonga و همکاران، ۲۰۰۴). گروه آمید A مربوط به فرکانس کششی N-H می‌باشد. ارتعاش کششی N-H در محدوده cm-1 ۳۴۰۰-۳۴۴۰ رخ می‌دهد. باند گروه آمید A و B کلاژن پوست ماهی سفید (*Rutilus kutum*) در ۳۴۱۵ cm-1 و ۲۹۲۵ cm-1 و کلاژن پوست ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) در ۳۵۰۱ cm-1 و ۲۹۲۵ cm-1 مشاهده شد که به کشش نامتقارن از CH2 نسبت داده شد (Muyonga و همکاران، ۲۰۰۴). موقعیت آمید باند I کلاژن ماهی سفید در ۱۶۵۱ cm-1 و در ماهی قباد در ۱۶۸۰ cm-1 جذب شد که

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:عادلی،ا.، ۱۳۷۹. مرکز تحقیقات شیلاتی انزلی.۵۶ صفحه.

۴. **کازانچف، ا.ن.، 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 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, 2α 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. **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,

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 (*T*hunnus Alalunga), Dog Shark *(Scoliodon* Sorrakowah), and Rohu (Labeo Rohita). Scholars Research Library, Annals of Biological Research. Vol. 4, No. 1, pp: 271-278.

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 Brownstripered 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 punctaus*). 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 nilotics*). 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 isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepsheadseabream (*Archosargus probato cephalus*). 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 Archeaogastropod *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 Pawlowicz, 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: Armed. 42 p.

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.