



بررسی خواص آنتی اکسیدانی و عملکردی کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی هامور

*(Epinephelus coioides)*رضوان موسوی ندوشن<sup>۱\*</sup>، فاطمه عسگری مهرآبادی<sup>۲</sup><sup>۱</sup>- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.<sup>۲</sup>- کارشناس ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

| اطلاعات مقاله                           | چکیده                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| تاریخ های مقاله :                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۱۵                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| کلمات کلیدی:                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| کلاژن،                                  | کلاژن فراوانترین پروتئین با منشأ حیوانی و مهم ترین ترکیب ساختمانی بافت پیوندی است که در صنعت غذا و نوشیدنی مورد استفاده قرار می گیرد. علاوه بر این تحقیقات اخیر ویژگیهای عملکردی، فراسودمند و پتانسیل مصرف کلاژن استخراج شده از ضایعات آبزیان را در قالب غذا-دارو و سامانه های رسانش ترکیبات حساس زیست فعال به اثبات رسانده است. لذا هدف از این تحقیق بررسی ویژگیهای ساختاری، خواص آنتی اکسیدانی و عملکردی در کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی هامور معمولی ( <i>Epinephelus coioides</i> ) قرار داده شد. در این تحقیق کلاژن به روش اسیدی و آنزیمی استخراج و سپس کلاژن های استخراج شده توسط آنزیم پپسین هیدرولیز گردید. ویژگیهای ساختاری آنها به وسیله طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی (SEM) و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید (SDS-PAGE) بررسی شد. همچنین ویژگیهای عملکردی شامل قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت کاهندگی و میزان تولید، خصوصیات و پایداری کف حاصل از کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده مورد ارزیابی قرار گرفت. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشانگر ساختار حفاظت شده ورقه ای؛ فیبری و ساختار فضایی دوم و سوم بوده، شبکه ماتریکس از منافذ متداول شکل تشکیل شده، در طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) حضور گروه های عاملی شاخص در کلاژن نوع I مشتمل بر پیوندهای آمید A و B همچنین امیدهای نوع I، II و III به اثبات رسید. نتایج به دست آمده در مورد خواص عملکردی، کلاژن پوست ماهی هامور نیز نشان داد که با افزایش غلظت، و بویژه در کلاژن هیدرولیز شده قدرت کاهندگی و توانایی مهار رادیکال DPPH افزایش پیدا کرده، همچنین بررسی کلاژن و نمونه هیدرولیز شده نشان داد که تنها کلاژن پوست ماهی هامور پتانسیل تولید کف دارد. در نهایت می توان گفت کلاژن و کلاژن هیدرولیز و استخراج شده از پوست ماهی هامور به عنوان یک ماهی پرمصرف دریایی با خواص آنتی اکسیدانی مطلوب، و ویژگیهای عملکردی مناسب میتواند در مقیاس انبوه تولید و به عنوان یک ترکیب زیست فعال و امولسیفایر در صنعت غذا و در تولید محصولات فراسودمند مورد استفاده قرار گیرد. |
| DOI: 10.22034/FSCT.19.126.387           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.2.3 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| * مسئول مکاتبات:                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| mousavi.nadushan@gmail.com              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

## ۱- مقدمه

سیر رو به رشد جمعیت جهان و کمبود مواد غذایی به ویژه پروتئین سبب توجه ویژه محققین علوم تغذیه به منابع دریایی شده است. ضایعات فراوری ماهی شامل سر، پوست، فلس و امعاء و احشاء داخلی حدود 60 درصد از کل وزن ماهیان را تشکیل می دهند و پس از فرآوری و تولید فیله دورریز می شوند. این درحالی است که این ضایعات حاوی مقادیر بالایی پروتئین و بویژه کلاژن هستند. کلاژن بخش عمده ای از بافت های پیوندی شامل پوست، استخوان، غضروف، تاندون و سلول های خونی را تشکیل می دهد [1]، همچنین در تشکیل شبکه های فیبریلی و میکروفیبریلی ماتریکس خارج سلولی و غشاهای زیرین شرکت دارد. کلاژن دارای مقدار زیادی اسیدآمین هیدرو کسی پرولین و هیدروکسی لیزین و مقدار اندکی اسیدآمین ه های گوگرد دار است. ژلاتین در واقع فرم دناتوره شده ی کلاژن است که وزن مولکولی کمتری نسبت به کلاژن دارد و نیز مخلوطی از پپتیدها و پروتئین هاست که توسط هیدرولیز جزئی کلاژن ساخته می شود [2]. کلاژن باوجود خواصی چون آنالپی بالا، ساختار شبکه ای و فیبریل های بزرگ تر، نقطه ی ایزو الکتریک پایه و مقاومت در برابر هیدرولیز توسط پروتئاز نسبت به ژلاتین ارجحیت دارد [3]. همچنین مارپیچ های سه گانه و شبکه های فیبریلی موجود در کلاژن محکم تر است و قدرت مکانیکی و قابلیت برگشت پذیری بهتری دارد درحالی که ژلاتین در توصیف خواص رئولوژیک مانند استحکام ژل، ثبات حرارتی و خواص ویسکوالاستیک منحصربه فرد است [4]. در حال حاضر منابع اصلی استخراج کلاژن ضایعات حیواناتی چون گاو، خوک، مرغ و همچنین پوست، فلس و استخوان ماهی است. اما با توجه به احتمال شیوع بیماری هایی چون جنون گاوی و همچنین محدودیت های اسلام در مصرف کلاژن حاصل از ضایعات خوک یا دام های حلال گوشتی که ذبح شرعی ندارند توجه محققین به تولید و تحقیق در زمینه ی کلاژن تولید شده از آبزیان معطوف گردیده است [5 و 6]. بر اساس نظرات گومز-گلین و با توجه به خواص زیست فعال کلاژن، موارد استفاده از کلاژن در غذا به صورت افزودنی و مکمل های غذایی، می تواند به دو شکل محدود شود. اولین گروه به کاربردهای کلاژن براساس خواص مرتبط با تولید الگوی شبکه ژل، ضخامت ژل، تشکیل ژل و ظرفیت اتصال به آب

مربوط می شود. و محدودوم، در رابطه با کاربرد ژل در تولید امولسیون، تشکیل کف، تثبیت، چسبندگی و پیوستگی، عملکرد نگه دارندگی در کلوئید و ظرفیت تشکیل فیلم با توجه به خواص مرتبط با رفتار سطحی پروتئین کلاژن است [7]. Wu و همکاران [8] پژوهشی با عنوان اسید آمینه های آزاد و پپتید های مرتبط با خواص آنتی اکسیدانی پروتئین های هیدرولیز شده از ماهی ماکرل خال خالی (*scomber Austriasicus*) انجام دادند. روش های مختلف سنجش قدرت آنتی اکسیدانی از جمله: مهار اکسایش خود به خودی اسید لینولئیک، اثر مهارکنندگی بروی رادیکال آزاد a,a-dipH enyl-b-picrylhydrazyl و قدرت کاهندگی نشان داد که پپتیدهای هیدرولیز شده این ماهی از قدرت آنتی اکسیدانی قابل توجهی برخوردار است. همچنین بین مقدار پپتید ها و فعالیت آنتی اکسیدانی رابطه مثبتی وجود داشت. نتایج بررسی بر روی بخش های پپتیدی خالص سازی شده توسط کروماتوگرافی وزنی نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی پپتید هایی با وزن ملکولی حدود ۱۴۰۰ دالتون از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی، قوی تر از پپتید هایی با وزن ملکولی ۲۰۰ و ۹۰۰ دالتون هستند.

واژکوئر و همکاران [۹] خواص عملکردی و آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی قزل آلا ی رنگین کمان توسط سه نوع آنزیم (فلاورزایم، پاپائین، پپسین) را مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند که پروتئین هیدرولیز شده با پپسین بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH و کاهندگی یون فریک را دارد. همچنین پایداری امولسیون ی پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم در pH های بررسی شده به طور معناداری بالاتر از دو پروتئین دیگر بود. Wang و همکاران [۱۰] نیز تحقیقاتی در زمینه پپتید های آنتی اکسیدانی حاصل از پروتئین هیدرولیز شده صدف خوراکی (*Crassostrea talienwhanensis*) انجام دادند. لین و همکاران [۱۱] پژوهشی تحت عنوان جداسازی و شناسایی کلاژن از پوست هامور غول پیکر (*Epinephelus Lanceolatus, giant grouper*) انجام دادند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که ASC و PSC شامل دو زنجیره متفاوت  $\alpha$  ( $\alpha 1$  و  $\alpha 2$ ) بودند و ساختار کلاژن نوع I توسط باند دی سولفید مشخص شد. ایمینواسید موجود در

ASC و PSC پوست ماهی هامورغول پیکر<sup>۱</sup> بترتیب ۱۸۹ و ۱۸۱ ازهر هزار واحد ماده باقی بود. دمای دنا تورا سیون کلاژن در پوست این گونه ۳۱-۲۹ درجه سانتی گراد مشخص گردید. بالاترین حلالیت ASC و PSC بترتیب در pH (۶-۵) مشاهده شد و کاهش شدید حلالیت در غلظت نمک بالاتر از ۳ درصد (وزنی/حجمی) اتفاق افتاد.

با توجه به مزیت های کلاژن ماهی و تاثیرات/ویژگیهای منفی زلاتین حیوانی بویژه زلاتین استخراج شده از ضایعات احشام، به مرور زمان و در حال حاضر، کلاژن آبزیان در میان مردم از مطلوبیت بیشتری برخوردار گردیده است. از سوی دیگر هزینه پایین، راندمان بالای استخراج و ویژگیهای زیست فعال کلاژن حاصل از ضایعات آبزیان در مقایسه با سایر منابع زلاتین منجر به افزایش تقاضا برای تولید کلاژن از آبزیان در سطح جهان و ایران گردیده است. با توجه به منابع عظیم دریایی در ایران و نظر به اینکه ماهی هامور هم بصورت وحشی و هم بصورت پرورشی به وفور یافت و مصرف میشود و با توجه به تفاوت های ساختاری و عملکردی کلاژن های استخراج شده از آبزیان مختلف و فقدان اطلاعات در مورد ویژگیهای کلاژن پوست ضخیم این ماهی پرمصرف و ارزشمند، استفاده از آن جهت تولید کلاژن می تواند مقرون به صرفه و اقتصادی باشد.

## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- آماده سازی نمونه ها

جهت انجام این پژوهش در گام نخست ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) به وزن ۲-۳ کیلوگرم از بازار بعثت (شهر تهران) خریداری شد و پولک ها نیز به طور کامل از پوست و پوست آن به دقت از گوشت جدا شد. در مرحله بعد پوست سه مرتبه توسط آب مقطر سرد شستشو داده شد و توسط قیچی به قطعات ۰.۵×۰.۵ سانتیمتر برش و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

### ۲-۲- تهیه کلاژن از پوست به روش اسیدی

کلاژن محلول در اسید (ASC) با استفاده از روش ناجیا و سوزوکی (2000) و با کمی تغییر استخراج شد [۱۲]. تمام

مراحل دردمای ۴ درجه سانتی گراد و باهم زدن مداوم انجام شد (Remi Magnetic Stirrer, ML). جهت حذف پروتئین های غیر کلاژنی قطعات پوست در محلول سود ۰/۱ مولار با نسبت ۱۰:۱ (وزنی/حجمی) غوطه ور گردید و به مدت ۲ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد بطور مداوم هم زده شد. و هر ۶ ساعت یکبار محلول قلیایی تعویض گردید. در پایان پوست چندین مرتبه توسط آب مقطر سرد شستشو داده شد و pH آب شستشو توسط کاغذ تورنسل اندازه گیری شد. در مرحله بعد برای حذف چربی، پوست در محلول بوتیل الکل ۱۰ درصد با نسبت ۲۰:۱ (وزنی/حجمی) دردمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۲ روز غوطه ور و هر ۶ ساعت محلول تعویض گردید. سپس پوست چندین مرتبه توسط آب مقطر سرد شستشو داده شد. در مرحله بعد پوست در اسید استیک ۰/۵ مولار با نسبت ۱۵:۱ (وزنی/حجمی) به مدت ۳ روز غوطه ور شد. مخلوط پوست و اسید توسط تنظیف دولایه صاف شد و مجدداً روند استخراج پوست باقی مانده تحت شرایط مشابه ادامه داده شد. سپس محلول استخراج شده به محلول حاوی کلاژن از استخراج مرحله اول اضافه شد. در مرحله نهایی کلاژن محلول با اضافه کردن محلول نمک ۲/۶ مولار (NaCl) رسوب داده شد. رسوب حاصل توسط سانتریفیوژ (Sigma 8k) در دمای ۱۲ درجه و دور 18000xg به مدت ۳۰ دقیقه جمع آوری، سپس طی دو مرحله با اضافه کردن آب مقطر و تکرار سانتریفیوژ حذف نمک انجام و توسط خشک کن انجمادی (ALPHA 1-2 LDplus) خشک و دردمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

### ۲-۳- تهیه کلاژن از پوست توسط آنزیم پپسین

پوست باقی مانده از استخراج کلاژن توسط اسید (ASC) با استفاده از روش ماتارو و همکاران (۲۰۱۱) و با کمی تغییر برای استخراج کلاژن توسط پپسین مورد استفاده قرار گرفت [۱۳]. در این مرحله باقی مانده پوست در محلول اسید استیک ۰.۵ مولار با نسبت ۱۵:۱ (وزنی/حجمی) با پپسین مخاط معده خوک (SIGMA/P7000, powder ≥250) Units/mg (Soild) به مقدار ۲۰ u/g غوطه ور شد. استخراج به مدت ۲ روز دردمای ۶ درجه سانتی گراد و باهم زدن مداوم ادامه یافت و مراحل صاف کردن، رسوب دادن و سانتریفیوژ همانند روش ASC انجام شد. رسوب حاصل پس از خشک شدن توسط خشک کن انجمادی (Alpha 12 LDplus) در دمای ۲۰-

درجه سانتی گراد نگهداری شد.

## ۲-۴- تهیه کلاژن هیدرولیز شده از کلاژن

استخراج شده به روش اسیدی و کلاژن

استخراج شده توسط پیسین

## ۲-۴-۱- هیدرولیز کلاژن ASC

جهت هیدرولیز، کلاژن استخراج شده با اسید (ASC) از پوست ماهی هامور معمولی محلول اسید استیک ۰/۵ مولار (pH=۲) تهیه و. سپس پیسین با نسبت ۲۰:۱ (محلول آنزیم/پوست) اضافه و پوست به مدت ۵ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در انتهای زمان هیدرولیز، جهت غیرفعال سازی پیسین، محلول به مدت ۱۰ دقیقه دردمای ۹۰ درجه سانتی گراد در بن ماری نگهداری شد. سپس مخلوط با به مدت ۱۵ دقیقه دردمای ۴ درجه سانتی گراد و دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول حاوی کلاژن هیدرولیز شده جدا و توسط خشک‌کن انجمادی، خشک و دردمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

## ۲-۴-۲- هیدرولیز کلاژن استخراج شده توسط پیسین

(PSC)

تمام مراحل هیدرولیز مانند هیدرولیز کلاژن ASC انجام و در نهایت کلاژن هیدرولیز شده توسط خشک‌کن انجمادی خشک و دردمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

## ۲-۵- میکروسکوپ الکترون روبشی (SEM)

کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده به مدت ۹۰ دقیقه با طلا پوشش دهی و توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy, Phenom prox) مشاهده و تصویربرداری انجام شد.

## ۲-۶- آنالیز طیف سنجی تبدیل فوری طیف

مادون قرمز (FTIR)

به منظور مطالعه و بررسی گروه‌های عاملی کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی هامور و آنالیز طیف مادون قرمز (Fourier-transform infrared spectroscopy)، قرص‌های پتاسیم برمید از کلیه نمونه‌های کلاژن تهیه شد، بدین ترتیب که یک میلی گرم نمونه خشک با ۱۰۰ میلی گرم پتاسیم برمید (KBR) به صورت دیسک فشرده شد و قرص‌های حاصله در سلول های مخصوص دستگاه قرار داده شد

(FTIR, Nicolet 8700) و سپس با استفاده از نرم افزار

OPUS آنالیزهای مربوطه انجام و در نهایت طیف FTIR برای ASC و نمونه هیدرولیز شده در محدوده تقریبی  $\text{cm}^{-1}$  ۴۰۰۰ اسکن و طیف‌های مربوطه تهیه گردید [۱۴].

## ۲-۷- الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید-SDS

(PAGE)<sup>۱</sup>

تکنیک (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) SDS-PAGE بر اساس روش ناجیا و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از دولایه ژل ۴ و ۸ درصد انجام شد [۱۲]. مقدار ۵ میلی گرم از پودر کلاژن استخراج شده در یک میلی لیتر از بافر ۰/۵ TrisHCl مولار در pH=۶/۸ ( به همراه SDS ۵ درصد، گلیسرول ۲۵ درصد و 2-mercaptoethanol (۲ درصد) حل شد. ۲۰ میکرو لیتر از پروتئین حل شده بر روی ژل الکتروفورز و با شدت جریان الکتریکی ۱۵۰ ولت به مدت ۴ ساعت بارگذاری گردید. رنگ آمیزی ژل‌ها بر اساس رنگ امیری نیترا ت نقره انجام شد.

## ۲-۸- فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

قابلیت مهار رادیکال های آزاد توسط کلاژن استخراج شده بر اساس رنگبری (Bleaching) با استفاده از معرف DPPH (hydrazyl 2,2-Diphenylpicryl) و بتا کاروتن به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد [۱۲]. برای این منظور یک میلی لیتر از غلظت های مختلف (۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱) کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده در حلال اتانول تهیه شد سپس ۴ میلی لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۰۰۴ درصد) به هر یک اضافه شد. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه دردمای اتاق و در محلی تاریک انکوبه و در نهایت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت و مهار رادیکال آزاد DPPH توسط فرمول زیر محاسبه گردید.

$$I\% = A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}} \times 100$$

در این فرمول  $A_{\text{blank}}$  جذب کنترل و  $A_{\text{sample}}$  جذب نمونه در نظر گرفته شد. جهت قرائت جذب  $A_{\text{sample}}$  به کووت حاوی دو میلی لیتر آب مقطر محلول های نمونه با غلظت های مختلف اضافه شد. و جهت تعیین  $A_{\text{blank}}$  محلول با همان شیوه محلول نمونه تهیه و به آب مقطر اضافه گردید.

بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) و  $\alpha$ -توکوفرول نیز به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

## ۹-۲- تعیین قدرت کاهندگی (Reducing power)

قدرت کاهندگی کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده بر اساس روش چی و همکاران (2001) اندازه گیری شد [۱۵]. بدین صورت که ابتدا محلول هایی از کلاژن با غلظت های مختلف (0.001, 0.01, 0.1 mg/ml) تهیه و سپس یک میلی لیتر از هر دو محلول کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده، با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ نرمال (pH = ۶) و ۲/۵ میلی لیتر فرسینید پتاسیم ۱ درصد مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه دردمای ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) به نمونه ها اضافه شد و نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت  $3000 \times$  سانتریفیوژ شدند (Sigma 8k). ۲/۵ میلی لیتر از محلول حاصل پس از سانتریفیوژ با دقت برداشته و ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر کلرید فریک ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) اضافه و در نهایت پس از ۱۰ دقیقه جذب محلول حاصل در طول موج ۷۰۰ nm قرائت گردید.

## ۱۰-۲- قابلیت تولید کف

پتانسیل یا قابلیت تولید کف و پایداری آن (Foam stability, Foam capacity, بر اساس روش چی و همکاران (۲۰۱۴) تعیین شد [۱۵]. محلولی از کلاژن (ASC) و کلاژن هیدرولیز شده (ASC<sub>H</sub>) با غلظت ۰/۱ گرم تهیه و دردمای  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  به مدت ۲ دقیقه به هم زدن با سرعت  $16000 \times \text{g}$  با هوا مخلوط شد. سپس حجم کل در دقایق (۳، ۳۰، ۱۰، ۳۰) اندازه گیری و در نهایت گسترش کف بر اساس معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Foam expansion (\%)} = 100 \times \frac{A-B}{B}$$

که در این رابطه A حجم بعد از تولید کف بر حسب (میلی لیتر) و در زمان های مختلف و B حجم قبل از تولید کف بر حسب (میلی لیتر) بوده، در ادامه پایداری کف (FS) پس از گذشت ۱۰ دقیقه اندازه گیری شد.

## ۳- نتایج و بحث

هر دو کلاژن استخراج شده به روش اسیدی و آنزیمی بافت سفید، نرم، اسفنجی و متخلخل را نشان داد.

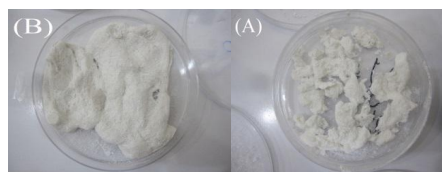
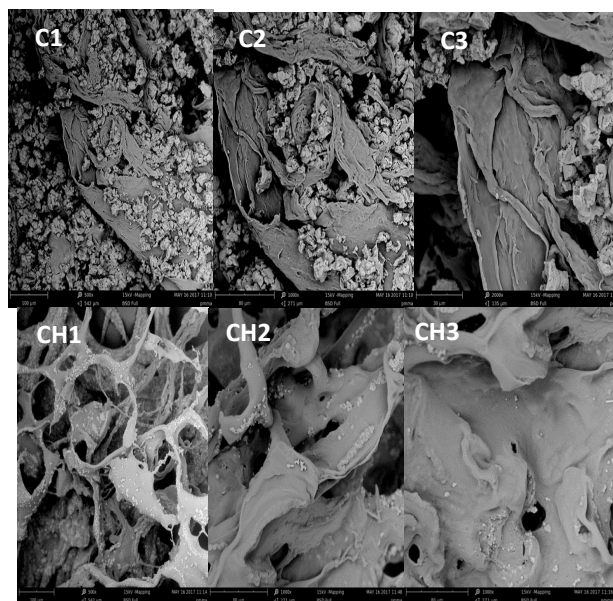


Fig 1 A: Acid soluble collagen (ASC) and B: Pepsin soluble collagen (PSC)

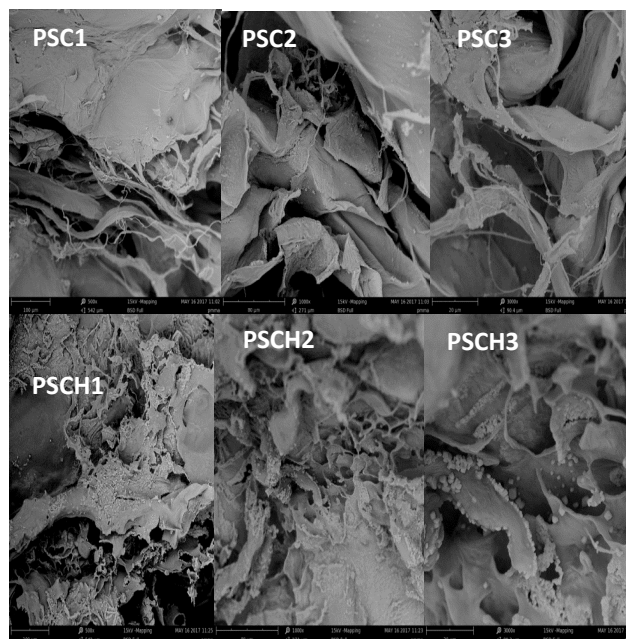
است. بنظر می رسد که چروکیدگی ها می تواند طی فرآیند خشک شدن انجمادی بوجود آمده باشد [۱۳] و در نهایت بنظر می رسد در هر دو نوع کلاژن فرآیند هیدرولیز منجر به تکمیل روند شکستگی و تولید کلاژن با ساختار های با وزن مولکولی کمتر و ایجاد شبکه ای منظم و آزاد شدن شبکه های فیبریلا ر شده باشد. (شکل ۳)، ساختار شبکه ای منظم از ویژگی های مثبت و متمایز کلاژن های دریایی بوده، در صنعت غذا و دارو جهت انتقال مولکول های دارویی، ترکیبات زیست فعال و ریز مغزی ها مورد توجه و استفاده وسیع و روز افزون قرار گرفته است. ساختار منظم در این کلاژن ها بستری مناسب جهت استقرار سایر ترکیبات و همچنین حفظ و یکنواختی فرآیند تبخیر در مایعات می گردد.

## ۳-۱- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

در تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) مربوط به کلاژن استخراج شده به دو روش اسیدی (ASC) و آنزیمی (PSC) از پوست ماهی هامور (شکل ۲) و کلاژن هیدرولیز شده به دو روش اسیدی و آنزیمی، صفحات بتا و رشته های مارپیچی کلاژن بخوبی دیده می شود. هر چند در کلاژن استخراج شده به روش آنزیمی (PSC) در مقایسه با کلاژن استخراج شده به روش اسیدی (ASC) ساختار شبکه ای و ماتریکس منظم تر با منافذ حباب مانند را نشان داد و این در حالی است که در کلاژن استخراج شده به روش اسیدی ساختار صفحه ای منظم، متراکم، روی هم خوابیده، با سطح چروکیده قابل مشاهده



**Fig 2** Scanning Electron Microscopic (SEM) images of acid soluble collagen(C) and collagen Hydrolysate (CH) extracted from the skin of *Epinephelus coioides* ) with magnifications of  $\times 500$ (1),  $\times 1000$ (2),  $\times 2000$ (3)



**Fig 3** Scanning Electron Microscopic (SEM) images of pepsin soluble collagen(PSC) and collagen Hydrolysate (PSCH) extracted from the skin of *Epinephelus coioides* ) with magnifications of  $\times 500$ (1),  $\times 1000$ (2),  $\times 2000$ (3)

در تحقیقی که توسط لی و همکاران (2007) در مورد پوست گربه ماهی انجام شد مشخص شد که پوست این ماهی بعد از خشک کردن انجمادی مانند پوست ماهی هامور ساختار شبکه‌ای منظمی را نشان می‌دهد [۱۶]. همچنین در تحقیقی دیگر چی و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که کلاژن به‌دست‌آمده به روش ASC از پوست ماهی اسپانیش ماکرل نیز مانند پوست ماهی هامور ساختاری ورقه‌ای و یکپارچه اما با ورقه‌های قطور و سنگین با طول حدود ۱۰۰ میکرون (دو برابر طول صفحات بتا در اسپانیش ماکرل) نشان داده، همچنین پس از هیدرولیز توسط پپسین، کلاژن هیدرولیز شده حاصل از پوست و استخوان اسپانیش ماکرل به قطعات کوچکتر تبدیل و بدنیال تبخیر مایع، بافتی سست، نرم و مانند کلاژن هیدرولیز شده PSC حاصل از پوست ماهی هامور ساختار حفره‌ای، یک شکل، منظم با قطر نازک تر صفحات بتا با طول حدود ۲۵ میکرون نشان داده است، همچنین، اندازه منافذ در بافت اسفنجی کلاژن با افزایش مقدار آب طی آماده‌سازی افزایش نشان داد [۱۵].

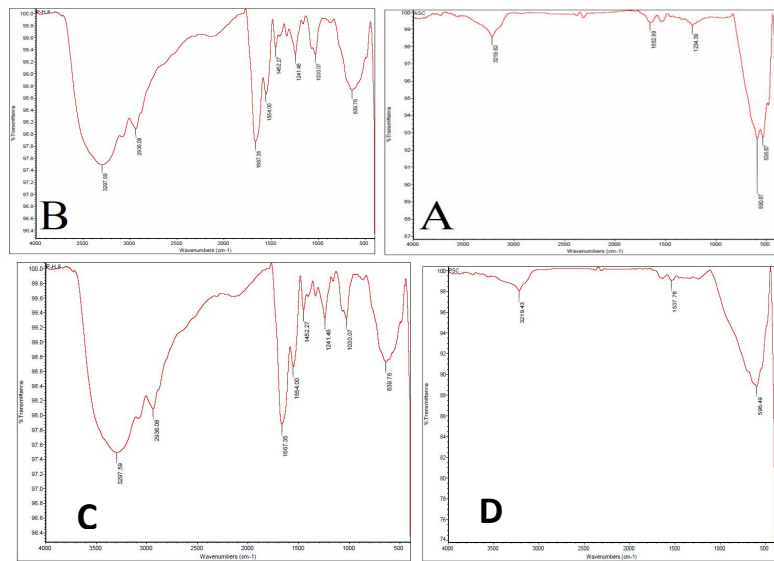
### ۳-۲- مقایسه FTIR در کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی هامور

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود در طیف‌های FTIR مربوط به کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده باند شاخص پیوندهای آمیدی A که نشان‌دهنده ارتعاشات کششی پیوند های آزاد N-H آمینواسیدها در ساختار پلی پپتیدی کلاژن است در فرکانس  $3219\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شد. همچنین تعداد کثیری از گروه‌های N-H در کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده حاصل از پوست ماهی هامور، درگیر پیوند های هیدروژنی هستند، زیرا بر اساس گزارش دوبل (۱۹۷۵) ارتعاش کششی پیوند های آزاد N-H معمولاً در محدوده  $3440-3400\text{ cm}^{-1}$  ظاهر می‌شود [۱۷] و هرچه گروه‌های NH بیشتری در پپتید درگیر باندهای هیدروژنی شوند به فرکانس پایین‌تری منتقل می‌شوند. از سوی دیگر در طیف FTIR کلاژن استخراج‌شده با اسید (ASC) از پوست ماهی هامور یک پیک ضعیف و ادغام‌شده در پیک آمید A در فرکانس  $3000\text{ cm}^{-1}$  قابل تشخیص است که نشان‌دهنده پیوند های آمیدی B و کشش‌های نامتقارن در اطراف زنجیره  $\text{CH}_2$  است. در طیف FTIR کلاژن پیک سوم در ناحیه  $1652\text{ cm}^{-1}$  مشاهده شد که نشان‌دهنده پیوند های پیوندهای آمید I و به

عبارتی طیف شاخص در شناسایی ساختمان دوم پروتئین‌ها است و معمولاً در محدوده  $1700-1600\text{ cm}^{-1}$  ظاهر می‌شود. باند آمید I مربوط به ارتعاشات کششی گروه کربونیل (پیوند  $\text{C=O}$ ) در اطراف محور اصلی و یک شاخص و مارکر حساس و نشان‌دهنده وضعیت ساختمان دوم پلی پپتید کلاژن است [۱۸]. کلاژن پوست ماهی هامور در مقایسه با کلاژن دیالیز شده پوست گوساله ( $1633\text{ cm}^{-1}$ ) عدد موج کمتری را در محدوده آمید I نشان داد که نشان‌دهنده میزان بیشتر پیوند های هیدروژنی در گیر در پیوندهای آمید I می‌باشد [۳۰]. در طیف FTIR کلاژن استخراج‌شده از پوست ماهی هامور باند آمید II در محدوده  $1537\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شد و این در حالی است که کمترین عدد موج آمید II در کلاژن پوست گوساله در محدوده  $1545\text{ cm}^{-1}$  مشخص گردیده است. لذا در مقایسه کلاژن پوست گوساله و ماهی هامور مشخص گردید که N-H در کلاژن پوست گوساله، بیشتر درگیر باندهای  $\alpha\text{-chains}$  پروتئین های مجاور بوده لذا کلاژن ماهی هامور خلوص بالاتری نسبت به کلاژن پوست گوساله و سایر گونه های ماهیان نشان می‌دهد [۱۹]. آمید III در طیف کلاژن پوست هامور در فرکانس  $1243\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شد. پیوندهای آمید III نشان دهنده ترکیب کشش های ارتعاشی C-N و تغییر شکل N-H به‌واسطه پیوند آمیدی و همچنین تحت تاثیر جاذبه ناشی از نوسان ارتعاشات گروه  $\text{CH}_2$  در گلايسين، پرولين و در زنجیره اصلی کلاژن با زنجیره‌های جانبی ظاهر می‌شوند [۱۹، ۲۰]. بعلاوه، ضریب میزان جذب پیوندهای آمید II و III در کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده پوست ماهی هامور حدود I به دست آمد و نشان داده شد که ساختار فضایی مارپیچی سه‌گانه در طی فرآیند استخراج بخوبی محافظت شده است. در طیف باندهای کلاژن باند آمید III آزاد نشده و به‌صورت ادغام با ساختار اسکلتی در طیف FTIR دیده شد. بعلاوه باندهایی در محدوده  $590-536\text{ cm}^{-1}$  نیز نشان داده شد که مربوط به کشش های اسکلتی گروه های غیرعاملی است. همچنین برای هر دو نوع کلاژن (ASC, PSC) از پوست اسپانیش ماکرل آمید B در محدوده  $3081\text{ cm}^{-1}$  و  $2926\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شد [۱۵]. درحالی‌که در مطالعه انجام‌شده روی کلاژن هیدرولیز شده از پوست ماهی هامور فقط یک طیف قوی در محدوده  $2900\text{ cm}^{-1}$  و در ساختار کلاژن، آمید B به‌صورت یک پیک ضعیف در محدوده  $\text{cm}^{-1}$

از هیدرولیز تمام پیوندها و گروه های آمیدی در دیاگرام ظاهر شدند.

۳۱۰۰ ظاهر شد. در مجموع بر خلاف کلاژن استخراج شده از سایر ماهیان، در طیف FTIR گروه ها و پیوندهای آمیدی کلاژن ماهی هامور پیک های شاخصی نشان نداده و تنها پس

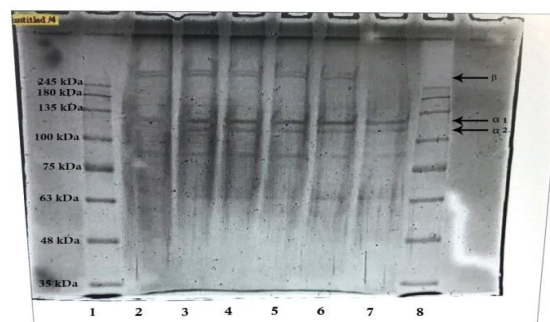


**Fig 4** Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra of acid soluble A) collagen and B) acid soluble Collagen Hydrolysate, and (FTIR) spectra of pepsine soluble C) collagen and D) pepsine soluble Collagen Hydrolysate.

زنجیره  $\beta$  را به دوز زنجیره  $\alpha$  تبدیل می کند، در نتیجه در  $PSC_H$  ترکیباتی با وزن مولکولی بالا عملاً وجود ندارد [۲۱ و ۲۲]. در کلاژن، اتصالات عرضی با وزن مولکولی بالا با افزایش سن جانور افزایش پیدا می کند [۲۳] و این اتصالات عرضی در ماهی های گرسنه بیشتر از ماهی های با تغذیه مناسب است. در مطالعه ای که Jeong و همکاران (2013) روی الگوی الکتروفورز کلاژن ASC و  $PSC_H$  استخوان ماهی تن زرد باله (*Thunnus obesus*) انجام دادند دوز زنجیره متفاوت  $\alpha$  ( $\alpha_1$  و  $\alpha_2$ )، اتصالات عرضی بتا و  $\gamma$  را در هردو نوع کلاژن مشاهده کردند؛ که اتصالات عرضی درون و بین مولکولی و قطعات  $\gamma$  و  $\alpha$  در کلاژن ASC بیشتر از کلاژن  $PSC_H$  بود. علاوه بر این، در پوست ماهی هامور کلاژن ASC متفاوت با کلاژن  $PSC_H$  یک باند مشخص  $\alpha_3$  با وزن مولکولی ۱۲۰۰ کیلو دالتون بین زنجیره های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  به دست نشان داد [۲۴].

### ۳-۳ الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید-SDS (PAGE)

الگوی الکتروفورز مربوط به کلاژن استخراج شده به روش اسیدی (ASC) و آنزیمی ( $PSC_H$ ) از پوست ماهی هامور و نمونه های هیدرولیز شده ی آن ها ( $ASC_H$ ,  $PSC_H$ ) در شکل ۵ نشان داده شده است. کلاژن ASC و  $PSC_H$  دارای دوز زنجیره  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) با وزن مولکولی حدود ۱۱۵-۱۲۵ کیلو دالتون و اجزایی با وزن مولکولی بالا از جمله  $\beta$  است. همچنین ضخامت باند زنجیره های  $\alpha_2$  تقریباً دو برابر زنجیره های  $\alpha_1$  بدست آمد. در این تحقیق اگر چه تفاوتی بین الگوهای الکتروفورزی ASC و  $PSC_H$  مشاهده نشد اما در نمونه ی  $PSC_H$  پس از فرایند هیدرولیز توسط پپسین در pH حدود ۲/۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت، باندهای زنجیره  $\beta$  و ترکیباتی با وزن مولکولی بالا کاملاً ناپدید شدند زیرا پپسین اتصالات عرضی تلویپتید را تفکیک و هم زمان

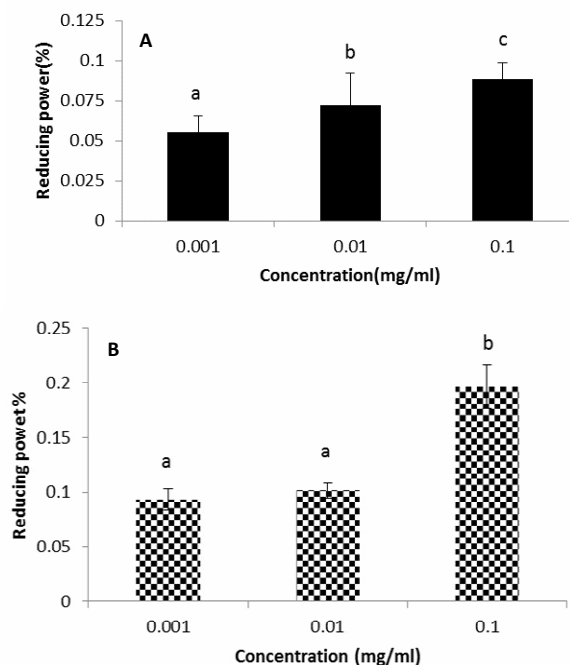


**Fig 5** SDS-PAGE of extracted collagen from the skin of *epinephelus coioides*. Lane 1 & 8: High molecular weight/protein markers; Lane 2: ASC; Lane3: PSC; Lane4, 5: ASC Hydrolysate; Lane 6, 7: PSC Hydrolysate.

هامور در مقایسه با کلاژن استخراج شده به روش اسیدی پتانسیل و قدرت احیا کنندگی بالاتری نشان داد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که قدرت احیا کنندگی در پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی هامور (ASC<sub>H</sub>) (شکل B ۶) در مقایسه با کلاژن ۵۰٪ بیشتر است (شکل ۶A).

### ۳-۴- قدرت کاهش دگی (Reducing power)

در این تحقیق مشخص گردید که کلاژن ASC و کلاژن هیدرولیز شده و استخراج شده از پوست ماهی هامور، حاوی مولکول های اهداکننده الکترون بوده و توانایی مهار رادیکال های آزاد را دارند و نمونه هیدرولیز شده پوست ماهی



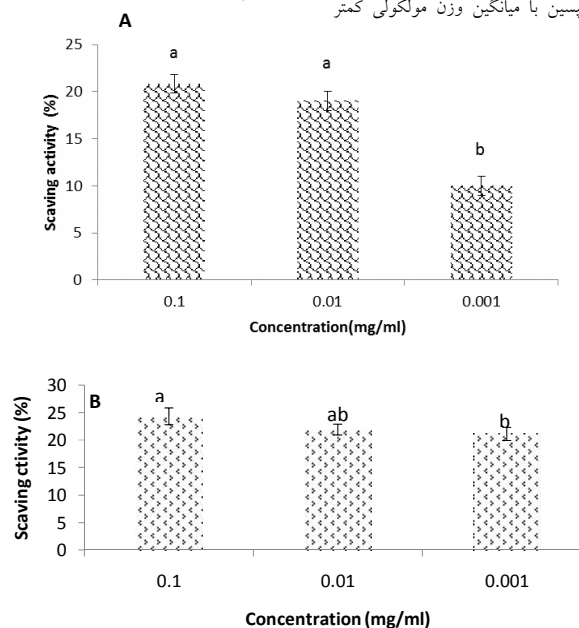
**Fig 6** Reducing powers of collagen hydrolysate (A) and reducing powers of acid soluble collagen (B), exated from the skin of *Epinephelus coioides* at different concentrations.

قابلیت بیشتری در مهار ر دارد. ادیکال های آزاد دارد. علاوه براین، پروتئین هیدرولیز شده شامل پپتیدهای اهداکننده الکترون بوده که می تواند با رادیکال واکنش داده و ترکیبات پایداری تولید کند و منجر به ختم واکنش های زنجیره ای رادیکال شود. در تحقیقی که توسط کیم و همکاران (۲۰۱۱) بر روی پروتئین هیدرولیز شده ماهی حلوی زرد باله (yellowfin sole) و عضله ماهی پینک پرچ (Pinck pearch) انجام شد دریافتند که نمونه های هیدرولیز شده توسط پیسین قدرت مهارکنندگی بیشتری بر روی رادیکال DPPH نسبت به سایر هیدرولیزها دارند [۲۵-۲۷]. همچنین با توجه به اینکه قابلیت جذب پایین تر نشان دهنده مهار بیشتر رادیکال های آزاد است، میزان بازدارندگی رادیکال DPPH در دو نمونه کلاژن (ASC) و کلاژن هیدرولیز شده ی (ASC<sub>H</sub>) پوست ماهی هامور، با افزایش غلظت، افزایش نشان داد، به طوری که نمونه با غلظت ۰/۱ (میلی گرم بر میلی لیتر) کمترین میزان جذب و بالاترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و لذا بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی را نشان داد.

که این امر می تواند ناشی از وجود حضور پروتئین هایی با وزن مولکولی کمتر زنجیره های کوتاه تر و پپتیدهای زیست فعال بیشتر بوده، این مولکولها قادرند به عنوان اهداکننده هیدروژن (الکتون) عمل نموده ؛ با رادیکال های آزاد واکنش و آن ها را به محصولات پایدارتری تبدیل کنند، در نتیجه باعث قطع واکنش زنجیره ای رادیکالی می شوند. در ارزیابی قدرت مربوط به کلاژن استخراج شده به روش اسیدی (ASC) و کلاژن هیدرولیز شده (ASC<sub>H</sub>) از پوست ماهی هامور با غلظت های (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱) (شکل ۶)، بیشترین قدرت کاهندگی در هر دو نمونه در غلظت ۱/۰ مشاهده شد. و مشخص گردید که با افزایش غلظت در هر دو نمونه ASC و ASC<sub>H</sub> قدرت کاهندگی افزایش میابد. پاره ای تحقیقات نیز نشان داده است یک رابطه ی معکوس بین وزن مولکولی، فعالیت های آنتی اکسیدانی و قدرت احیا کنندگی وجود دارد [۲۵].

### ۳-۵- فعالیت مهار رادیکال DPPH

نتایج آزمون مهار رادیکال های آزاد DPPH نشان داد نمونه هیدرولیز شده توسط پیسین با میانگین وزن مولکولی کمتر



**Fig 7** DPPH Scavenging Activity of collagen hydrolysate (A) and the Scavenging Activity of acid soluble collagen (B) extracted from the skin of *epinephelus coioides*.

## ۳-۵- پتانسیل (ظرفیت) تولید کف

تشکیل کف توسط سه فاکتور عبور، نفوذ و بازآرایی مولکول‌ها در سطح مشترک آب‌وهوا کنترل می‌شود. برای تشکیل کف، مولکول‌های پروتئین باید به سرعت بین سطح مشترک آب‌وهوا مهاجرت کرده و بازآرایی شوند [۲۸]. در نقطه ایزو الکتریک هم‌زمان با کاهش حلالیت ویژگیها و پایداری کف نیز کاهش پیدا می‌کند [۲۹]. پروتئین‌هایی که وزن مولکولی بالایی دارند، دارای پلی پپتیدهای بزرگی هستند که با افزایش ثبات فیلم هنگام تولید حباب‌های هوا پایداری کف را افزایش می‌دهند. کاهش ثبات کف زمانی رخ می‌دهد که پپتیدهای میکروسکوپی دیگر توانایی حفاظت از پایداری کف را نداشته باشند [۳۰]. همچنین پایداری کف با افزایش دامنه انعطاف پروتئین، ویسکوزیته در فاز آبی، غلظت پروتئین و ضخامت فیلم افزایش پیدا می‌کند [۳۱]. pH نیز به طور قابل ملاحظه‌ای بر خواص کف و بویژه پایداری آن تأثیر می‌گذارد [۳۲]. ظرفیت تولید کف مربوط به کلاژن استخراج شده به روش اسیدی (ASC) از پوست ماهی هامور در زمان‌های (۰،۳،۱۰،۳۰) دقیقه و با غلظت (۰/۱) در شکل ۸ نشان

داده شده است. در این آزمایش خواص کف در پروتئین و نمونه کلاژن هیدرولیز شده با اندازه‌گیری حجم پس از اختلاط در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و توان تولید کف و پایداری آن در زمان صفر و در طول ۱۰ دقیقه تعیین شد. در نهایت مشخص گردید که پروتئین هیدرولیز شده قابلیت تولید کف ندارد. اما کلاژن بتدریج با گذشت از زمان صفر در زمان ۳ دقیقه، بیشترین قابلیت گسترش کف را نشان داد و پایداری و قابلیت گسترش کف به تدریج پس از گذشت ۳ دقیقه کاهش نشان داد. لی و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که نمونه‌ها و پروتئین‌های با میانگین وزن مولکولی بالا باعث افزایش پتانسیل تولید کف می‌شوند. همچنین نشان دادند که ظرفیت و پایداری کف ارتباط مستقیمی با لگاریتم میانگین وزن مولکولی در زمان‌های مختلف دارد [۳۲]. نتایج تحقیقات بر روی پتانسیل تولید کف توسط کلاژن ماهی کفشک زرد و پروتئین‌های ماهیچه ماهی پینک پرچ نشان داد که pH به طور قابل توجهی بر پایداری کف تأثیر می‌گذارد و نیز پتانسیل تولید کف در ماهی پینک پرچ با کاهش حلالیت در نقطه ایزو الکتریک، کاهش نشان داد [۳۳ و ۳۴].

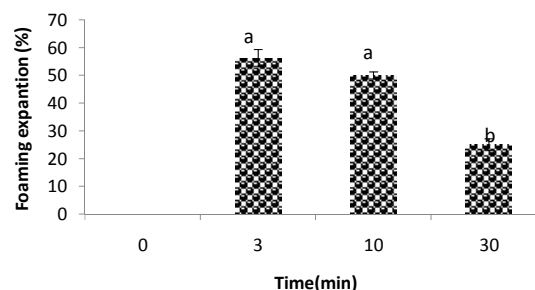


Fig 8 Foam extension of Acid soluble collagen (ASC)

## ۴- نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر خواص اتی اکسیدانی و عملکردی کلاژن استخراج شده از پوست ماهی هامور به دو روش اسیدی و آنزیمی و نمونه‌های هیدرولیز شده آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر میکروسکوپ الکترونی حضور فیبرهای کلاژن در هر چهار نمونه را تأیید کرد. نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوری مادون قرمز حضور گروه‌های عاملی و پیوند‌های آمید های A و B، امیدهای I، II، III را در کلاژن و با بالاترین تنوع و

میزان در کلاژن هیدرولیز شده نشان داد و در نهایت ساختار مارپیچ سه گانه را به اثبات رساند. همچنین بررسی الگوی الکتروفورزی نیز وجود دوزنجیره  $\alpha(\alpha 1, \alpha 2)$  و زنجیره  $\beta$  را هر سه نمونه کلاژن تأیید کرد اما در PSC زنجیره  $\beta$  و ترکیباتی با وزن مولکولی بالا ناپدید شدند. علاوه بر این نمونه‌هایی با وزن مولکولی کمتر قدرت احیاء کنندگی بیشتری را به نمایش گذاشتند. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر مشخص نمود که خاصیت بازدارندگی رادیکال DPPH با افزایش غلظت در کلاژن و کلاژن هیدرولیز شده افزایش یافته

- research international. 2003 Jan 1;36(9-10):949-57.
- [9] Vázquez JA, Sotelo CG, Sanz N, Pérez-Martín RI, Rodríguez-Amado I, Valcarcel J. Valorization of aquaculture by-products of salmonids to produce enzymatic hydrolysates: Process optimization, chemical characterization and evaluation of bioactives. *Marine drugs*. 2019 Dec;17(12):676.
- [10] Wang L, Liang Q, Chen T, Wang Z, Xu J, Ma H. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocolloids*. 2014 Jul 1;38:104-9.
- [11] Lin CC, Chiou TK, Sung WC. Characteristics of gelatin from giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) skin. *International Journal of Food Properties*. 2015 Nov 2;18(11):2339-48.
- [12] Najafian L, Babji AS. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides*. 2012 Jan 1;33(1):178-85.
- [13] Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T, Encarnacion AB, Kishimura H. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food chemistry*. 2011 Dec 1;129(3):1179-86.
- [14] Kong J, YU S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structure. *Acta biochimica et biophysica sinica*. 2007; 39(8): 549-559.
- [15] Chi CF, Cao ZH, Wang B, Hu FY, Li ZR, Zhang B. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*. 2014 Aug;19(8):11211-30.
- [16] Liu H, Li D, Guo S. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Chemistry*. 2007 Jan 1;101(2):621-5.
- [17] Doyle BB, Bendit EG, Blout ER. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. 1975 May;14(5):937-57.
- [18] Bandekar J. Amide modes and protein conformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1992 Apr 8;1120(2):123-43.
- [19] Payne KJ, Veis A. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin

است. و لذا با توجه به راندمان بالای استخراج کلاژن، کلاژن هیدرولیز و استخراج شده از پوست ماهی آمور (حدود ۷۰٪ وزن پوست) با خواص آنتی اکسیدانی مطلوب، و ویژگیهای عملکردی مناسب میتواند در مقیاس انبوه تولید و به عنوان یک ترکیب زیست فعال در غنی سازی فرآورده های لبنی [۳۵]، انواع نوشیدنی ها از جمله پودر نوشیدنی های آماده برای مصرف از جمله چای [۳۶] و امولسیفایر در صنعت غذا [۶] مورد استفاده قرار گیرد.

## ۵- منابع

- [1] Shahidi F, editor. Maximising the value of marine by-products. Woodhead Publishing; 2006 Nov 30. [2] Aberoumand A. Comparative study between different methods of collagen extraction from fish and its properties. *World Applied Sciences Journal*. 2012;16(3):316-9.
- [3] Zhang Z, Li G, Shi BI. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal-society of leather technologists and chemists*. 2006 Jan 1;90(1):23.
- [4] Shahidi F. Seafood processing by-products. In: *Seafoods: chemistry, processing technology and quality 1994* (pp. 320-334). Springer, Boston, MA.
- [5] Devita L, Nurilmala M, Lioe HN, Suhartono MT. Chemical and Antioxidant Characteristics of Skin-Derived Collagen Obtained by Acid-Enzymatic Hydrolysis of Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*). *Marine Drugs*. 2021 Apr;19(4):222.
- [6] Gao R, Yu Q, Shen Y, Chu Q, Ge C, Fen S, Yang M, Yuan L, McClements DJ, Sun Q. Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science & Technology*. 2021 Feb 24.
- [7] Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero MA, Montero MP. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food hydrocolloids*. 2011 Dec 1;25(8):1813-27.
- [8] Wu HC, Chen HM, Shiau CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food*

- [28] Damodaran S. Protein-stabilized foams and emulsions. In Food proteins and their applications 2017 Oct 19 (pp. 57-110). CRC Press.
- [29] Townsend AA, Nakai S. Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *Journal of Food Science*. 1983 Mar;48(2):588-94.
- [30] Souissi N, Bougatef A, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food technology and Biotechnology*. 2007 Jun 4;45(2):187-94.
- [31] Imeson AP. Thickening and gelling agents for food. Springer Science & Business Media; 2012 Dec 6.
- [32] Li Z, Wang B, Chi C, Gong Y, Luo H, Ding G. Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*. *Food Research International*. 2013 Apr 1;51(1):283-93.
- [33] Naqash SY, Nazeer RA. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. *Journal of Food Science and Technology*. 2013 Oct;50(5):972-8.
- [34] Gao R, Yu Q, Shen Y, Chu Q, Ge C, Fen S, Yang M, Yuan L, McClements DJ, Sun Q. Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science & Technology*. 2021 Feb 24.
- [35] Lima KO, da Rocha M, Alemán A, López-Caballero ME, Tovar CA, Gómez-Guillén MC, Montero P, Prentice C. Yogurt Fortification by the Addition of Microencapsulated Stripped Weakfish (*Cynoscion guatucupa*) Protein Hydrolysate. *Antioxidants*. 2021 Oct;10(10):1567.
- [36] Sae-leaw T, Aluko RE, Chantakun K, Benjakul S. Physicochemical, Antioxidant and Sensory Properties of Ready-to-drink Chrysanthemum Tea Fortified with Hydrolyzed Collagen from Salmon Scale Ossein. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2021 Oct 21;30(9):1159-72.
- solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. 1988 Nov;27(11):1749-60.
- [20] Jackson M, Watson PH, Halliday WC, Mantsch HH. Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1995 Jan 25;1270(1):1-6.
- [21] Cao H, Shi FX, Xu F, Yu JS. Molecular structure and physicochemical properties of pepsin-solubilized type II collagen from the chick sternal cartilage. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2013 Jun 1;17:1427-37.
- [22] Guzzi Plepis AM, Goissis G, Das-Gupta DK. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polymer Engineering & Science*. 1996 Dec;36(24):2932-8.
- [23] Matsui R, Ishida M, Kimura S. 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*. 1991 Jan 1;99(1):171-4.
- [24] Jeong HS, Venkatesan J, Kim SK. Isolation and characterization of collagen from marine fish (*Thunnus obesus*). *Biotechnology and bioprocess engineering*. 2013 Nov 1;18(6):1185-91.
- [25] Kim JS, Kim JG, Cho SY, Ha JH, Lee EH. Characteristics of the yellowfin sole and dover sole skins as processing material of gelatin. *Applied Biological Chemistry*. 1993;36(4):290-5.
- [26] Sato K, Ebihara T, Adachi E, Kawashima S, Hattori S, Irie S. Possible involvement of aminotripeptide in self-assembly and thermal stability of collagen I as revealed by its removal with proteases. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Aug 18;275(33):25870-5.
- [27] Wang Q, Li W, He Y, Ren D, Kow F, Song L, Yu X. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*). *Food Chemistry*. 2014 Feb 15;145:991-6.



## Antioxidant and functional properties of collagen and collagen hydrolysate from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) skin

Mousavi Nadushan, R. <sup>1\*</sup>, Askari, F. <sup>2</sup>

1. Associate Professor, Department of food science and technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. MSc., Department of food science and technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2020/ 05/ 04

Accepted 2022/ 02/ 24

#### Keywords:

Collagen,  
skin,  
Epinephelus coioides,  
Antioxidant properties,  
functional properties,  
Collagen Hydrolysate.

DOI: 10.22034/FSCF.19.126.387

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.2.3

\*Corresponding Author E-Mail:  
[mousavi.nadushan@gmail.com](mailto:mousavi.nadushan@gmail.com)

### ABSTRACT

Collagen is the most abundant protein of animal origin and the most important compound in the connective tissue which is widely used in the food and beverage industry. In addition, recent research has demonstrated the functional, beneficial, and potential properties of collagen extracted from aquatic wastes as nutraceuticals and for delivery systems of sensitive bioactive compounds. Therefore, the aim of this research was considered to study the structural characters, antioxidant and functional properties of collagen and collagen hydrolysate extracted from the skin of common grouper (*Epinephelus coioides*). In the present experimental study, the collagen sample was extracted by acid and enzymatic method and structural characters were studied by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy, Scanning Electron Microscope (SEM) and polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). DPPH radical scavenging, reducing Power and foam producing capacity also assessed. The results of Scanning Electron Microscope confirmed schistose structure, filamentous network, secondary and third structure, and the good interconnection and uniform porous matrix was noticed. The typical characters for type I collagen, including five peaks (amide A, amide B, amide I, amide II and amide III) are observed in the spectrogram of collagen and collagen hydrolysate, also the preserved triple-helical structure were confirmed. The results of the functional properties and antioxidant activity of collagen from orange-spotted grouper skin also showed that with increasing the concentration, reducing power and DPPH radical scavenging ability increased. Comparing collagen and hydrolyzed sample, the foam producing capacity was proved just for collagen. Finally, it can be said that collagen and hydrolyzed collagen extracted from the skin of orange-spotted grouper with suitable antioxidant properties, and appropriate functional properties can be mass-produced as a bioactive compound and as emulsifier may be used in the food industry and in the production of Functional foods.