

••••• Piśmiennictwo

[1] Sloviková A., Vojtová L., Jančař J., Preparation and modification of collagen-based porous scaffold for tissue engineering. *Chemical Papers* (2008), 62, 417–422.

[2] Teng S.H., Lee E.J., Wang P., Kim H.E., Collagen/hydroxyapatite composite nanofibers by electrospinning. *Materials Letters* (2008), 62, 3055–3058.

References

[3] Gelinsky, M., Welzel, P.B., Simon, P., Bernhardt, A., König, U. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone *Chemical Engineering Journal* (2008), 137, 84–96.

[4] Shen X., Chen L., Cai X., Tong T., Tong H., Hu J., A novel method for the fabrication of homogeneous hydroxyapatite/collagen nanocomposite and nanocomposite scaffold with hierarchical porosity *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2011), 22, 299–305

WŁAŚCIWOŚCI KOLAGENU WYIZOLOWANEGO Z ŁUSEK RYB Z GATUNKU *ESOX LUCIUS*

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU,
WYDZIAŁ CHEMII, ZESPÓŁ BIOPOLIMERÓW,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA
E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 24-26*]

Wprowadzenie

Kolagen jest białkiem występującym w organizmach zwierzęcych, szeroko stosowanym w przemyśle medycznym i farmaceutycznym. Jednak wysoki koszt tego białka znacznie ogranicza możliwości jego zastosowania. Obecnie głównymi źródłami pozyskiwania kolagenu typu I są skóry bydłace i świńskie. Jednak, na skutek wystąpienia u bydła zwyrodnienia gąbczastego (BSE) oraz innych zakaźnych encefalopatii gąbczastych (TSE), a także pryszczycy (FMD) u świń i bydła, surowce rzeźne są już mniej atrakcyjnym źródłem tego białka. Kolagen typu I można również wyizolować ze skór, kości, płetw czy łusek ryb. Ryby spożywane są codziennie na całym świecie w dużych ilościach. Ponad 30% rybich odpadów to skóry, łuski i kości, które są bogatym źródłem kolagenu. Dlatego odpady rybne mogą być alternatywnym, bezpiecznym źródłem kolagenu, stąd też nastąpił wzrost zainteresowania i badań naukowych w tej dziedzinie.

W pracy przedstawiono metodykę i właściwości kolagenu wyizolowanego z łusek ryb z gatunku *Esox lucius*. Jest to ryba słodkowodna, występująca w krajach o umiarkowanym klimacie.

Metodyka

Kolagen wyizolowano z łusek rybich, poprzez demineralizację oraz rozpuszczenie w kwasie octowym. Za pomocą spektrometru rentgenowskiego (EDX) oznaczono zawartości pierwiastków w łusce i potwierdzono całkowite rozpuszczenie fosforanu wapnia. Wykonano widmo FTIR filmu kolagenowego oraz przeprowadzono analizę składu aminokwasowego. Temperaturę denaturacji kolagenu wyznaczono

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN FROM FISH (*ESOX LUCIUS*) SCALE

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, TORUN ,
FACULTY OF CHEMISTRY, BIOPOLYMER RESEARCH GROUP,
7 GAGARINA STR., 87-100 TORUN, POLAND
E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 24-26*]

Introduction

Collagen is the most abundant protein found in animal body and widely used for biomedical and pharmaceutical applications. However, its applicability is severely limited due to high cost. At present, the main sources of type I collagen are bovine or porcine dermis. However, due to outbreak of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE), Foot and Mouth Disease (FMD) in pigs, cattle, use of collagen and collagen derived products from these sources have been limited. Type I collagen has also been extracted from skin, bone, fins, and scales of fresh water and marine fishes. In various parts of the world, different fish species are being consumed daily in large quantities. More than 30% of fish processing wastes consist of skin, scale and bone, which are very rich in collagen. Thus, fish processing wastes may be alternative collagen sources and these underutilized resources have attracted the increasing attention of scientists all over the world.

In the present study, collagen was isolated from scales of *Esox lucius*. This fish is found in fresh water of temperate countries.

Materials and methods

Collagen was isolated from fish scale, a calcified tissue, through demineralization following acetic acid treatment. Energy dispersive X-ray (EDX) analysis of demineralized scale was carried out for quantitative estimation of inorganic content. The isolated and purified collagen was characterized by FTIR and amino acid analysis. The denaturation

wiskozymetrycznie, przeprowadzając pomiar lepkości w różnych temperaturach. Lepkość w każdej temperaturze pomiaru wyznaczono z następującej zależności:

$$\text{lepkość} = (\eta_{\text{sp}}(T^{\circ}\text{C}) - \eta_{\text{sp}}(40^{\circ}\text{C})) / (\eta_{\text{sp}}(10^{\circ}\text{C}) - \eta_{\text{sp}}(40^{\circ}\text{C}))$$

gdzie η_{sp} oznacza lepkość właściwą obliczoną ze wzoru:

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

(t i t_0 oznaczają odpowiednio: czas wypływu z kapilary roztworu kolagenu oraz rozpuszczalnika).

Wyniki i dyskusja

Wyniki analizy EDX świeżej łuski oraz łuski po demineralizacji przedstawiono w TABELI 1.

TABELA 2. Skład aminokwasowy kolagenu wyrażony w nanomolach poszczególnych aminokwasów w przeliczeniu na 50 μg białka pobranego do analizy.
TABLE 2. Amino acid composition of collagen (nmol of amino acid in 50 μg of collagen).

Amino Acid	
Asparagine + Aspartic Acid	17.03
Glutamine + Glutamic Acid	31.56
Hydroxyproline	28.44
Serine	13.85
Glycine	129.84
Histidine	4.18
Arginine	20.49
Threonine	11.29
Alanine	45.48
Proline	46.17
Tyrosine	1.86
Valine	7.09
Methionine	4.19
Isoleucine	3.69
Leucine	7.67
Phenylalanine	6.65
Lysine	9.79

Analiza EDX potwierdza, iż po 48h traktowania łusek roztworem EDTA następuje całkowita ich demineralizacja. W TABELI 2 przedstawiono skład aminokwasowy kolagenu rybiego.

W kolagenie rybim stwierdzono obecność iminokwasów w następującej ilości: 46,17 prolina i 28,44 hydroksyproliny. Zawartość prolina i hydroksyproliny w kolagenie wpływa na stabilność termiczną i temperaturę denaturacji kolagenu. Nie stwierdzono obecności cysteiny.

Widmo IR filmu kolagenowego przedstawiono na RYSUNKU 1. Zarejestrowano pasma typowe dla kolagenu: pasmo amidowe A występuje przy liczbie falowej 3327 cm^{-1} , pasmo amidowe B przy 3085 cm^{-1} , amid I przy 1658 cm^{-1} , a amid II przy 1554 cm^{-1} .

Tabela 1. Analiza EDX świeżej łuski oraz łuski po 48 h traktowania roztworem EDTA).

Table 1. EDX analysis for raw scale and demineralized scale after 48 h of EDTA treatment.

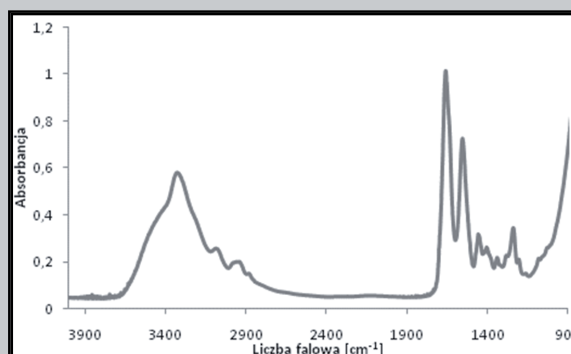
Pierwiastek Element	Procent masowy zawartości pierwiastków w łuskach [%] Mass percent (%)	
	przed demineralizacją Raw scale	po 48h traktowania roztworem EDTA 48h EDTA treatment
C	2.95	13.69
N	6.97	14.02
O	60.25	71.50
P	9.04	0
Ca	20.79	0

of collagen in solution was determined from temperature induced viscosity change using an Ubbelohde viscometer. Fractional viscosity was calculated for each temperature as follows:

Fractional viscosity = $(\eta_{\text{sp}}(T^{\circ}\text{C}) - \eta_{\text{sp}}(40^{\circ}\text{C})) / (\eta_{\text{sp}}(10^{\circ}\text{C}) - \eta_{\text{sp}}(40^{\circ}\text{C}))$ where, the viscosity was specific viscosity (η_{sp}) and was calculated by following equation:

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

(t and t_0 are the efflux times of collagen solution and solvent, respectively).



RYS. 1. Widmo IR filmu kolagenowego.
FIG. 1. IR spectrum of collagen film.

Results and discussion

EDX of raw scale and demineralized scale are shown in TABLE 1.

Demineralization was almost completed after 48h of EDTA treatment, which was confirmed by EDX.

The amino acid composition of collagen was shown in TABLE 2.

The amount of imino acids, proline and hydroxyproline, are 46.17 and 28.44 nmol of amino acid in 50 μg of collagen, respectively, which is likely to have an influence on the stability of the collagen fibers and influences the denaturation temperature as well. Absence of cysteine in collagen emphasizes presence of type I collagen.

IR spectrum of fish scale collagen film is shown in FIG.1. We observe the bands typical for collagen such N-H stretching at $\sim 3305\text{ cm}^{-1}$ for the amide A, C-H stretching at $\sim 3081\text{ cm}^{-1}$ for the amide B, C=O stretching at $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ for the amide I, and N-H deformation at $\sim 1545\text{ cm}^{-1}$ for the amide II.

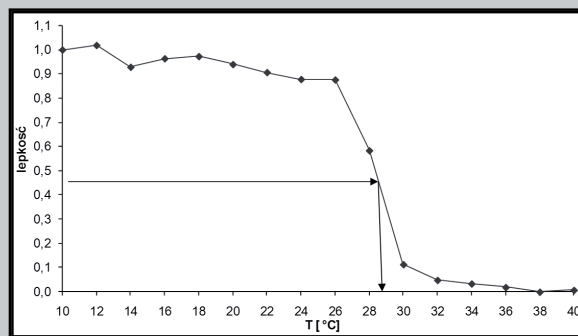
The denaturation temperature (T_d) was determined by viscosity measurement. Relative viscosity of collagen in 0.1 M acetic acid is depicted in FIG. 2.

Temperatura denaturacji (T_d) została wyznaczona z pomiarów wiskozymetrycznych. Zależność lepkości roztworu kolagenu w 0,1 M kwasie octowym od temperatury przedstawiono na RYSUNKU 2.

T_d kolagenu rybiego wynosi $\sim 28,5^\circ\text{C}$. Jest to wyższa temperatura w porównaniu z T_d kolagenu wyizolowanego z tkanek niektórych zwierząt morskich takich jak: mintaj ($16,8^\circ\text{C}$), makrelosz (24°C), rekin ($25,0^\circ\text{C}$), keta (gatunek łososia) ($19,4^\circ\text{C}$), makreła ($26,1^\circ\text{C}$).

Wnioski

Z łusek ryb z gatunku *Esox lucius* wyizolowano kolagen typu I. Stabilność termiczna pozyskanego białka ($T_d=28,5^\circ\text{C}$) jest wyższa niż w przypadku niektórych ryb morskich. Może to być spowodowane większą zawartością iminokwasów oraz wyższą temperaturą ciała i środowiska życia ryb z gatunku *Esox lucius*. Temperaturę denaturacji można podwyższyć stosując różne metody sieciowania białek, m.in. sieciowanie za pomocą reakcji chemicznych. Kolagen uzyskany z łusek rybich jest ciekawą alternatywą dla kolagenu ssaków i może znaleźć zastosowania biomedyczne.



RYS. 2. Zmiany lepkości roztworu kolagenu w zależności od temperatury.

FIG. 2. Change in fractional viscosity with temperature of fish scale collagen.

The T_d of fish scale collagen was found to be $\sim 28,5^\circ\text{C}$. The T_d of collagen from *Esox lucius* was higher than those of collagens from some marine species: Alaska Pollack skin ($16,8^\circ\text{C}$), saury (24°C), bullhead shark ($25,0^\circ\text{C}$), chub salmon ($19,4^\circ\text{C}$), common mackerel ($26,1^\circ\text{C}$) [4].

Conclusions

Collagen type I was successfully isolated from the scale of *Esox lucius*. Thermal stability of isolated collagen ($28,5^\circ\text{C}$) was higher than that of sea fishes. The higher thermal stability of *Esox lucius* may be due to higher contents of imino acids and may have correlation with their body temperature and living environment. The thermal stability of collagen can be improved by chemical crosslinking. The isolated fish collagen may serve as an attractive alternative to mammalian collagen for biomedical applications.

Piśmiennictwo

- [1] Sankar S.; Sekar S.; Mohan R.; Rani S.; Sundaraseelan J.; Sastry T.P., Preparation and partial characterization of collagen sheet from fish (*Lates calcarifer*) scales, International Journal of Biological Macromolecules (2008) 42, 6-9.
- [2] Rodziejewicz-Motowidło S.; Ślądowska A.; Mulkiewicz E.; Kołodziejczyk A.; Aleksandrowicz A.; et. al., Isolation and characterization of a thermally stable collagen preparation from the outer skin of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*, Aquaculture (2008) 285, 130-134.

References

- [3] Zhang J.; Duan R.; Tian Y.; Konno K., Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Food Chemistry (2009) 116, 318-322.
- [4] Nagai, T.; Araki, Y.; Suzuki, N., Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*) Food Chemistry (2002) 78, 173-177.