



مقاله پژوهشی

Available Online: <http://jmst.kmsu.ac.ir>



## بررسی ساختاری نانوکامپوزیت متشکل از کلاژن استخراج شده از پولک ماهی سفید در محلول شبیه سازی شده بدن

سکینه خزایی پول<sup>۱</sup>، فاطمه علمی<sup>۲\*</sup>، مریم میترا علمی<sup>۳</sup>

۱. گروه شیمی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.

۲. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی، بابل، ایران.

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [f.elmi@umz.ac.ir](mailto:f.elmi@umz.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۰۶

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22113/JMST.2018.116664.2109

### چکیده

پروتئین کلاژن معدنی شده، مزایای زیستی متنوع، زیست سازگاری و زیست تجزیه پذیری مطلوبی دارند. در این پژوهش، فرآیند معدنی شدن پروتئین کلاژن نوع I استخراج شده از پولک ماهی سفید (*Rutilus Frisii Kutum*) جهت معدنی شدن در مایع شبیه سازی شده بدن، بررسی شد. در طی زمان غوطه وری، بلورهای تری کلسیم فسفات در بین نانوفیبریل های کلاژن ترسیب شد. وجود کلاژن نوع I، شامل سه رشته مارپیچ با انجام الکتروفورز SDS-PAGE تایید شد. از تکنیک طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) برای شناسایی نانوفیبریل های کلاژن استخراج شده و کلاژن معدنی شده استفاده شد. حضور ۶۰٪ مواد معدنی در نانوکامپوزیت ASC معدنی شده با TGA اثبات شد. از DSC برای تعیین دمای دناتورده شدن ASC معدنی شده در دمای ۱۴۷٫۵ درجه سلسیوس که بیانگر پایداری حرارتی بالاتر کلاژن معدنی شده است. تشکیل نانو ذرات تری کلسیم فسفات بر روی نانوفیبریل های کلاژن به صورت نامرتب و متراکم با تصاویر TEM، مشخص شد. پروتئین کلاژن معدنی شده، می تواند در ساخت داربست های متخلخل برای مهندسی بافت، مواد ایمپلنت دندان، تهیه تجهیزات پزشکی راهکاری نوین را ارائه دهد. واژگان کلیدی: کلاژن معدنی شده، تری کلسیم فسفات، نانوفیبریل، پولک ماهی.

## ۱. مقدمه

پروتئین‌های کلاژن، به صورت رشته‌ای هستند و فراوان‌ترین پروتئین بدن به شمار می‌روند. این پروتئین‌ها به میزان متفاوت در انواع بافت همبند یافت می‌شوند (Beck and Brodsky, 1998). ترکیبات طبیعی مانند کلاژن موجود در جانداران دریایی را می‌توان به صورت نانوکامپوزیت معدنی‌شده، سنتز کرد. با استخراج کلاژن از ضایعات شیلات مانند پولک، پوست و باله ماهی و معدنی کردن کلاژن، می‌توان از آن برای ساخت داربست‌های متخلخل استفاده کرد (Liu et al., 2014). در روش معدنی‌شدن (Mineralization) کلاژن، سنتز کامپوزیت استخوانی کلاژن/ کلسیم فسفات نظیر آلفا تری کلسیم فسفات (Phosphate- Tricalcium)، کلسیم فسفید (Calcium Phosphide) و تترا کلسیم فسفات (Tetracalcium Phosphate) که کپی‌برداری از ساختارهای استخوان طبیعی است، ویژگی‌های آلی و معدنی استخوان را دارد (Wahl and Czernuszka, 2006).

در شرایط آزمایشگاهی (In Vitro) با الگوبرداری از استخوان طبیعی، امکان سنتز داربست‌هایی از کامپوزیت ASC معدنی‌شده (Acid Soluble Collagen) وجود دارد (Qu et al., 2008). محلول SBF (Simulate Body Fluid) با غلظت یونی یکسان با محلول خارج سلولی بدن (Extracellular Matrix) برای رسوب کلسیم فسفات بر روی داربست کلاژن در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود. محلول SBF حاوی یون‌های فوق اشباع شده کلسیم و فسفات برای پوشش مواد مختلف با کلسیم فسفات‌ها است (Kokubo and Takadama, 2006). در روش زیست تقلیدپذیری، برای تشکیل بلورهای کلسیم فسفات بر روی بسترهای مختلف، به مدت ۷ الی ۱۴ روز آن بستر در SBF غوطه ور می‌شود (Al-Munajjed et al., 2009).

کلاژن به عنوان داربست در مهندسی بافت استخوان، خواص مکانیکی نسبتاً ضعیفی دارد. متعاقباً تهیه داربست‌های کلاژن/ کلسیم فسفات با ساختار متخلخل

خواص مطلوب و کارایی بالای زیستی در شرایط آزمایشگاهی را امکان‌پذیر می‌سازد (Kokubo et al., 1990). بسیاری از محققان از ترکیب کلاژن و کلسیم فسفات برای ساخت داربست‌های استخوانی استفاده کرده‌اند (Liao et al., 2004). حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد بافت استخوان از فاز معدنی آپاتیت و مابقی از کلاژن است (Wang et al., 2012). حضور فاز معدنی، مقاومت مکانیکی و فعالیت زیستی کلاژن را بهبود می‌بخشد (Uezono et al., 2013).

در سیستم‌های زیستی، فیبریل‌های کلاژن معدنی‌شده با ساختار سلسله‌مراتبی در اندازه‌های مختلف با هدف دستیابی به خواص مکانیکی مطلوب خودتجمعی (Self-Assembly) می‌کنند (Hodge and Petruska, 1963). پلیمر زیستی کلاژن در بستر خارج سلولی در مهره‌داران و بی‌مهرگان وجود دارد. در فضای خارج سلولی، مولکول‌های کلاژن به فرم سلسله‌مراتبی میان فیبریل‌ها در مقیاس‌های نانو، میکرو و ماکرو، بسته به ساختارهای مختلف بافت و عملکرد فیزیولوژیکی آن خودتجمعی می‌کنند (Cui et al., 2008). فیبریل‌های ASC معدنی‌شده نیز قادرند با حفظ ساختار سلسله‌مراتبی و با هدف دستیابی به خواص مکانیکی مطلوب خودتجمعی کنند (Weiner et al., 1999).

در فرآیند معدنی‌شدن کلاژن، جایگاه‌های هسته‌زایی (Nucleation) برای تشکیل بلورهای معدنی اهمیت دارند. مطالعات نشان می‌دهد؛ گروه کربوکسیل با بار منفی در حدود ۱۱٪ زنجیره جانبی آمینواسیدهای پروتئین کلاژن را تشکیل می‌دهد که نواحی اصلی هسته‌زایی برای معدنی‌شدن فیبریل کلاژن است و اتصال یون‌های کلسیم به گروه کربوکسیل، عامل اصلی در مرحله ابتدایی هسته‌زایی می‌باشد (Rhee et al., 2000).

در آغاز فرآیند معدنی شدن، بلورهای معدنی مانند هیدروکسی‌آپاتیت و تری کلسیم فسفات در مقیاس نانو در ساختار سلسله‌مراتبی بین نانوفیبریل‌های کلاژن شکل می‌گیرند، سپس سازمان‌دهی فیبریل کلاژن با

پولک‌های ماهی سفید دریای خزر پس از شستشو و خشک شدن در دمای محیط به قطعات کوچک خرد شد و به آزمایشگاه منتقل شد. جهت حذف پروتئین غیرکلاژنی پولک ماهی ابتدا مرحله غیر معدنی شدن با محلول سود ۰/۱ نرمال و سپس مرحله استخراج کلاژن با اسید استیک رقیق در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. در مرحله دوم برای جدا شدن کلاژن از محلول رقیق نمکی استفاده شد. رسوب کلاژن با سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به دست آمد و پس از دیالیز، کلاژن توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک شد. برای تهیه نانوکامپوزیت کلاژن معدنی شده از محلول اسیدی کلاژن نوع I استخراج شده از پولک ماهی سفید دریای خزر و محلول شبیه سازی شده بدن (SBF) در دمای ۴ درجه سلسیوس و  $pH = 7.4$  استفاده شد. محلول SBF با غلظت برابر پلاسمای خونی تهیه می‌گردد. جهت تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول SBF، در ابتدا ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر را در بشر پلی اتیلنی ریخته و بر روی همزن مغناطیسی در حمام آب گرم قرار می‌گیرد. تهیه SBF در دمای  $(36.5 \pm 1.5)$  درجه سلسیوس انجام می‌شود. ترکیبات لازم برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول SBF شامل ترکیبات  $NaCl$ ،  $NaHCO_3$ ،  $KCl$ ،  $K_2HPO_4$ ،  $MgCl_2$ ،  $CaCl_2$ ،  $Na_2SO_4$ ،  $C_4H_{11}NO_3$  و  $C_{12}H_{25}C_6H_4SO_3Na$  است. سپس با محلول HCl یک مولار  $pH = 7.4$  (pH فیزیولوژی) می‌رسد. پس از سرد شدن، محلول SBF در یخچال در دمای ۱۰-۵ درجه سلسیوس نگهداری می‌شود. کلاژن استخراج شده در محلول SBF به مدت ۱۴ روز غوطه‌ور شد. رسوب کلاژن معدنی شده با سانتریفیوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه به دست آمد و با خشک‌کن انجمادی، خشک شد

### ۳. نتایج و بحث

PAGE به‌طور گسترده برای تجزیه و تحلیل پروتئین‌ها، میزان خلوص و تعیین وزن مولکولی آن‌ها کاربرد دارد. الگوی الکتروفورز (شکل ۱) دو باند مربوط به زنجیره  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  با وزن مولکولی حدود ۱۳۰ و ۱۲۰ کیلو دالتون را با استفاده از نشانگر با وزن مولکولی بالا نشان می‌دهد و

توجه به جایگاه‌های بلورهای کلسیم فسفات انجام می‌شود. بلورهای کلسیم فسفات می‌توانند به صورت ورق-های کوچکی روی سطح فیبریل و عمدتاً در امتداد محور طولی فیبریل ردیف شوند. سپس تعدادی از فیبریل کلاژن معدنی به موازات هم برای تشکیل فیبرهای کلاژن معدنی شده قرار می‌گیرند (Zhang et al., 2003).

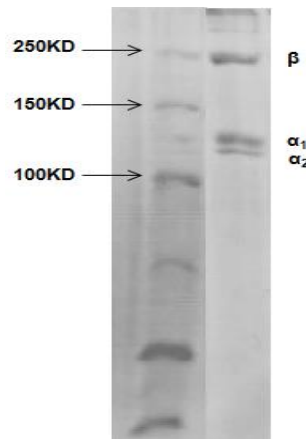
هدف از این پژوهش، استخراج و شناسایی ASC معدنی شده از پولک ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus Frisii*) با غوطه‌وری در محلول SBF است. پروتئین کلاژن معدنی شده دارای مزایای منحصر به فردی از جمله زیست سازگاری بالا، زیست تخریب‌پذیری مطلوب است و در زیست پزشکی از جمله داربست بافت می‌تواند کاربرد داشته باشد. با روش غوطه‌وری کلاژن استخراج شده از پولک ماهی در محلول SBF، تحت شرایط آزمایشگاهی کنترل شده، می‌توان نحوه پوشش تری-کلسیم فسفات روی سطح کلاژن و در بین نانوفیبریل-های کلاژن را بررسی کرد.

### ۲. مواد و روش‌ها

مواد استفاده شده در این پژوهش دارای بالاترین درجه خلوص است. برای تعیین میزان خلوص و وزن مولکولی پروتئین‌ها، از دستگاه SDS-PAGE مدل SE600Ruby، شرکت Amersham Biosciences کشور آمریکا استفاده شد. طیف‌سنجی FTIR (مدل Tensor 27، شرکت Burker، کشور آلمان) جهت تعیین گروه‌های عاملی و بررسی کلاژن استخراج شده و کلاژن معدنی شده مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه TGA مدل STA 504، شرکت BAHA، ساخت کشور آلمان برای بررسی و مطالعه رفتار نانوکامپوزیت ASC معدنی شده در مقابل حرارت استفاده گردید. دمای دنا توره شدن نانوکامپوزیت ASC معدنی شده با دستگاه DSC مدل F3Maia-200، شرکت NETZSCH کشور آلمان مشخص شد. دستگاه TEM مدل EM10C، شرکت Zeiss، کشور آلمان، جهت بررسی تشکیل نانو ذرات کلسیم فسفات بر روی نانوفیبریل‌های کلاژن استفاده شد.

زنجیره‌های  $\alpha$  بزرگ‌تر شامل زنجیره‌های دimer  $\beta$  می‌شود. کلاژن استخراج شده با نتایج به دست آمده از پوست، پولک و استخوان ماهی کپور (Duan et al., 2009) و پروتین کلاژن دیگر گونه‌های دریایی از جمله ماهی قزل آلا (Montero et al., 1990) ماهی طلایی خاردار (Matmaroh et al., 2011) مطابقت دارد.

دانسیتته  $\alpha_1$  بیشتر از  $\alpha_2$  است (Nagai et al., 2004). همچنین باندی با وزن مولکولی ۲۰۰ کیلو دالتون مربوط به زنجیره  $\beta$  است که نشان می‌دهد کلاژن استخراج شده تا حد زیادی همراه با تشکیل مقدار قابل توجهی از پیوندهای عرضی برون و درون و مولکولی

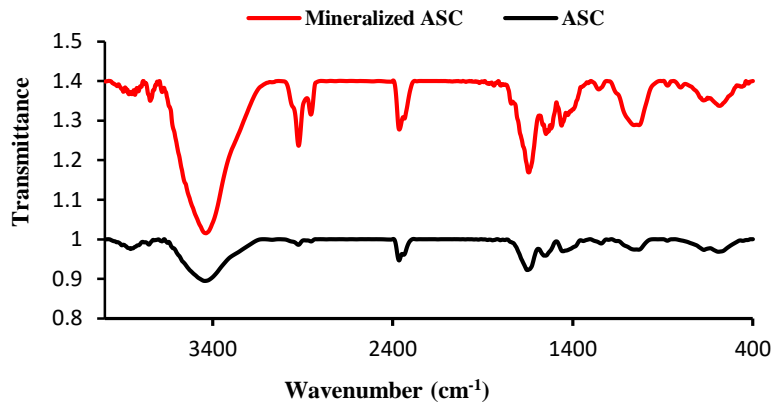


شکل ۱: الکتروفورز (SDS-PAGE) محلول اسیدی کلاژن پولک ماهی

محدوده  $2300-2400 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به جذب دی‌اکسید کربن موجود در هواست.

طیف جذبی FT-IR نانوکامپوزیت ASC معدنی شده مربوط به کلاژن و کلسیم فسفات است. باند جذبی مربوط به ارتعاشات کششی آمید نوع I، آمید نوع II و آمید نوع III به ترتیب در موقعیت‌های  $1644 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1548 \text{ cm}^{-1}$  و  $1255 \text{ cm}^{-1}$  است. باند جذبی مربوط به گروه عاملی فسفات ( $\text{PO}_4^{3-}$ )، در موقعیت‌های  $583$ ،  $675 \text{ cm}^{-1}$  و  $1032 \text{ cm}^{-1}$  است. با توجه به اینکه باند جذبی گروه عاملی فسفات در تری‌کلسیم فسفات  $1040 \text{ cm}^{-1}$  می‌باشد، جابجایی این پیک به سمت مقادیر کوچکتر نشان‌دهنده تشکیل پیوند P-O-P- در نانوکامپوزیت ASC معدنی شده مابین زنجیره پروتئین و فاز کلسیم فسفات است (Gregory, 1974). باندهای جذبی مربوط به گروه کربنات در موقعیت‌های  $1461$  و  $1548 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده شد.

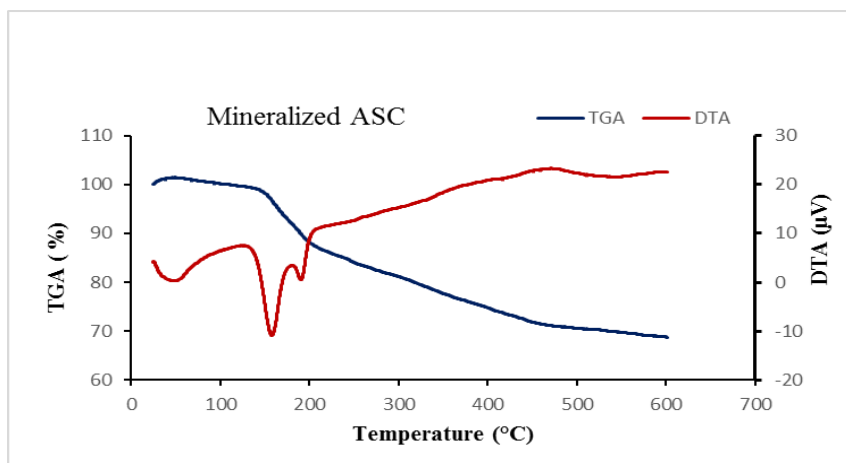
همانطور که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود، پیک جذبی مربوط به کلاژن استخراج شده از پولک ماهی سفید شامل پیک جذبی مربوط به گروه آمید I در موقعیت  $1653 \text{ cm}^{-1}$  قرار دارد که مربوط به ارتعاشات کششی گروه C=O با ارتعاشات خمشی N-H و ارتعاشات کششی و تغییر شکل CNN می‌باشد (Bandeekar, 1992). پیک جذبی مربوط به گروه آمید II در موقعیت  $1559 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات خمشی N-H و کششی C-N می‌باشد. پیک جذبی مربوط به گروه آمید III در موقعیت  $1242 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده می‌شود که مربوط به ارتعاشات کششی C-N و N-H از گروه  $\text{CH}_2$  گلیسین و زنجیره‌های جانبی پرولین که در ساختار مارپیچ سه‌گانه کلاژن درگیر هستند، است. باند آمید نوع A در طول موج  $3443 \text{ cm}^{-1}$  از پیک ارتعاشی کششی N-H و موقعیت باند آمید نوع B در طول موج  $2924 \text{ cm}^{-1}$  از پیک ارتعاشی کششی نامتقارن  $\text{CH}_2$  مشاهده شد (Kamińska and Sionkowska, 1996). باند جذبی در



شکل ۲: طیف FT-IR کلاژن و نانوکامپوزیت ASC معدنی شده

سوم، زنجیره اصلی نانوکامپوزیت تخریب می‌شود. هم-چنین نمودار DTA در دماهای ۵۵، ۱۵۸ و ۱۹۱ درجه سلسیوس ماهیت واکنش را گرماگیر و در دماهای ۱۳۳، ۲۰۵ و ۵۲۴ درجه سلسیوس ماهیت واکنش را گرماده نشان می‌دهد.

در شکل ۳ مربوط به نانوکامپوزیت ASC معدنی شده، اولین مرحله، در دمای ۶۱ تا ۱۵۷ درجه سلسیوس بوده که به از دست دادن مولکول‌های آب نسبت داده می‌شود. دومین مرحله در دمای ۱۶۶ تا ۳۲۶ درجه درجه سلسیوس بوده که در این محدوده دمایی، پروتئین کلاژن در نمونه تخریب می‌شود. در نهایت در مرحله



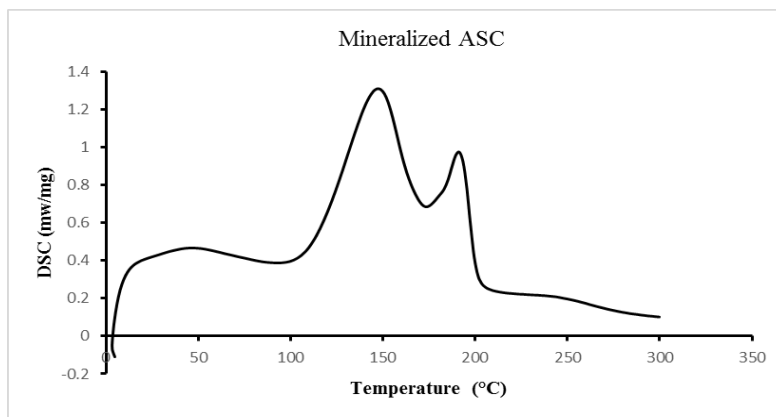
شکل ۳: نمودار TGA/DTA نانوکامپوزیت ASC معدنی شده

et al., 2014). شکل ۴ مربوط به نمودار DSC نانوکامپوزیت ASC معدنی شده می‌باشد. بر اساس ماکزیمم دمای انتقال،  $T_{max}$ ، از روی پیک نمودار ترموگرام  $T_d$  تخمین زده شد. دمای  $T_d = 147.5$  درجه سلسیوس مربوط به دناتورشدن کلاژن و دمای ۱۹۱/۵ درجه سلسیوس به احتراق فیبرهای کلاژن نسبت داده می‌شود. نتایج تحقیقات اخیر حاکی از آن است که کلاژن استخراج

دمای دناتوره شدن شاخص مهمی برای ارزیابی پایداری حرارتی کلاژن معدنی شده است. در این دما ساختمان طبیعی سه بعدی پروتئین از بین می‌رود و پروتئین عملکردش را از دست می‌دهد. دمای دناتورشدن ( $T_d$ ) نانوکامپوزیت باعث تخریب مارپیچ سه‌گانه کلاژن می‌گردد که مربوط به شکسته شدن پیوندهای کووالانسی و هیدروژنی بین مولکول‌های کلاژن می‌باشد (Salvatore)

آنتالپی کل دنا توره شدن ( $\Delta H$ ) ASC معدنی شده به-  
 وسیله اندازه گیری سطح زیر منحنی ترموگرام حدود  
 $\Delta H = 69,88$  ژول بر گرم و آنتالپی کل بلورینگی فاز  
 معدنی  $\Delta H = 21,81$  ژول بر گرم تخمین زده شده است.

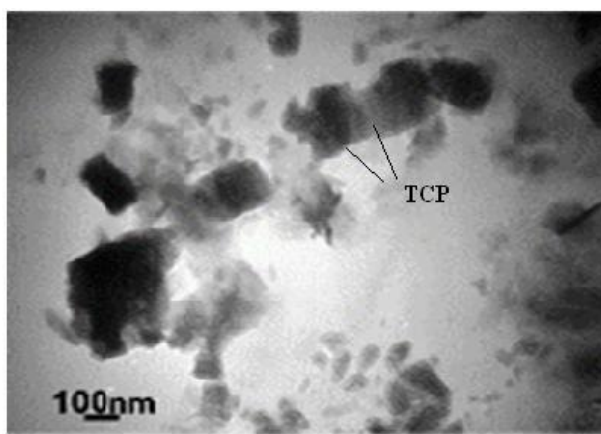
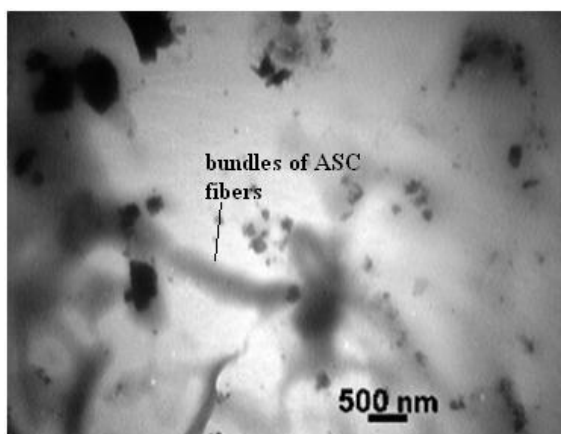
شده از پولک ماهی سفید دارای  $T_d = 19$  درجه سلسیوس  
 است (Elmi et al., 2017). بنابراین در ASC معدنی شده،  
 پایداری حرارتی به نحو چشمگیری افزایش یافته است.



شکل ۴: نمودار DSC نانوکامپوزیت ASC معدنی شده

به شکل ورق های مستطیلی بر روی نانوفیبریل های  
 کلاژن تجمع یافته اند. همان طور که ملاحظه می شود،  
 بلورهای تری کلسیم فسفات، درون رشته های کلاژنی  
 هم تشکیل شده اند.

شکل ۵ تصاویر TEM از نانوکامپوزیت ASC معدنی -  
 شده را نشان می دهد. همانطوری که ملاحظه می شود،  
 فاز معدنی بیشتر بر روی فیبریل های کلاژن تشکیل  
 شده است. نانوبلورهای کلسیم فسفات که به طور نامرتب



شکل ۵: تصاویر TEM نانوکامپوزیت ASC معدنی شده

#### ۴. نتیجه گیری

با الگوبرداری از ساختار طبیعی استخوان امکان تهیه داربست‌هایی که به ماتریکس استخوان شباهت بسیاری دارند وجود دارد. معدنی شدن کلاژن در حضور مواد معدنی کلسیم فسفات به دلیل برخورداری از ویژگی زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری جهت ترمیم ضایعات استخوانی در کاربردهای دندان‌پزشکی قابل استفاده است. در این پژوهش، بررسی ساختاری نانوفیبریل‌های ASC معدنی شده استخراج شده از پولک ماهی سفید با فرآیند زیست‌تقلیدپذیری، جهت سنتز محلول اسیدی ASC معدنی شده با غوطه‌وری کلاژن در محلول SBF بررسی شد.

بر اساس نتایج، با الکتروفورز (SDS-PAGE)، آنالیز اسیدهای آمینه وجود کلاژن نوع I، شامل ۳ رشته مارپیچ مشخص شد. طیف سنجی FT-IR نمونه ASC معدنی شده علاوه بر وجود باندهای آمیدی کلاژن، باندهای فسفاتی، بیانگر حضور کلسیم فسفات بر روی نانوفیبرهای کلاژن را نشان داد. نمودار TGA از

نانوکامپوزیت ASC معدنی شده، ۶۰٪ مواد معدنی را نشان می‌دهد که تشکیل ASC معدنی شده را اثبات می‌کند. نمودار DSC، T<sub>d</sub> را برای ASC معدنی شده در دمای ۱۴۷/۵ درجه سلسیوس نشان می‌دهد که بیانگر پایداری حرارتی ASC معدنی شده است. تشکیل نانو ذرات تری کلسیم فسفات بر روی نانو فیبریل‌های کلاژن به صورت نامرتب و متراکم با تصاویر TEM قابل مشاهده هستند. در نهایت بر اساس نتایج به دست آمده، ASC معدنی شده ساختار مشابه به ساختار استخوان را نشان می‌دهد.

به علت جابجایی توده آب سطحی است. این موضوع از شبیه بودن نمودارهای پراکندگی دما-شوری در حالت‌های مختلف اثبات می‌شود.

#### ۵. تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد خانم سکینه خزایی پول از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه مازندران است.

#### References:

Al-Munajjed, A. A., Plunkett, N.A., Gleeson, J. P., Weber, T., Jungreuthmayer, C., Levingstone, T. and O'Brien, FJ. 2009. Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 90(2): 584-591.

Bandekar, J. 1992. Amide modes and protein conformation. *Biochimica et Biophysica*

*Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1120: 123-143.

Beck, K. and Brodsky, B. 1998. Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the  $\alpha$ -helical coiled coil. *Journal of Structural Biology*. 122(1): 17-29.

Cui, F.Z., Wang, Y., Cai, Q. and Zhang, W. 2008. Conformation change of collagen during the initial stage of biomineralization of calcium phosphate. *Journal of Materials Chemistry*. 18(32): 3835-3840.

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. 112: 702-706.
- Elmi, F., Elmi, MM. and Amiri, FN. (2017). Thermodynamic parameters and influence of kinetic factors on the self-assembly of acid-soluble collagen nanofibrils. Food Biophysics, 12(3): 365-373.
- Gregory, TM. 1974. Solubility of  $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> in the system Ca (OH)<sub>2</sub>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O at 5, 15, 25, and 37°C. Journal of Research of the National Bureau of Standards. 78: 667-674.
- Hodge, A.J., and Petruska, JA. 1963. Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen molecule. Aspects of Protein Structure, Academic Press, New York, 289-300.
- Kamińska, A. and Sionkowska, A. 1996. Effect of UV radiation on the infrared spectra of collagen. Polymer Degradation and Stability. 51(1): 19-26.
- Kokubo, T., Ito, S., Huang, Z.T., Hayashi, T., Sakka, S., Kitsugi, T. and Yamamuro, T. (1990). Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 24(3): 331-343.
- Kokubo, T. and Takadama, H. 2006. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Biomaterials. 27(15): 2907-2915.
- Liao, SS., Cui, F.Z. and Zhu, Y. 2004. Osteoblasts adherence and migration through three-dimensional porous mineralized collagen based composite: nHAC/PLA. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 19(2): 117-130.
- Liu, Y., Luo, D., Liu, S., Fu, Y., Kou, X., Wang, X., Sha, Y., Gan, Y. and Zhou, Y. 2014. Effect of nanostructure of mineralized collagen scaffolds on their physical properties and osteogenic potential. Journal of Biomedical Nanotechnology. 10(6): 1049-1060.
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A.B. and Kishimura, H. 2011. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from the scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). Food Chemistry. 129(3): 1179-1186.
- Montero, P., Borderias, J., Turnay, J. and Leyzarbe, MA. 1990. Characterization of hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb) collagen. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38: 604-609.
- Nagai, T., Izumi, M. and Ishii, M. 2004. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. International journal of food science & technology. 39(3): 239-244.



- Qu, H., Xia, Z., Knecht, D.A., and Wei, M. 2008. Synthesis of dense collagen/apatite composites using a biomimetic method. *Journal of the American Ceramic Society*. 91(10): 3211-3215.
- Rhee, SH., Lee, J.D., and Tanaka, J. 2000. Nucleation of hydroxyapatite crystal through chemical interaction with collagen. *Journal of the American Ceramic Society*. 83(11): 2890-2892.
- Salvatore, L., Madaghiele, M., Parisi, C., Gatti, F. and Sannino, A. 2014. Crosslinking of micropatterned collagen-based nerve guides to modulate the expected half-life, *Journal of Biomedical Materials Research A*. 102(12): 4406–4414.
- Uezono, M., Takakuda, K., Kikuchi, M., Suzuki, S. and Moriyama, K. 2013. Hydroxyapatite/collagen nanocomposite-coated titanium rod for achieving rapid osseointegration onto bone surface. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 101(6): 1031-1038.
- Wahl, D.A., and Czernuszka, JT. 2006. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *European Cells & Materials*. 11: 43-56.
- Wang, Z., Yan, Y. and Wan, T. 2012. Fabrication and characterization of hydroxyapatite/collagenbone-like nanocomposite through a self-assembly method. *Science and Engineering of Composite Materials*. 19(2): 177-182.
- Weiner, S., Traub, W. and Wagner, HD. 1999. Lamellar bone: structure–function relations. *Journal of Structural Biology*. 126(3): 241-255.
- Zhang, W., Liao, SS. and Cui, FZ. 2003. Hierarchical self-assembly of nano-fibrils in mineralized collagen. *Chemistry of Materials*. 15(16): 3221-3226.



Available Online: <http://jmst.kmsu.ac.ir>

Original Article



## Structural study of nano composite consisting of collagen extracted from white fish scale in a simulated body solutio

Fatemeh Elmi<sup>1\*</sup>, Sekineh Khazaei Pool<sup>1</sup>, Maryam Mitra Elmi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Marine Chemistry, Faculty of Marine and Ocean Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

<sup>2</sup> Research Center of Cellular and Molecular Biology, Health Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

\*Corresponding Author E-mail: [f.elmi@umz.ac.ir](mailto:f.elmi@umz.ac.ir)

Received: 26 January 2018

Accepted: 7 April 2018

DOI: 10.22113/JMST.2018.116664.2109

### Abstract

Mineralized collagen has diverse biological advantages, biocompatibility and biodegradability. In this study, the process of mineralization of the protein collagen type I extracted from the scales of white fish (*Rutilus Frisii Kutum*), was investigated in the Simulated Body Fluid (SBF). During immersion in SBF, tricalcium phosphate crystals were precipitated into collagen nanofibrils. SDS-PAGE electrophoresis confirmed the presence of type I collagen, including 3 spiral strands. Infrared Fourier Transform (FTIR) spectroscopy technique was used to characterize extracted collagen nanofibrils and mineralized collagen. The presence of 60% of minerals in the mineralized Acid Soluble Collagen (ASC) was confirmed by TGA. DSC was used to determine the denaturation temperature of mineralized ASC at 147.5 °C, indicating a higher thermal stability of mineralized collagen. TEM images showed irregular and dense formation of tricalcium phosphate nanoparticles on collagen nanofibrils. Mineralized collagen protein can provide new insight into producing porous scaffolds for tissue engineering, dental implants, and providing medical equipment.

**Keywords:** Mineralized Collagen, Tricalcium Phosphate, Nanofibril, Fish Scale.

**List of Table and Figures**

**Figure (1):** Electrophoresis (SDS-PAGE) Acidic solution of fish scales collagen

**Figure (2):** FT-IR spectrum of collagen and mineralized ASC nanocomposites

**Figure (3):** TGA / DTA diagram of mineralized ASC nanocomposite

**Figure (4):** DSC diagram of mineralized ASC nanocomposite

**Figure (5):** TEM images of mineralized ASC nanocomposites