

EXTRACTION DU COLLAGÈNE A PARTIR DES ÉCAILLES DE LA CARPE COMMUNE *CYPRINUS CARPIO*

Emna BEN SLIMANE et Saloua SADOK

Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologie marines, INSTM, centre La Goulette,
Port de Pêche 2060, Tunis, TUNISIE, email/ * benslimaneemna@gmail.com; salwa.sadok@instm.rnrt.tn

ABSTRACT

The objective of this study was to extract and characterize acid soluble collagens (ASC) and pepsin soluble collagens (PSC) from the scales of common carp *Cyprinus carpio*. SDS-PAGE and FTIR confirmed that ASC and PSC were mainly composed of type I collagen with slight molecular structure differences. Both collagens comprised two different α chains, ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) and one β chain.

RESUME

L'objectif de cette étude réside en une extraction chimique et enzymatique du collagène à partir des écailles de la carpe commune. Après caractérisation des collagènes obtenus ASC et PSC, les profils électrophorétiques SDS-page ont permis de confirmer que les deux extraits de collagènes sont de type I avec la présence de deux chaînes α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) et d'une chaîne β . De plus l'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a montré que les deux types de collagènes ASC et PSC présentent la même structure moléculaire avec quelques différences au niveau des fréquences de détection.

INTRODUCTION

La carpe commune *Cyprinus carpio* est une espèce de faible valeur commerciale, très peu appréciée par le consommateur tunisien. Introduite dans les barrages et plan tunisiens vers les années 60 (Zaouali 1981), cette espèce a bien proliféré et peut ainsi constituer une importante source de nutriments et d'autres substances pouvant avoir diverses applications dans de nombreux domaines tels que la cosmétique et l'alimentaire.

Dans le cadre des projets transfrontaliers, il est question de valoriser la carpe comme produit halio-alimentaire transformé, attrayant et pouvant aboutir à de nouveaux marchés et consommateurs. Cependant cette transformation est accompagnée par la production de coproduits telles que les écailles caractérisées par leur abondance et leur grande forme. Cette biomasse représente un intérêt de recherche de bioproduits tel que le collagène. Le collagène est une molécule hautement recherchée ayant un usage fréquent en cosmétique. L'objectif de la présente étude est d'extraire, caractériser et identifier le collagène extrait à partir des écailles de carpes *Cyprinus carpio*.

MATERIELS ET METHODES

Composition proximale

Avant l'extraction du collagène, une analyse de la composition proximale des écailles a été effectuée. Le taux d'humidité, la teneur en cendres ont été déterminés selon la méthode AOAC (1990), la teneur en protéines des écailles, en utilisant un facteur de conversion de 6,25. La Teneur en lipides est

déterminée selon la méthode de Folch et *al.*, (1957).

Extraction du collagène à partir des écailles de la carpe

Les étapes de prétraitement et l'extraction du collagène sont réalisées selon les méthodes de Nagai et Suzuki (2000) et Duan et *al.*, (2009) avec quelques modifications. Toutes les étapes du travail sont réalisées à basse température (4°C) et sous agitation continue.

Prétraitement des écailles

Les écailles ont été isolées à partir de spécimens de carpe commune *Cyprinus carpio* collectés dans la retenue du barrage Sidi Salem à Oued Zargua, Beja au nord de la Tunisie. Ces échantillons sont lavés par l'eau du robinet et coupés en petit morceaux. Le prétraitement de ces coproduits consiste en l'élimination des protéines non collagéniques par la soude NaOH suivie par l'élimination des tissus adipeux par ajout d'une solution de butanol. La décalcification des écailles est réalisée par l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA).

Extraction du Collagène

C'est la méthode chimique qui a été utilisée ; elle consiste à solubiliser le collagène par une solution d'acide acétique qui permet une meilleure extraction et l'obtention du taux le plus élevé de collagène. Par la suite une étape de centrifugation (7000xg, 1h, 4°C) a permis de séparer la solution contenant le collagène connu sous le nom d'ASC « acid-solubilized collagen » des résidus. Les résidus de tissus obtenus à partir de l'étape précédente feront l'objet d'une extraction enzymatique du collagène. La

solubilisation se fait alors dans une solution d'acide acétique contenant de la pepsine. La solution contenant le PSC « pepsine-solubilized collagen » est aussi obtenue suite à une étape de centrifugation (7000xg, 1h, 4°C).

Purification du collagène

Le collagène extrait doit être purifié ; pour ce faire, le « ASC » et le « PSC » subissent une précipitation par le NaCl, la solution de collagène est laissée à précipiter pendant 12 à 24 heures sans agitation afin de permettre une récupération optimale du collagène. Le culot de collagène recueilli après centrifugation est à nouveau solubilisé dans une solution d'acide acétique. Il subira ensuite une dialyse et une lyophilisation.

Electrophorèse SDS-page

L'électrophorèse sur gel polyacrylamide est une méthode de séparation des protéines en fonction de la masse moléculaire. Cette technique a été réalisée

selon la méthode de Laemmli (1970), en utilisant un gel de séparation de 10% et un gel de concentration de 5%.

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

On a caractérisé l'extrait de collagène obtenu par spectroscopie avec la transformée de Fourier, en utilisant un appareil Carry FTIR 630, Agilent.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Composition proximale des écailles de la carpe commune

Les résultats des analyses physico-chimiques des écailles de la carpe (Tab I) ont montré que les teneurs en eau et en cendres correspondent à 50,11%, 18,44%, respectivement. La teneur en protéines est de l'ordre de 21g/100g et celle des lipides de 0,81g/100g.

Tableau I : Composition physico-chimiques des écailles de la carpe commune

	Humidité (%)	Cendres (%)	Protéines (g/100 g)	Lipides (g/100g)
Ecailles de la Carpe	50,11 ± 0,76	18,44 ± 0,6	21,63 ± 0,47	0,81 ± 0,03

Electrophorèse SDS-page

Le profil des protéines de l'ASC et de la PSC à partir des écailles de la carpe commune analysées par SDS-

PAGE dans des conditions réductrices est représenté sur la figure 1.

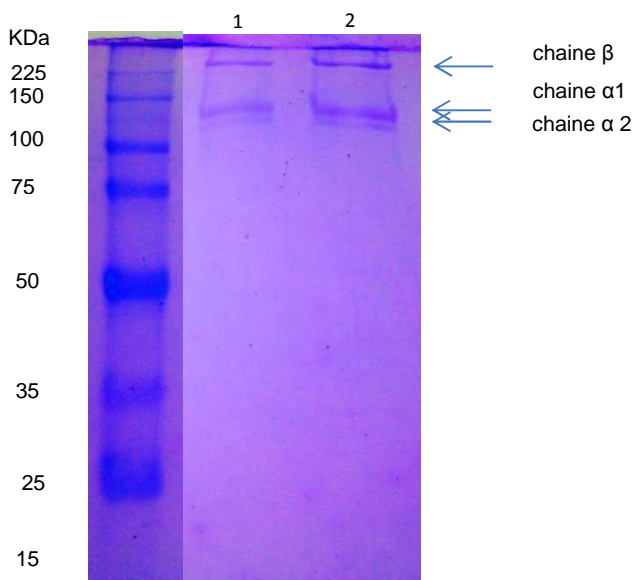


Figure 1 : Profil électrophorétique de 1: Acid solubilized Collagen (ASC) et 2: Pepsin solubilized Collagen (PSC)

Le modèle SDS-PAGE a montré que l'ASC et le PSC se composent de deux chaînes α différentes α1 et α2

avec un poids moléculaire compris approximativement entre 120 et 110 kDa. En outre on remarque la présence de la chaîne β avec un poids moléculaire supérieur à 225 kDa.

En effet ces résultats obtenus correspondent à la plupart des autres travaux effectués (Jongjareonrak et

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

En analysant les différents spectres des extraits de collagène ASC et PSC (figures 2,3) on a remarqué l'existence des bandes d'absorption caractéristiques de la molécule du collagène et qui apparaissent à des longueurs d'ondes similaires à celle trouvée pour d'autres espèces de poissons (Muyonga et al., 2004). La bande A correspond à la vibration d'élongation des liaisons N-H, selon Doyle et al., (1975) une liaison d'élongation N-H libre se produit normalement dans la gamme 3400-3440 cm^{-1} mais lorsque le groupe N-H d'un peptide est engagé dans des liaisons Hydrogène ceci a pour effet, d'une part d'affaiblir la liaison (baisse du nombre d'onde) donc de décaler la position de l'amide A d'une plus basse fréquence. Dans notre cas, la bande de l'amide A a été détectée à une fréquence de 3291,50 cm^{-1} pour l'ASC et de 3297,71 cm^{-1} pour le PSC.

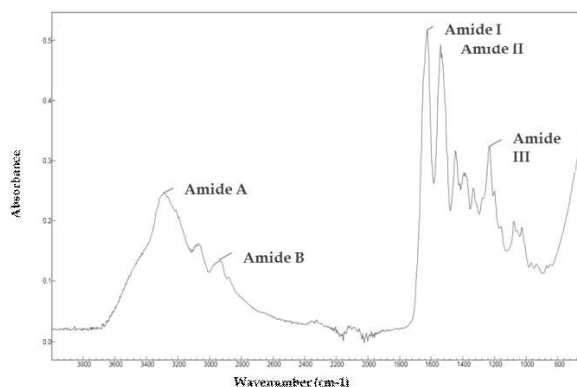


Figure 2 : Spectre de l'ASC (Acid solubilized Collagen)

al., 2005a ; Jongjareonrak et al., 2005b ; Kittiphattanabawon et al., 2005; Kolodziejaska et al., 1999; Muyonga et al., 2004; Nagai et al., 2002; Nagai et Suzuki 2000; Yata et al., 2001)

L'amide B a été repéré pour l'ASC et le PSC à des fréquences de 2935,70 cm^{-1} et 2934,62 cm^{-1} , respectivement. En se référant à Abe et Krimm (1972) cet amide correspond à la vibration d'élongation asymétrique des liaisons CH_2 .

Pour les deux types de collagènes ASC et PSC nous avons aussi observé l'existence de l'amide 1 entre 1627,72 et 1635,33 cm^{-1} , respectivement, En effet l'amide I a pour origine la vibration d'élongation des groupes Carbonyles $\text{C}=\text{O}$ (Payne et Veis, 1988, Belbachir et al., 2009) et permet la détermination de la structure secondaire des polypeptides. L'amide 2 correspondant à la liaison d'étirement N-H couplée avec la vibration d'élongation des liaisons C-N (Muyonga et al., 2004) a été observé à des fréquences de 1542,38 et 1549,53 cm^{-1} pour l'ASC et le PSC et en ce qui concerne l'amide 3 qui représente une combinaison de la vibration d'élongation des liaisons C-N et les liaisons d'étirement N-H (Belbachir et al., 2009) ce dernier a été détecté aux alentours de 1234,84 cm^{-1} pour l'ASC et 1240,81 pour le PSC.

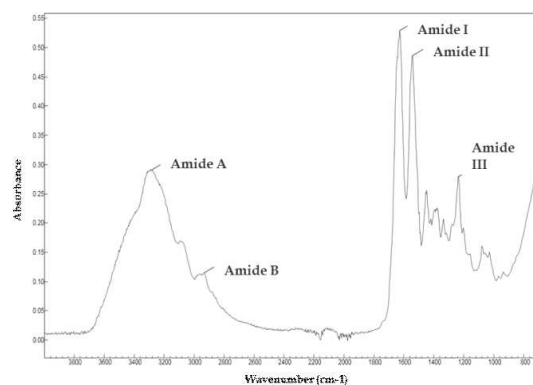


Figure 3 : Spectre du PSC (Pepsin solubilized Collagen)

CONCLUSION

Durant ce travail l'extraction du collagène à partir des écailles de la carpe, espèce de faible valeur commerciale, a été bien menée et nous avons réussi à obtenir les deux types de collagène ASC et PSC.

Les extraits de collagènes par méthode chimique Acid Solubilized Collagen et par la méthode enzymatique Pepsin Solubilized Collagen ont été caractérisés par SDS-page et analyse FTIR comme étant collagènes de type I avec la présence de la structure hélicoïdale spécifique du collagène.

REMERCIEMENT

Ce travail a été mené dans le cadre du projet transfrontalier BIOVecQ PS1.3_08 co-financé par l'UE.

BIBLIOGRAPHIE

ABE Y. & KRIMM S. (1972). Normal vibrations of crystalline polyglycine I. *Biopolymers*. 11. 1817-1839.

- AOAC. (1990). Official methods of analysis. 15th ed. Associations of official analytical chemists, 70 p.
- BELBACHIR K.1., NOREEN R., GOUSPILLOU G. and PETIBOIS C. (2009). Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* 395(3). 829-37.
- DOYLE B. B., BENDIT E. G. and BLOUT E. R. (1975). Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers.* 14. 937-957.
- FOLCH J., LEES M. and STANLEY GHS. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.
- JONGJAREONRAK A., BENJAKUL S., VISESSANGUAN W., NAGAI T. and TANAKA M. (2005) a. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chem.* 93. 475-484.
- JONGJAREONRAK A., BENJAKUL S., VISESSANGUAN W. and TANAKA M. (2005) b. Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus marcracanthus*) skin. *J. Sci. Food Agricul.* 85. 1203-1210.
- KITTIPHATTANABAWON P., BENJAKUL S., VISESSANGUAN W., NAGAI T. and TANAKA M. (2005). Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* 89. 363-372.
- KOLODZIEJSKA, I., SIKORSKI, Z. E. and NIECIKOWSKA, C. (1999). Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skins. *Food Chem.*, 66:153-157.
- LAEMMLI U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- MUYONGA J. H., COLE C.G.B., DUODU K.G. (2004). Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry.* 85. 81-89.
- NAGAI T., ARAKI Y., SUZUKI N. (2002). Collagen of the skin of ocellate puffer fish (Takifugu rubripes). *Food Chemistry.* 78. 173-177.
- NAGAI T., SUZUKI N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. *Food Chemistry,* 68, 277-281.
- PAYNE K.J., VEIS A. (1988). Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatine solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies, *Biopolymers.* 1988. 27. 1749-1760.
- YATA M., YOSHIDA C., FUJISAWA S., MIZUTA S., YOSHINAKA R. (2001). Identification and characterization of molecular species of collagen in fish skin. *Journal of Food Science.* 66. 247-251.
- ZAOUALI J. (1981). Problems of aquaculture : Brackish water and water cultivation. *Arch.Inst. Pasteur Tunis.* 58'1-2: 93-103.