جداسازی کلاژن از ضایعات ماهی هوور دم دراز *Thunnus tonggol* (پوست، استخوان و باله‌ها)

سمیرا هاشمی جوکار[۱*]، احسان کامرانی[۲]، علیرضا سالارزاده[۳]، دلارام نخبه زارع[۴]

۱- کارشناسی ارشد منابع طبیعی شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، استان هرمزگان، پست الکترونیکی: hashemisamira27@yahoo.com

۲- دانشیار گروه زیست شناسی دریا، دانشگاه هرمزگان، استان هرمزگان، پست الکترونیکی: ezas47@gmail.com

۳- استادیار، عضو هیات علمی گروه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، استان هرمزگان، پست الکترونیکی: reza1375bandar@yahoo.com

۴- استادیار، عضو هیات علمی گروه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، استان هرمزگان، پست الکترونیکی: delaram.zare@gmail.com

** نویسنده مسوول*

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۹ *تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۰*

© نشریه علمی ـ پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۳، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

چکیده

پژوهش کنونی به‌منظور استخراج پروتئین کلاژن از پوست، باله و استخوان ماهی تون دم دراز با نام فارسی هوور (*Thunnus tonggol*) صورت گرفت. در فرآوری ماهی، مقادیر زیادی از ضایعات شامل آب و مواد جامد تولید می‌شوند و استخوان و پوست و باله‌ی ماهی حاصل از ضایعات فرآوری آبزیان را می‌توان به‌عنوان جایگزین منابع ژلاتینی و کلاژنی مذکور در نظر گرفت. نمونه‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر از ضایعات کارخانه کنسرو ماهی بندرعباس تامین گردید. طی آزمایش به‌منظور استخراج کلاژن از هر ناحیه پوست، استخوان و باله‌ها با سه تکرار از آنها در آزمایشگاه مورد آزمایش و تجزیه شیمیایی قرار گرفت. همچنین میزان رطوبت، خاکستر، چربی، پروتئین و اسیدهای آمینه در این قسمت‌ها نیز سنجیده گردید. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که از نظر میزان رطوبت پوست ماهی هوور بیشترین درصد را به‌خود اختصاص داده در حالی‌که اختلاف معنی‌داری با میزان رطوبت باله و استخوان نداشت ($P>0/05$). علاوه بر این، خاکستر و چربی استخوان بیشترین میزان خاکستر را داشته و اختلاف معنی‌داری با پوست و باله نشان داد ($P<0/05$). پروتئین در پوست بیشترین میزان را داشت ($P<0/05$). در هر سه نمونه پوست، باله و استخوان ماهی هوور اسید آمینه گلیسین به‌عنوان اسید آمینه غالب بود و اسید آمینه هیدروکسی پرولین (شاخص اصلی کلاژن) در پوست نسبت به باله و استخوان مقادیر بالاتری را نشان داد ($P<0/05$). با توجه به نتایج حاصله می‌توان گفت: پوست ماهی هوور دارای مقادیر بیشتری از کلاژن در مقایسه با دو بخش دیگر است ($P<0/05$). همچنین الگوی الکتروفورز نشان داد که هیچ‌گونه اختلافی در الگوی کلاژن در پوست، باله و استخوان ماهی هوور وجود ندارد ($P>0/05$) و هر سه کلاژن به‌دست آمده دارای حداقل دو زنجیره ۱ α و ۲ α هستند.

کلمات کلیدی: *کلاژن، پوست، باله، استخوان، ماهی هوور Thunnus tonggol.*

۱. مقدمه

طی فرآوری ماهی، مقادیر زیادی از ضایعات شامل آب و مواد جامد تولید می‌شوند (Morrissey et al., 2000). ضایعات جامد، ۷۰-۵۰٪ مواد خام اصلی را در بر می‌گیرد و بسته به فرآیند مورد استفاده، این ضایعات مخلوطی از بخش‌های مختلف، سر، امعاء و احشا و استخوان خواهند بود (Shahidi, 1994; Bailey et al., 1989; Morrissey et al., 2000). به‌طور کلی، پوست و استخوان گاو و خوک، به‌عنوان منابع اصلی استخراج کلاژن و ژلاتین هستند. وقوع بیماری جنون گاوی، منجر به ایجاد تشویش در بین مصرف کنندگان ژلاتین گاوی شده است (Shahidi, 1994). در نتیجه استخوان و پوست و باله ماهی حاصل از ضایعات فرآوری آبزیان را می‌توان به‌عنوان جایگزین منابع ژلاتینی و کلاژنی مذکور در نظر گرفت. حدود ۳۰ درصد ضایعات فرآوری آبزیان را استخوان و پوست تشکیل می‌دهند که غنی از کلاژن هستند (Shahidi, 1994; Bailey et al., 1989; Morrissey et al., 2000). ارزش تغذیه‌ای پوست، استخوان و باله ماهی نسبتاً بالا بوده و این مواد منابع مفیدی جهت صنایع تولید آرد ماهی هستند، البته با توجه به کم شدن ذخایر ماهیان و نیز صید بیش از اندازه در دنیا، احتمال کاهش این مواد یعنی ضایعات نیز وجود خواهد داشت (Nagai et al., 2000). امروزه محققین مختلفی در دنیا بر روی جداسازی کلاژن از ضایعات ماهی مطالعه می‌کنند (Kimura et al., 2004; Omura et al., 2002; Nomura et al., 2000; Nagai et al., 2002).

آزمایش‌ها نشان داده‌اند که حداکثر خواص ژله کنندگی و ویسکوزیته کلاژن نوع اول زمانی حاصل می‌شود که پوست ماهی در مجاورت هیدروکسید سدیم رقیق باشد (Gomez guillen, 2000) و ظرفیت اسیدهای آمینه پرولین و هیدرکسی پرولین کلاژن در ماهی سیاه و سرگوسفندی کاملا نزدیک به پایداری دمایی است همچنین کلاژن ماهیان نیمه گرمسیری پایداری دمایی زیادی پیدا می‌کنند (Ogawa, 2003). تحقیقات نشانگر آن است که در پوست ماهی کپور چمنی دارای گلایسین ۱/۳ به‌عنوان اسیدآمینه اصلی و متیونین بسیار کم، تیروزین و هیستیدین مانند سایرکلاژن‌ها است و اسیدآمینه پرولین و هیدروکسی پرولین در کلاژن پوست از تعداد ۱۰۰۰ اسیدآمینه ۱۸۶ اسیدآمینه پرولین و هیدروکسی پرولین بودند (Ikoma et al., 2005). کلاژن در پزشکی برای تهیه انواع کرم‌ها، گاز و باندهای ویژه پانسمان و ترمیم زخم و در داروسازی برای تهیه کپسول‌های دارویی و قرص‌ها مصرف می‌شود. کلاژن در صنایع عکاسی نیز نقش مهمی به‌عهده داشته و امولسیونی از نمک‌های نقره می‌سازد که در مقابل نور بسیار حساس است.

Shahidi, 1994; Bailey et al., 1989; Morrissey et al., 2000;) Ishida and Shirai, 2001; Nomura et al., 2004; Kimura et al., 2002). اگرچه کلاژن‌های ماهی به‌عنوان منبع چسب ماهی ارزش اقتصادی دارند، اما در مقادیر وسیعی تهیه نگردیده‌اند. کلاژن کیسه‌ی هوای ماهی به‌دلیل درجه‌ی بالای حلالیت آن، شاید اولین کلاژن محلولی باشد که کشف شده است. همچنین کلاژن کیسه هوایی ماهی خاویار هنوز به‌طور تجاری در تصفیه نوشابه‌های الکلی به کار می‌رود. کلاژن محلول پوست ماهی به طور وسیعی مطالعه شده است و به طور غیر معمول ۳ زنجیر اصلی آن همگی متفاوت هستند (Shahidi, 1994; Bailey et al., 1989; Morrissey et al., 2000). به‌طور کلی کلاژن‌های ماهی مقدار اسیدآمینه کمتری از کلاژن‌های پستانداران دارند. کلاژن محلول پوست کوسه ماهی و ماهیان غضروفی نیز به دست آمده است که این نوع کلاژن‌ها مشابه با کلاژن مهره داران است (Nagai et al., 2000). شاید جالب‌ترین کلاژنی که در آبزیان کشف شده است؛ الاستودین بوده که از پروتئین تهیه شده از باله کوسه ماهی است. این پروتئین وزن مولکولی کمتری در مقایسه با اکثر کلاژن‌های محلول دیگر دارد و هم چنین مقدار تیروزین و سیستئین بالایی داشته که غیرعادی می‌باشد. این دو اسیدآمینه در تشکیل اتصال شرکت دارند، ولی این پدیده در کلاژن‌های پستانداران دیده نمی‌شود (Morrissey et al., 2000). صید سالیانه تون ماهیان و شبه تن ماهیان (نظیر شیر، قباد، مارلین...) در ایران سالیانه حدود ۱۷۸۰۰۰ تن است که نزدیک ۵۰٪ آن را ماهی هوور در هرمزگان تشکیل می‌دهد (سازمان شیلات ایران: ۱۳۸۹). ماهی هوور دم دراز یکی از مهمترین ماهی‌های صنعتی خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد که از نظر اقتصادی برای صنعت شیلات ایران بسیار با اهمیت بوده است.

تاکنون مطالعات زیادی بر روی بررسی کلاژن صورت گرفته که از جمله می‌توان به خواص بیوشیمیایی کلاژن استخراج شده از پوست و استخوان ماهی قزل آلای رنگین کمان اشاره نمود که توسط هدی شهیری طبرستانی (۱۳۸۷) که به‌منظور استفاده بهینه از فرآورده‌های جانبی ماهی، کلاژن اسیدی (ASC)، از پوست و استخوان ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus*

mykiss) جداسازی گردید اشاره نمود. بازده استخراج کلاژن در مورد پوست و استخوان به‌ترتیب ۹/۴۴۸٪ و ۱/۱۲۲٪ براساس وزن مرطوب است. براساس الگوی الکتروفورز، هر دو نوع کلاژن به عنوان کلاژن نوع I با میزان آمینو اسید نسبتاً پایین و ترکیب آمینو اسیدی تقریباً متفاوت طبقه‌بندی شدند. کلاژن پوست و استخوان به ترتیب در pH ۹ و ۷ کمترین حلالیت را داشتند. غلظت نمک تا ۳٪ تغییری در حلالیت کلاژن‌ها ایجاد نکرد ولی در مقادیر بالای ۳٪ نمک، کاهش شدیدی در حلالیت به‌وجود آمد و همچنین استخراج کلاژن از پوست ماهی کاد تحت تاثیر واکنش و عملکرد شیمیایی که بر اساس روش استفاده از اسید سیتریک ۰/۷ درصد و غلظت های کم سولفوریک اسید و هیدروکسید سدیم بود که بیشترین بازده را داشت. Gudmundsson و همکاران (۱۹۹۷) کلاژن حاصله را ۱۷/۲۶ درصد گزارش کردند.

بر روی استخراج کلاژن نوع اول از گونه ماهیان غضروفی در آمریکا بررسی‌هایی توسط Ohno و Kimura (۱۹۹۸) انجام شد و نتایج درصد کلاژن اسیدی نوع اول را برابر۰/۰۸۴۴٪ نشان داد. اما تاکنون گزارشی مبنی بر استخراج کلاژن از ضایعات خشک ماهی ماهی هوور دم دراز در ایران گزارش نشده است. در پژوهش کنونی به بررسی استخراج پروتئین کلاژن از ضایعات پوست، باله و استخوان ماهی هوور دم دراز پرداخته شده است. علاوه بر این میزان رطوبت، خاکستر، چربی، پروتئین و اسیدهای آمینه نیز در این بخش مورد مقایسه قرار گرفته است.

۲. مواد و روش‌ها

به منظورجداسازی کلاژن، نمونه ضایعات خشک به صورت تصادفی با توجه به مشخصات کیفی ماهی تازه انتخاب و حجم مشخصی از ضایعات از شرکت فرآورده‌های شیلاتی بندرعباس تهیه گردید و مراحل آزمایش در آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان انجام شد.

در آزمایش کنونی ضایعات به سه تیمار شامل پوست، استخوان و باله تقسیم گردید و هر تیمار با سه تکرار مورد سنجش شاخص‌های مورد نظر قرار گرفت. جهت انجام آزمایش تمام مواد در سردخانه با دمای ۱۸- درجه سانتیگراد در آزمایشگاه به مدت یک هفته نگهداری شده، سپس نمونه‌ها را به آزمایشگاه کارخانه منتقل نموده و تا شروع آزمایشات به همان حالت نگهداری گردید. شرایط دمایی در تمام طول فرایند تحقیق ۴ درجه سانتیگراد و pH ثابت با مقدار ۷/۲ و کنترل شده بودند (Nagai et al., 2000).

برای انجام آزمایش ۵۰ گرم از هر نمونه توزین شده و پس از خروج نمونه از حالت انجماد در دمای اتاق نمونه ها مجدد وزن، و میزان آب از دست رفته آنها محاسبه گردید. سپس پوست، استخوان و باله‌ها را به صورت قطعات کوچک در آورده و در سود سوزآور ۰/۱ نرمال به مدت ۶ ساعت با همزن مغناطیسی جهت حذف پروتئین‌های غیرکلاژن همزده تا عصاره گیری شود. سپس با آب مقطر شستشو گردید. جهت جداسازی کلاژن از پوست، مرحله اول حذف چربی از پوست انجام شد که به همین منظور پوست را به مدت یک روز در بوتیل الکل ۱۰٪ قرار داده، بعد از گذشت زمان مذکور نمونه‌ها با آب مقطر شستشو و سپس ماده غیرقابل حل در اسید استیک ۰/۵ مولار به مدت ۳ روز قرار داده شد، عصاره بدست آمده را با سانتریفوژ به مدت ۱ ساعت با ۲۰۰۰۰ دور/ دقیقه عصاره گیری گردید. مواد باقی مانده به مدت ۲ روز مجدداً در اسید استیک ۰/۵ مولار قرار داده شده تا مجدداً با سانتریفوژ عصاره گیری شود، به محلول بدست آمده به تدریج نمک طعام اضافه گردید تا غلظت نهایی به ۰/۹ مولار برسد. در این فرآیند بتدریج کلاژن رسوب نموده و استخراج گردید (Nagai et al., 2000).

جهت جداسازی کلاژن از استخوان ابتدا استخوان‌ها را که نامحلول هستند، در ۰/۵ نرمال EDTA با pH=۷/۴ به مدت ۴ روز جهت حذف کلسیم قرار داده و بعد از شستشوی رسوب ایجاد شده با آب مقطر، چربی را نیز با بوتیل الکل ۱۰٪ حذف نموده، سپس مواد باقی مانده را با آب مقطر شستشو داده سایر مراحل جداسازی کلاژن مانند روش ذکر شده در پوست خواهد بود. جهت جداسازی کلاژن از باله‌ها، مواد باله‌ها را که نامحلول هستند به مدت ۳ روز در اسید استیک ۰/۵ مولار قرار داده، بعد از گذشت زمان مذکور با ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ ساعت سانتریفیوژ شده، مواد به دست آمده به دو بخش تقسیم خواهد گردید، بخشی که در اسید نامحلول و بخشی که در اسید محلول است، کلاژن در بخش نامحلول در اسید قرار دارد (Nagai et al., 2000). در این مرحله بخش مزبور را ابتدا در آب مقطر شستشو و به مدت ۵ روز با EDTA ۰/۵ مولار جهت کلسیم زدایی قرار داده، سپس مواد باقی مانده در آب مقطر شستشو داده شد. جهت حذف چربی ، نمونه بدست آمده آن را به مدت ۱ روز در بوتیل الکل ۱۰٪ گذاشته، بعد از گذشت زمان مذکور نمونه در آب مقطر

شستشو گردید. در نهایت نیز مواد باقی مانده با سانتریفیوژ با ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ ساعت عصاره گیری شدند. مواد رسوب باقی مانده نیز در اسید استیک ۰/۵ مولار حل شده تا به شکل محلول درآید و در خاتمه به محلول مذکور نمک طعام اضافه تا از این طریق کلاژن جداسازی گردد. مراحل باقی مانده آنالیز نمونه‌ها پس از تهیه ژل پلی اکریل آمید (SDS-page) صورت گرفت (Samboork, 1989). نمونه کلاژن را در فسفات سدیم ۰/۰۲ مولار (pH= ۷/۲) حاوی یک درصد SDS و اوره ۳/۵ مولار حل شده، الکتروفورز نیز بر روی ژل‌های ۵/۳ در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH= ۷/۲) حاوی SDS یک درصد انجام شد. پس از تهیه ژل تصویر دو بعدی ملاحظه شده در الکتروفورز مورد بررسی و تفسیر قرار گرفت.

پس از تهیه ژل به منظور رنگ آمیزی آن، ژل را به مدت ۱۰ دقیقه در محلول آب مقطر حاوی اتیدیوم برماید قرار داده و سپس با آب مقطر خالص شستشو داده و به‌وسیله دستگاه ژل داکتیو متر بدینوسیله نور UV باندهای پروتئین کلاژن را مشاهده و بررسی گردید. در روش مطلوبِ محلول سازی برای الکتروفورز دو بعدی باید تمام پیوندهای غیرکوالانت در کمپلکس‌های پروتئینی شکسته شده و تجمع های پروتئینی به پلی پپتیدهای منفرد و محلول تبدیل شوند. متلاشی ساختن نمونه‌ها باید در سرما صورت پذیرد و نمونه مورد نظر در حین این روند باید روی یخ نگهداری شود. برای حفظ نمونه‌ی پروتئینی از عملکرد پروتئازهای آزاد شده در حین متلاشی ساختن سلول‌ها باید تمهیداتی در نظر گرفته شود. یکی از روش‌های معمول متلاشی ساختن مستقیم سلول‌ها در محلول‌های لیزکننده‌ای است که سریعاً پروتئازها و دیگر فعالیت‌های آنزیمی را متوقف کنند، این محلول‌ها عموماً دارای مواد دناتوره کننده‌ی قدرتمندی هستند.

در این تحقیق برای اندازگیری میزان پروتئین از سولفات مس، سولفات سدیم و اکسید سلنیوم به‌عنوان کاتالیزور استفاده گردید. کاتالیزور سرعت واکنش را بالا می‌برد. در برداشت از نمونه باید به این نکته توجه کرد که هر چه مقدار پروتئین نمونه بیشتر باشد باید مقدار کمتری از نمونه را برای آزمایش برداشت. میزان پروتئین از رابط زیر محاسبه گردید:

$$\%\ \text{protein} = \frac{(V_2 - V_1) \times 0.014 \times \text{ضریب پروتئین} \times N}{\text{وزن نمونه}}$$

برای اندازه‌گیری خاکستر، بوته‌ها را پس از خشک شدن داخل آون (مانند رطوبت) در دسیکاتور خنک کرده و وزن نموده، سپس نمونه داخل آن را توزین کرده، سپس بوته‌ها را روی شعله قرار می دهیم و می گذاریم نمونه داخل آن به خوبی بسوزد به طوری که دود سفیدرنگی از آن خارج شود. وقتی نمونه خوب سوخت و دود کردن آن تمام شد، بوته‌ها را از روی شعله برداشته و در داخل کوره ۵۵۰°C به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت قرار داده، بسته به نوع نمونه تا حصول رنگ سفید مایل به خاکستری متفاوت است. اگر این رنگ حاصل نشد باید پس از خنک شدن بوته چند قطره آب مقطر به آن افزود و از رابطه زیر درصد خاکستر حاصل می‌گردد:

$$\text{درصد خاکستر} = \frac{\text{وزن بوته و نمونه خاکستر شده} - \text{وزن بوته}}{\text{وزن نمونه}} \times 100$$

علاوه بر این به سنجش میزان چربی و pH نیز پرداخته شد. به منظور تعیین ترکیب اسیدهای آمینه از دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاده گردید، ابتدا نمونه‌ها را برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد با استفاده از اسید هیدروکلریدریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شدند. سپس با استفاده از ماده اوفتال دی آلدهید عمل مشتق سازی اسیدآمینه انجام شد. میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مدل کنوئر (آلمان) با استفاده از ستون اسفریکال با آشکار ساز فلورسنت انجام شد (Antonie, WeiC, Littell and Marshall, 1999). در پایان جهت تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده از نرم افزار SPSS و روش آنالیز واریانس یک طرفه One-Way ANOVA و جهت مقایسه میانگین‌ها نیز از روش مقایسه دانکن در سطح آماری ۵٪ استفاده گردید.

۳. نتایج

نتایج نشان داد که پوست از مقادیر بیشتری رطوبت برخوردار است امّا از نظر آماری اختلاف معنی داری بین رطوبت پوست، باله و استخوان وجود ندارد ($P>0/05$)، در حالی که استخوان در مقایسه با باله و پوست محتوای خاکستر و چربی بیشتری را نشان داد و از این نظر با پوست و باله از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت ($P<0/05$). در مقابل میزان پروتئین پوست و باله از استخوان بیشتر بوده و درصد پروتئین پوست اختلاف معنی‌داری

با میزان پروتئین باله و استخوان از خود نشان داد (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد پوست ماهی هوور دم دراز مقادیر بالاتری از هیدورکسی پرولین را نسبت به باله و استخوان داشته و از نظر آماری اختلاف معنی داری بین پوست ماهی هوور و بخش‌های دیگر یعنی باله و استخوان وجود دارد (P<۰/۰۵).

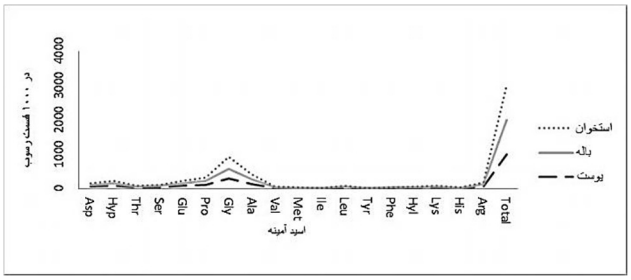
جدول ۱: آنالیز تقریبی و محتوای هیدروکسی پرولین پوست، باله و استخوان در ماهی هوور *Thunnus tonggol* و کلاژن استخراج شده از هر یک از قسمت‌ها

	درصد ترکیبات تقریبی بر اساس وزن تر				هیدروکسی پرولین (mg/g sample)
	رطوبت	خاکستر	چربی	پروتئین	
پوست	۶۴/۰۸ ±۰/۰۵$^{n.s}$	۳/۲۳ ±۱/۴۱^{c}	۰/۹۸ ±۰/۲۳$^{n.s}$	۳۲/۰ ±۰/۱۹^{a}	۱۹/۵ ±۰/۴۱^{a}
باله	۶۳/۱۷ ±۰/۱۲$^{n.s}$	۷/۳۲ ±۱/۰۷^{b}	۱/۱۹ ±۰/۱۶$^{n.s}$	۱۶/۱۱ ±۰/۱۴^{b}	۱۲/۵ ±۰/۲۲^{b}
استخوان	۶۲/۲۷ ±۰/۲۹$^{n.s}$	۱۴/۴۰ ±۰/۶۵^{a}	۸/۷۷ ±۰/۴۶^{a}	۱۳/۳ ±۰/۴۳^{c}	۵/۷۱ ±۰/۲۳^{c}
کلاژن پوست	۷/۰۶ ±۰/۵۸	۰/۶۸ ±۰/۰۹	۰/۳۳ ±۰/۰۷	۰/۹۴ ±۰/۷۵	۵۸/۵ ±۰/۸۵^{a}
کلاژن باله	۵/۱۴ ±۰/۳۲	۰/۵۲ ±۰/۰۶	۰/۲۵ ±۰/۰۳	۸۶/۰۲ ±۰/۲۶	۴۹/۰۵ ±۰/۴۱^{b}
کلاژن استخوان	۱۱/۵۷ ±۰/۴۳	۰/۸۸ ±۰/۰۷	۰/۴۸ ±۰/۱۱	۸۴/۲ ±۱/۶۳	۴۲/۵ ±۰/۹۴^{c}

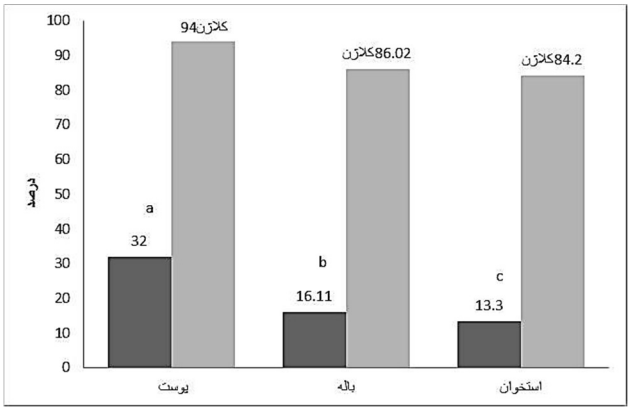
حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن است (P<۰/۰۵).

ترکیب اسیدهای آمینه پوست، باله و استخوان ماهی هوور در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ به‌صورت میزان اسی آمینه در ۱۰۰۰ قسمت رسوب نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اسیدآمینه گلیسین (Gly) به‌عنوان اسیدآمینه غالب در هر سه جزء وجود دارد و بعد از این اسیدآمینه اسیدهای آمینه آلانین، پرولین، گلوتامیک اسید و هیدروکسی پرولین در مقام‌های بعدی قرار خواهند گرفت. مقایسه کلاژن‌ها در سه تیمار نشان‌دهنده آن است که کلاژن پوست مقادیر بیشتری از هیدروکسی پرولین، پرولین و آرژنین داشته امّا مقادیر کمتری از گلیسین و هیدروکسی لیزین را دارد؛ و در مجموع با توجه به جدول ۱ پوست ماهی هوور دم دراز مقادیر بالاتری از کلاژن را در مقایسه با باله و استخوان داشته و از نظر آماری اختلاف معنی داری با دو بخش دیگر دارد (P<۰/۰۵).

الگوی الکتروفورز از پوست، باله و استخوان تحت شرایط کاهشی و غیر کاهشی در شکل ۱ نشان داده شده است. هیچ گونه اختلافی در الگوها بین کلاژن از پوست، باله و استخوان مشاهده نشد. هر سه کلاژن از پوست، باله و استخوان حداقل دو زنجیره متفاوت α شامل ۱ α و ۲ α را در برداشتند؛ و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین سه تیمار آزمایش وجود نداشت (P>۰/۰۵).



نمودار ۱: ترکیب اسیدهای آمینه در استخوان، باله و پوست ماهی هوور *Thunnus tonggol* به صورت میزان اسید آمینه در ۱۰۰۰ قسمت رسوب

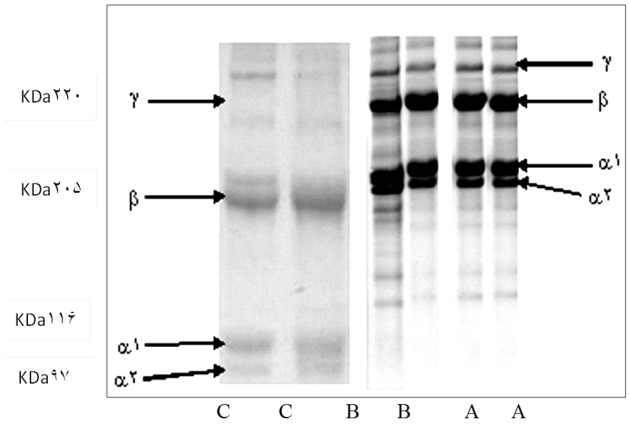


نمودار ۲: مقایسه درصد پروتئین نمونه ضایعات ماهی هوور *Thunnus tonggol* و کلاژن آن‌ها

۴. بحث و نتیجه گیری

تفاوت در مقادیر هیدروکسی پرولین بین دو گونه ممکن است به نوع گونه، درجه حرارت محیط و نیز بدن ماهی بستگی داشته باشد (Shahidi, 1994; Bailey et al., 1989; Morrissey et al., 2000). در آزمایش کنونی زمانی که کلاژن از پوست و استخوان استخراج شده، نکته حائز اهمیت آن است که میزان محصول کلاژن به‌دست آمده از پوست ماهی هوور دم دراز به مراتب بالاتر (به میزان ۱۰/۹٪) از مقدار آن در باله (۷/۵٪) و نیز استخوان ماهی هوور بود (۱/۶٪). میزان محصول کلاژن استخراج شده با محتوای هیدروکسی پرولین موجود در پوست، باله و استخوان ارتباط دارد. Sadowska و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کرده‌اند که محتوای هیدروکسی پرولین پوست ماهی کاد ۶/۱۴ میلی گرم بر هر گرم نمونه بود که این مقدار پایین‌تر از هیدروکسی پرولینی است که در پژوهش کنونی از پوست ماهی هوور دم دراز بدست آمده است (۱۹/۵ میلی گرم بر هر گرم نمونه). کلاژن استخراج شده از

پوست، باله و استخوان هر سه مقادیر خاکستر و چربی کمی داشته که این مسئله نشان‌دهنده تاثیر حذف مواد آلی و چربی از این مواد در حین عملیات استخراج کلاژن است. نمونه‌های کلاژن به‌دست آمده همچنین رطوبت کمتری داشته و محتوای پروتئینی آنها از ۸۴/۲٪ جهت استخوان، ۸۶/۰۲٪ جهت باله تا ۹۴ ٪ جهت پوست متغیر بوده است. افزایش میزان هیدروکسی پرولین در نمونه‌های کلاژن بطور کلی بواسطه افزایش محتوای پروتئینی آنها می‌باشد. محتوای گلیسین کلاژن از پوست، باله و استخوان بطور تقریبی ۳۰٪ کل اسیدهای آمینه است.



شکل ۱: الگوی الکتروفورز کلاژن از پوست (A)، باله (B) و استخون (C) ماهی هوور دم دراز *Thunnus tonggol*

به‌طور کلی گلیسین موجود نزدیک به یک سوم کل رسوب را به خود اختصاص داده است، مقادیر ایمینواسیدهای (منظور پرولین و هیدروکسی پرولین) کلاژن از پوست، باله و استخوان به ترتیب ۱۹۳، ۱۸۷ و ۱۶۳ قسمت در ۱۰۰۰ قسمت رسوب بوده که نسبت به میزان ایمینواسیدهای کلاژن پوست پستانداری مانند خوک پایین‌تر است (Ikoma et al., 2003). Foegeding و همکاران (۱۹۹۶) گزارش نموده‌اند که کلاژن ماهی دارای مقادیر ایمینواسیدهای کمتری در مقایسه با کلاژن پستانداران بوده و میزان ایمینواسیدهای کلاژن‌های جانوری با زیستگاه آن‌ها ارتباط دارد (Foegeding et al., 1996; Rigby, 1968). بر اساس مطالعه مذکور درجه هیدروکسیلاسیون پرولین در کلاژن از پوست، باله و استخوان به‌ترتیب ۳۹/۹٪، ۳۷/۳٪ و ۴۱/۱٪ می‌باشد. درجه هیدروکسیلاسیون لیزین در کلاژن پوست، باله و استخوان نیز به‌ترتیب ۲۴/۴٪، ۲۳/۶٪ و ۴۴/۴٪ خواهد بود. اکسید شدن پرولین و لیزین به ترکیبات هیدروکسی شده توسط «آنزیم پرولین هیدروکسیلاز و لیزین هیدروکسیلاز صورت می‌پذیرد (Burghagen, 1999; Foegeding et al., 1996; Pearson and young, 1989; Wong, 1989). تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که هیدروکسیلاسیون پرولین و لیزین کلاژن از استخوان آرام‌تر از کلاژن پوست انجام می‌شود. و پرولین هیدروکسیلاسیون شده نقش نگهدارنده مارپیچ سه گانه را ایفا می‌نماید و لیزین هیدورکسیلاسیون شده در تشکیل و نگه داشتن باندهای عرضی جهت ترکیب بادندهای غیر هیدروکسی شده شرکت می‌نماید (Ramachandran, 1988; Ciarlo et al., 1997; Kimura, 1985; Kimura and Ohno, 1987; Matsui et al., 1991; Nagai and Suzuki, 2000).

الگوهای الکتروفورز کلاژن از پوست، باله و استخوان تحت شرایط کاهشی و غیر کاهشی مشابه بوده و عدم حضور باندهای دی سولفید را نشان می‌دهند. این نتایج با نتایج گزارش شده در خصوص کلاژن ماهی هیک (Hake) و قزل آلا همخوانی دارد (Montero et al., 1990). به‌طور کلی کلاژن نوع I محتوی مقادیر کمتری از سیستئین (کمتر ۰/۲٪) و متیونین (۱/۳۳– ۱/۲۴٪) می‌باشد (Owusu–Apenten, 2002)، که نقش اساسی را در تشکیل باندهای دی سولفید ایفا می‌نمایند. البته کلاژن‌های نوع III و VI محتوی مقادیری سیستئین قابل اکسید شدن خواهند بود (Foegeding et al., 1996). بر اساس تجزیه و تحلیل انجام شده بر روی الگوهای الکتروفورز و ترکیبات واحدهای تشکیل دهنده می‌توان پیشنهاد نمود که کلاژن پوست، باله و استخوان ماهی هوور از نوع کلاژن نوع I باشد. کلاژن نوع I دارای دو زنجیره مشخص α ۱ و یک زنجیره α ۲ می‌باشد (Burghagen, 1999; Foegeding et al., 1996; Pearson and young, 1989; Wong, 1989). بررسی‌ها توسط محققین نشان داده است که بخش اعظم کلاژن پوست، باله و استخوان کلاژن نوع I می‌باشد (Ciarlo et al., 1997; Kimura and Ohno , 1987; Montero et al., 1990; Nagai and Suzuki, 2000). از تحقیقات می‌توان نتیجه گرفت که هر سه نمونه کلاژن از نظر مولکول‌های داخلی و میانی، وضعیت اتصالات عرضی و نیز ترکیبات β و γ غنی هستند. ماهیانی که گرسنگی کشیده باشند و یا تحت شرایط گرسنگی نگهداری شده باشند کلاژن بیشتری با یک درجه بزرگتر در اتصالات عرضی در مقایسه با ماهیانی که خوب تغذیه شده‌اند خواهند بود (Foegeding et al., 1996; Regenstein, 1991).

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش کنونی می‌توان چنین نتیجه گرفت که در ماهی هوور دم دراز *Thunnus tonggol* بیشترین

میزان رطوبت و پروتئین در پوست این ماهی وجود دارد در حالی که استخوان بالاترین میزان چربی و خاکستر را دارا می‌باشد. بررسی بر روی پوست، باله و استخوان در ماهی هوور دم دراز نشان داد که اسید آمینه غالب در هر سه بخش اسید آمینه گلیسین است و همچنین میزان هیدروکسی پرولین در پوست بیش از سایر قسمت‌ها می‌باشد که حاکی از این است که پوست در ماهی هوور دم دراز بالاترین میزان کلاژن را دارا است و کلاژن در هر سه قسمت پوست، باله و استخوان دارای حداقل دو زنجیره ۱ α و ۲ α می‌باشد.

۵. سپاسگزاری

از همکاری و مساعدت دلسوزانه هیئت مدیره محترم شرکت فرآورده‌های شیلاتی بندرعباس و پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

شهیری طبرستانی، ه.، ۱۳۸۷. خواص بیوشیمیایی کلاژن استخراج شده از پوست و استخوان ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*)؛ هجدهمین کنگره علوم و صنایع غذایی ایران؛ ۲۵-۲۴ مهرماه؛ مشهد.

Antonie F.R.; WeiC.I.; Littell R.C.; Marshall M.R.; 1999. HPLC method for analysis for free amino acids in fish using o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization.journal of Agricultural and food Chemistry, 47: 5100-5107

Burghagen, M., 1999. Collagen. In H. D. Belitz and W. Grosch (Eds.), Food chemistry (2nd ed., pp. 540–547). Berlin: Springer.

Ciarlo, A.S.; Paredi,M.E.; Fraga,A.N., 1997. Isolation of soluble collagen from hake skin (*Merluccius hubbsi*). Journal of Aquatic. Food Product Technology, 6(1): 65–77.

Foegeding, E.A.; Lanier, T.C.; Hultin, H.O., 1996. Collagen. In O. R. Fennema (Ed.), Food chemistry (3rd ed., pp. 902–906). New York: Marcel Dekker, Inc..

Go´ mez-Guille´n, M. C.; Montero, P., 2001. Extraction of gelatinfrom megrim (*Lepidorhombus boscii*) skins with several organicacids. Journal of Food Science, 66(2), 213–216. Hydrocolloids, 16, 25–34.

Hrckova, G., Velebny S.; Solar, P., 2008. Dynamics of hepatic stellate cells , collagen types I and III Synthesis and gene expression of selected cytokines during hepatic fibrogenesis kit following Mesocestoiddes vogae (cestoda) infection in mic Int J Parasitol; 121:181-92

Ikoma, T.; Kobayashi, H.; Tanaka, J.; Walsh, D.; Mann, S., 2003. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of keta). Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 99: 171– 174.

Kimura, S.; Ohno, Y., 1998. Fish skins type 1 Collagen .Comp Biochemister Physiol; 88: 27-34.

Kimura, S.Y., Miyauchi, N., Uchida., 2004. Scale and bone Type I collagens of carp (*Cyprinus carpio*). Comparative Biochemistry and Physiology, 99B: 473-476.

Montero, P.; Borderias, J.; Turnay, J.; Leyzarbe, M. A., 1990. Characterization of hake (*Merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb) collagen. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38: 604–609.

Morrissey, M.T.J.W.; Park, L.; Huang., 2000. Surimi processing waste: Its control and utilization. In J. W. Park (Ed.), Surimi and surimi seafood (pp. 127–166). New York: Marcel Dekker, Inc.

Nagai, T.; Suzuki, N., 2000. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. Food Chemistry, 68: 277–281.

Nagai, T.Y.; Araki, N.; Suzuki., 2002. Collagen of skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). Food Chemistry, 78: 173–177.

Nomura, Y.; H. Sakai, Y.; Ishii, K.; Shirai., 2000. Preparation and some properties of Type I collagen from ®sh scales. Bioscience, Biotechnology and

to fish technology. New York: Van Nostrand Reinhold, 499-508 pp.

Rigby, B.J., 1968. Amino-acid composition and thermal stability of the skin collagen of the Antarctic ice-fish. Nature, 219: 166–167.

Sadowska, M.; Kolodziejska, I.; Niecikowska, C., 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Chemistry, 81: 257–262.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shahidi, F., 1994. Seafood processing by-products. In F. Shahidi and J. R. Botta (Eds.), Seafoods chemistry, processing, technology and quality. pp: 320–334 Glasgow: Blackie Academic and Professional.

Biochemistry, 60: 2092-2094.

Omura, Y.N.; Urano, S.; Kimura., 2002. Occurrence of brillar collagen with structure of (a1)2a2 in the test of sea urchin Astheno-soma ijimai. Comparative Biochemistry and Physiology, 115B: 63-68.

Owusu-Apenten, 2002. Food protein analysis. New York: Marcel Dekker, Inc. *Pagrus major* and *Oreochromis niloiicas*. International Journal of Biological Macromolecules, 32: 199–204.

Piez, K.A., 1965. Characterization of a collagen from codfish skin containing three chromatographically different a chains. Biochem- istry, 4: 2590–2596.

Ramachandran, N., 1988. Stereochemistry of collagen. Journal of Peptide Protein Research, 31: 1–16.

Regenstein, J. M.; Regenstein, C.E., 1991. Introduction