Archive of SID

مقایسه درصد استخراج کلاژن محلول در اسید و پپسین از سه گونه ماهی کیلکای دریای خزر

معبود علی زاده نوده[۱]
جمیله پازوکی[۲*]

۱، ۲. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:**
pazooki2001@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۲۰
مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

پروتئین کلاژن محلول در اسید (ASC) و محلول در پپسین (PSC) از سه گونه ماهی کیلکای چشم درشت (*Clupeonella Grimmi*)، کیلکای معمولی (*Clupeonella Cultriventris*) و کیلکای آنچوی (*Clupeonella Engrauliformis*) که فراوان‌ترین گونه صیدشده از شگ ماهیان دریای خزر می‌باشند استخراج گردید. این ماهیان به‌صورت شبانه و با استفاده از شناورهای کیلکا گیر مجهز به تور قیفی و نور زیرآبی از دریای خزر (ایستگاه بندر امیرآباد) صید و برای استخراج کلاژن در سال ۱۳۹۰ به آزمایشگاه منتقل گردیدند. مقدار ۱۵ گرم از بافت‌های مخلوط بدن هرماهی توزین و ابتدا پروتئین‌های غیر کلاژنی و چربی آن‌ها جداسازی شد سپس کلاژن به روش اسیدی و آنزیمی با محلول اسید استیک ۰/۵ مولار استخراج و به‌وسیله نمک کلرید سدیم رسوب داده و با محلول ۰/۱ مولار اسید استیک و آب مقطر خالص‌سازی شد. نتایج نشان داد که کیلکای چشم درشت دارای بیشترین مقدار کلاژن به میزان ۴/۱۴ درصد، کیلکای معمولی و آنچوی با مقدار به ترتیب ۱/۰۴ درصد و ۰/۹۴ درصد بر پایه وزن خشک لیوفیلیز بودند. الگوی الکتروفورز (SDS–PAGE) نشان داد کلاژن استخراجی محتوی دو نوع زنجیره α و β در ساختمان خود بوده و این کلاژن به‌واسطه وجود زنجیره α_2 از نوع کلاژن نوع یک محسوب شد. ازاین‌رو کیلکا ماهیان به‌ویژه ماهی کیلکای چشم درشت را که نسبت به دو گونه دیگر دارای کلاژن بیشتری بود می‌توان به‌عنوان منبع کلاژن جهت استفاده‌های صنعتی و پزشکی معرفی نمود و جایگاه این ماهی را از منظر تجاری ارتقاء بخشید.

واژگان کلیدی: پروتئین، کلاژن، کیلکا ماهیان، دریای خزر.

مقدمه

کلاژن از فراوان‌ترین پروتئین‌های بدن حیوانات و نزدیک به ۳۰ درصد از کل پروتئین بدن آن‌ها را به خود اختصاص می‌دهد. از عناصر ساختاری مهم در پوست، استخوان، غضروف، تاندون، لیگامنت، رگ‌های خونی، دندان، قرنیه و سایر اندام‌های مهره‌داران به شمار می‌رود (Pati *et al*., 2010; Hashim *et al*., 2015; Nair *et al*., 2013; Jeong *et al*.). ساختار مولکولی آن متشکل از سه زنجیره پلی پپتیدی α که به‌صورت یک مارپیچ سه‌گانه راست‌گرد به همدیگر اتصال یافتند. کلاژن به‌عنوان یک ماده زیستی باارزش در زمینه‌های صنعتی مختلف به‌وفور استفاده می‌شود. بیشترین استفاده از آن در تولیدات دارویی است و همچنین در زمینه‌های صنعتی، تحقیقاتی، بیوتکنولوژی و تولید مواد آرایشی و خوراکی کاربرد زیادی دارد (Senaratne *et al*., 2006). تولید کلاژن موردنیاز تاکنون محدود به استخراج آن از پوست گاو و خوک بوده است. اخیراً به سبب گسترش بیماری‌های دام و طیور و امکان انتقال آن از این طریق به انسان و محدودیت‌های مذهبی پیش‌آمده موجب شد دانشمندان در پی جایگزین مناسب برای تولید کلاژن از یک منبع مناسب باشند (Martínez-Ortiz *et al*., 2015; Singh *et al*., 2010; Bae Zeng *et al*., 2009; *et al*., 2008;). ازاین‌رو ماهی‌ها تولیدکننده فراوان‌ترین مواد خام بوده و به دلیل دسترسی بالا به آن و عدم ریسک بیماری‌زایی و عدم محدودیت‌های مذهبی امکان تولید مقدار زیادی کلاژن از آن‌ها است (Senaratne *et al*., 2006). گزارش‌های بسیاری

www.SID.ir

Archive of SID

مبنی بر استخراج و خالص‌سازی پروتئین کلاژن محلول در اسید (ASC) و محلول در پپسین (PSC) از ارگانیسم‌های مهره‌دار و بی‌مهره دریایی همچون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)؛ (Wibawa *et al*., 2015; Duan *et al*., 2009)؛ ماهی seabass (*Lates calcarifer*) (Chuaychan *et al*., 2015)؛ ماهی مرکب، اسکوئید (*Sepioteuthis lessoniana*) (Ramasamy *et al*., 2014)؛ jellyfish (*Cyanea nozakii Kishinouye*) (Zhang *et al*., 2014)؛ خیار دریایی (*Stichopus vastus*، *Stichopus japonicus* و *Parastichopus californicus*) (Abedin *et al*., 2013; Liu *et al*., 2010; Cui *et al*., 2007) و دیگر موجودات دریایی انتشاریافته است. کیلکا ماهیان نیز متعلق به خانواده شگ ماهیان و از فراوان‌ترین ماهیان صیدشده در دریای خزر بوده و دارای بیشترین صید سالانه ماهی در دریای خزر هست. در حال حاضر تنها کمتر از ۵ درصد این ماهیان صیدشده به مصارف انسانی می‌رسند؛ و مابقی آن جهت تولید پودر ماهی وارد کارخانه‌ها می‌شود. با توجه به ذخایر فراوان این ماهیان در دریای خزر، سهم بالای ایران در برداشت آن، استفاده بهینه از این سرمایه ملی و جلوگیری از هدر رفت آن به‌عنوان منبع ارزشمند می‌توان با استخراج کلاژن از آن‌ها بخشی از نیازهای پروتئینی کشور را تأمین و همچنین موجب افزایش ارزش تجاری ماهی در آینده شد. به‌هرحال اطلاعات اندکی در مورد استخراج و خالص‌سازی کلاژن از ماهیان ریز به‌ویژه کیلکا ماهیان در دسترس است. این تحقیق باهدف مقایسه درصد استخراج کلاژن از بافت‌های مخلوط کیلکا ماهیان و اندازه‌گیری میزان کلاژن آن‌ها انجام‌شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های ماهی شامل سه گونه ماهی کیلکای چشم درشت (*Clupeonella Grimmi*)، کیلکای معمولی (*Clupeonella Cultriventris*) و کیلکای آنچوی (*Clupeonella Engrauliformis*) با استفاده از شناورهای کیلکا گیر مجهز به تور قیفی و نور زیرآبی در استان مازندران (بندر امیرآباد) صید شد. بلافاصله نمونه‌های صیدشده با کیسه‌های پلی‌اتیلنی بسته‌بندی و در جعبه‌های حاوی یخ و عایق گرما به آزمایشگاه تحقیقات آبزیان دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی منتقل شد. نمونه‌های صیدشده در آزمایشگاه با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر شناسایی گردید (نادری جلودار و عبدلی، ۱۳۸۳؛ Whitehead, 1985). در محل آزمایشگاه ابتدا سر ماهی جدا و امعاء و احشاء آن تخلیه شد. پس از شستشو با آب سرد آن را به قطعات ۰/۵×۰/۵ سانتیمتر خردکرده و در دمای ۲۰- درجه جهت انجام مراحل بعدی تحقیق نگهداری شدند.

استخراج کلاژن به روش Nagai and Suzuki (Nagai and Suzuki, 2000) باکمی تغییرات انجام شد. درجه حرارت در تمامی مراحل آن ۴ درجه سانتی‌گراد بود.نمونه‌های بافتی آماده‌شده با محلول ۰/۱ مولار هیدروکسید سدیم (NaOH) با نسبت وزن به حجم ۱: ۳۰ به مدت ۴۸ ساعت بر روی دستگاه شیکر قرار داده شد. به‌منظور برداشت پروتئین‌های غیر کلاژنی و رنگ‌دانه‌های بافتی محلول هیدروکسید سدیم در هر ۸ ساعت تعویض می‌شد. در پایان هر مرحله نمونه‌ها با آب سرد شستشو داده می‌شدند تا به pH خنثی برسند. جهت چربی زدایی نمونه‌های مذکور به آن‌ها محلول بوتیل الکل ۱۰ درصد به نسبت وزن به حجم ۱: ۳۰ اضافه شد. سپس بر روی دستگاه شیکر قرار گرفت. محلول بوتیل الکل جهت افزایش کارایی در هر ۸ ساعت تعویض می‌شد. نمونه با آب مقطر شستشو و آماده ورود به مرحله بعدی گردید (Nagai and Suzuki, 2000). به نمونه‌های تیمار یافته از مرحله قبل در محلول اسید استیک ۰/۵ مولار با نسبت نمونه به حجم ۱: ۱۵ اضافه گردید و به مدت ۳ روز متوالی بر روی دستگاه شیکر در تکان مداوم قرار گرفت این عمل سبب افزایش میزان استخراج کلاژن می‌گردد. پس از گذشت زمان فوق محلول کلاژن به‌وسیله پارچه تنظیف صاف گردید و در ظرف شیشه‌ای مناسب در دمای ۴ درجه یخچال نگهداری شد. بافت باقیمانده را دوباره در محلول ۰/۵ مولار اسید استیک به مدت دو روز دیگر به‌صورت متوالی قرار داده و مجدداً کلاژن استخراج یافت. پس از پایان زمان موردنظر کلاژن محلول جدا یافته و به محلول قبلی اضافه گردید؛ و باقیمانده بافتی جهت استخراج کلاژن محلول در پپسین نگهداری شد. کلاژن با اضافه کردن نمک به

www.SID.ir

Archive of SID

محلول به دست می‌آید برای رسوب کامل کلاژن ابتدا آن را به غلظت ۰/۹ مولار نمک رسانده و پس از گذشت ۳۰ دقیقه محلول را به غلظت ۲/۶ مولار نمک به همراه Tris-HCl ۰/۰۵ مولار (pH= ۷/۵) رسانده تا به‌طور کامل رسوب یابد. سپس محلول با دور ۱۰٬۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت سانتریفیوژ شد. درنهایت رسوب کلاژن در محلول ۰/۵ مولار اسید استیک حل گردید. عملیات دیالیز و خالص‌سازی کلاژن به‌وسیله کیسه دیالیز (قطر منفذ ۱۰٬۰۰۰ دالتون) با محلول ۰/۱ مولار اسید استیک به مدت ۲۴ ساعت، تعویض محلول در هر ۴ ساعت و همچنین با آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت و تعویض محلول در هر ۲ ساعت انجام یافت تا محلول ژله‌ای به اسیدیته خنثی برسد. ماده ژله‌ای به‌دست‌آمده لیوفیلیز شده و کلاژن محلول در اسید به دست آمد (Nagai and Suzuki, 2000).

مواد به‌جامانده از مراحل قبلی جهت استخراج کلاژن محلول در پپسین به کار رفت. در این مرحله بافت‌ها در محلول ۰/۵ مولار اسید استیک و محلول ۰/۱ درصد آنزیم پپسین (Pepsin, 0/7 FIP-U/mg, Merck, 1/07185) با نسبت ۱: ۱۵ (وزن به حجم) به مدت دو روز متوالی بر روی دستگاه شیکر در تکان مداوم قرار گرفت. درنهایت پس از اتمام زمان موردنظر محلول کلاژن به‌وسیله پارچه تنظیف دولایه صاف‌شده و در ظروف مناسب در دمای ۴ درجه نگهداری شد. انجام بقیه مراحل استخراج همانند کلاژن محلول در اسید بود. درنهایت کلاژن به‌دست‌آمده لیوفیلیز شده و کلاژن محلول در پپسین به دست آمد (Nagai and Suzuki, 2000). فرایند الکتروفورز عمودی مطابق با روش Laemmli (Laemmli, 1970) با استفاده از ژل فوقانی ۴ درصد و ژل تحتانی ۷/۵ درصد انجام یافت. برای تهیه نمونه کلاژن جهت تعیین وزن مولکولی آن مقدار ۵۰ میکرو لیتر از کلاژن دیالیز شده را با ۱۰ میکرو لیتر سدیم دودسیل سولفات ۱۰ درصد و ۳ میکرو لیتر ۲- مرکاپتواتانول مخلوط کرده و مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. در ادامه ۵۰ میکرو لیتر گلیسرول ۲۰ درصد و ۱۰ میکرو لیتر برمو فنول بلو ۰/۰۵ درصد به آن اضافه شد. مقدار ۱۵ میکرو لیتر از نمونه آماده را جهت انجام الکتروفورز به چاهک‌ها تزریق شد. جهت شناسایی باندهای پروتئین از رنگ کو ماسی بلو استفاده گردید؛ و مقدار ۰/۲ گرم از رنگ کو ماسی برلیانت بلو R-250 را در محلول‌های آب، متانول، اسید استیک به ترتیب با نسبت (۵:۴:۱) مخلوط نموده و با قرار دادن ژل در درون آن رنگ‌آمیزی انجام شد. پس از پایان مرحله رنگ‌آمیزی برای نمایان شدن باندهای پروتئین از محلول رنگ‌بر استفاده گردید. این محلول از مخلوط محلول‌های متانول، آب، اسید استیک با نسبت (۴: ۵:۱) به دست می‌آید. نتایج و داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش‌ها تحت آنالیزهای آماری و با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS ویرایش نوزدهم و EXCEL۲۰۱۰ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. تفاوت میزان کلاژن به‌دست‌آمده از سه گونه ماهی کیلکا با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way Anova) در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت اندازه‌گیری اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده شد. برای این کار ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون Shapiro- wilk بررسی شد تا داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردار باشند.

نتایج

نتایج آزمایش‌های فوق نشان داد بافت‌های مخلوط کیلکا ماهیان در محلول ۰/۵ مولار اسید استیک به مقدار زیادی حل می‌شود. بر این اساس مقدار کلاژن محلول در اسید (ASC) در سه گونه ماهی کیلکای چشم درشت، کیلکای آنچوی و کیلکای معمولی به ترتیب حدود ۳/۱۵، ۰/۶۳ و ۰/۶۲ درصد بر پایه وزن خشک لیوفیلیز شده وکلاژن محلول در پپسین که در راستای تکمیل فرایند حلالیت کلاژن انجام‌یافته است به ترتیب حدود ۰/۹۸، ۰/۳۱ و ۰/۴۲ درصد بر پایه وزن خشک لیوفیلیز شده به دست آمد که حلالیت کمی در مقایسه با کلاژن محلول در اسید داشت. مجموع کلاژن به‌دست‌آمده از این ماهیان نیز به ترتیب به میزان ۴/۱۴، ۰/۹۴ و ۱/۰۴ درصد بر پایه وزن خشک لیوفیلیز شده محاسبه شد (جدول ۱).

www.SID.ir

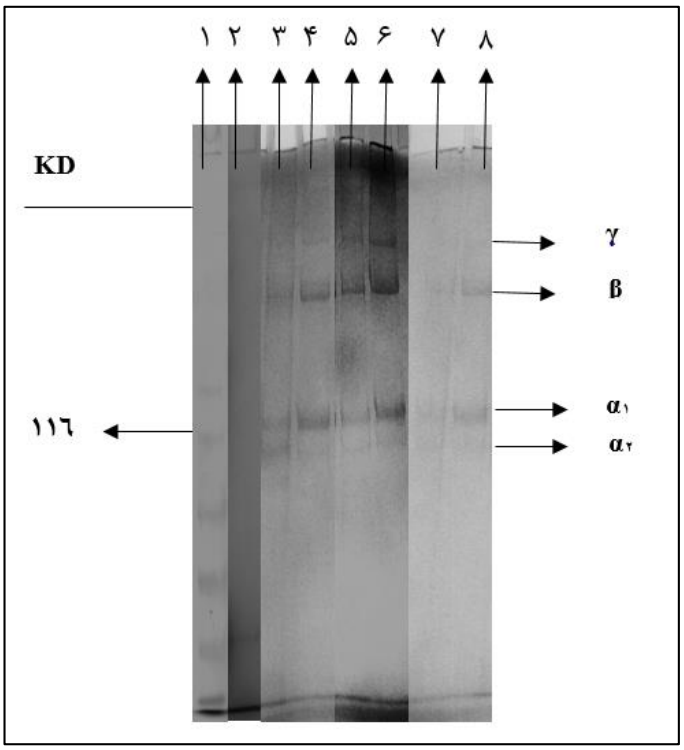
Archive of SID

جدول ۱: مقادیر کلاژن (درصد بر پایه وزن خشک) به‌دست‌آمده از سه گونه ماهی کیلکا (میانگین ± انحراف معیار) در سال ۱۳۹۰.

ماهی	ASC	PSC	ASC + PSC
کیلکای معمولی (*Clupeonella Cultriventris*)	۰/۶۲ ± ۰/۰۴ [a]	۰/۴۲ ± ۰/۰۰۵ [a]	۱/۰۴ ± ۰/۰۴ [a]
کیلکای آنچوی (*Clupeonella Engrauliformis*)	۰/۶۳ ± ۰/۰۵ [a]	۰/۳۱ ± ۰/۰۳ [a]	۰/۹۴ ± ۰/۰۳ [a]
کیلکای چشم درشت (*Clupeonella Grimmi*)	۳/۱۵ ± ۰/۰۸۷ [b]	۰/۹۸ ± ۰/۲۳ [b]	۴/۱۴ ± ۰/۲۹ [b]

حروف متفاوت در کنار اعداد هر ردیف نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار و اعداد با حروف یکسان نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار است.

تعیین وزن مولکولی کلاژن به‌دست‌آمده به‌وسیله الکتروفورز (SDS – PAGE) انجام شد و نشان داد که هر دو کلاژن محلول در اسید (ASC) و کلاژن محلول در پپسین (PSC) در ساختمان مولکولی خود دارای زنجیره α می‌باشند. وجود زنجیره α_1 و α_2 در ساختمان کلاژن نشان داد که کلاژن به‌دست‌آمده از سه گونه ماهی کیلکا، کلاژن نوع یک است. بعلاوه مقدار کوچکی زنجیره β و γ در ساختمان کلاژن محلول در اسید دیده شد که حاکی از وجود پیوندهای بین‌مولکولی و فرا مولکولی در ساختمان کلاژن می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱: الگوی الکتروفورز کلاژن سه گونه ماهی کیلکا در ۱۳۹۰.

۱) پروتئین استاندارد با وزن مولکولی، بالا ۲) شاهد رنگی، ۳) کلاژن محلول در پپسین کیلکای آنچوی (*Clupeonella Engrauliformis*)، ۴) کلاژن محلول در اسید کیلکای آنچوی (*Clupeonella Engrauliformis*)، ۵) کلاژن محلول در پپسین کیلکای معمولی (*Clupeonella Cultriventris*)، ۶) کلاژن محلول در اسید کیلکای معمولی (*Clupeonella Cultriventris*)، ۷) کلاژن محلول در پپسین کیلکای چشم درشت (*Clupeonella Grimmi*)، ۸) کلاژن محلول در اسید کیلکای چشم درشت (*Clupeonella Grimmi*)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

پروتئین کلاژن محلول در اسید (ASC) و محلول در پپسین (PSC) به‌دست‌آمده از بافت‌های مخلوط بدن هرماهی کیلکا به‌وسیله ژل الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید (SDS – PAGE) با ژل ۷/۵ درصد جهت شناسایی و تعیین وزن مولکولی آن‌ها انجام شد. الگوی SDS – PAGE نشان داد که هرکدام از کلاژن‌های محلول در اسید و پسین در ساختمان پلی پپتی یدی خود دارای دوزنجیره α (α_1 و α_2) می‌باشند. بر اساس حرکت الکتروفورزی و ساختمان زنجیره آن گفته می‌شود چگالی زنجیره α_1 بیشتر از α_2 بوده و گمان می‌رود که کلاژن حاصله از بافت مخلوط کیلکا ماهی کلاژن نوع اول باشد. حرکت الکتروفورزی دوزنجیره‌ی α_1 و α_2 در کلاژن محلول در اسید و پپسین باهم مشابه و همسان می‌باشند و این ممکن است نشان از ساختمان اولیه مشابه آن باشد. بعلاوه نتایج الکتروفورزی نشان داد که مقدار کوچکی زنجیره β و γ در ساختمان کلاژن محلول در اسید وجود دارد که حاکی از وجود پیوندهای بین‌مولکولی و فرا مولکولی در ساختمان کلاژن است که در محلول اسیدی حل نشدند اما در کلاژن محلول در پپسین این دوزنجیره مذکور دیده نشد و این نشان‌دهنده آن است که محلول آنزیمی در حلالیت کلاژن باقیمانده مؤثر و تأثیرگذار بوده است (شکل ۱). نتایج الگوی الکتروفورزی پروتئین کلاژن به‌دست‌آمده از سه گونه ماهی کیلکا کاملاً مشابه با کلاژن سایر ماهیان مثل ماهی albacore tuna (*Thunnus alalunga*)؛ arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*)؛ striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)؛ Baltic cod (*Gadus morhua*)؛ Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) است (Singh *et al*., 2010; Zelechowska *et al*., 2010; Zeng *et al*., 2009; Nalinanon *et al*., 2010a). وجود زنجیره α_3 که دارای وزن مولکولی و حرکت مشابه با زنجیره α_1 هست تحت وضعیت الکتروفورزی قابل‌تشخیص و شناسایی نیست و نیاز به فن‌های قوی‌تر دارد (Ogawa *et al*., 2004; Duan *et a*l., 2009).

استفاده از ماهیان استخوانی کوچک همواره با مشکلاتی روبرو بوده است. در زمینه‌های صنعتی به دلیل اندازه کوچک، سخت بودن جداسازی استخوان و پوست آن‌ها و صرف هزینه زیاد باعث شده مصرف خوراکی کمتری داشته باشند (Okada *et al*., 1988). با توجه به صید فراوان ماهی کیلکا و افزایش تحقیقات در پی مصرف بهینه آن‌ها به استخراج و خالص‌سازی کلاژن از بافت‌های مخلوط ماهی کیلکا پرداخته شد و طی آن از کل ماهی به جزء سر و احشاء بدن برای استخراج کلاژن استفاده گردید. از مزایای این روش استفاده از کل بافت‌های ماهی برای استخراج کلاژن بوده و ضایعات ایجادشده در آن کمتراست. هزینه فراوری آن کم و نیاز به تجهیزات پیشرفته جهت جداسازی اندام‌های ماهی نیست. این در حالی است که در تحقیقات قبلی تنها به استخراج کلاژن از یک بافت مجزا مثل پوست‌واستخوان پرداخته می‌شد، بنابراین با توجه به اینکه یک موجود از بافت‌های مختلف نرم و سخت تشکیل می‌شود می‌توان از این روش برای استحصال و استخراج پروتئین‌های کلاژن از آن‌ها در کنار هم استفاده نمود و یا حداقل اینکه از همه بافت‌های سخت و یا بافت‌های نرم به‌صورت یکجا اما جدا از هم‌جهت استخراج کلاژن استفاده کرد. مقدار پروتئین کلاژن به‌دست‌آمده از این سه گونه ماهی کیلکا با همدیگر متفاوت و نسبت به کلاژن استخراج‌شده از برخی بی‌مهرگان آبزی و ماهیان ریز نزدیک هست اما نسبت به برخی از ماهیان استخوانی و غضروفی دارای مقدار کمی کلاژن می‌باشند. مجموع کلاژن به‌دست‌آمده از سه گونه ماهی کیلکای چشم درشت، کیلکای معمولی و کیلکای آنچوی به ترتیب برابر با ۴/۱۴ درصد، ۱/۰۴ درصد و ۰/۹۴ درصد بر پایه وزن خشک هست که نسبت به کلاژن استحصال‌شده از ماهیچه ماهی *Salmo gairdnerii*، ۰/۴۷ درصد و ماهیچه *Scomber japonicus*، ۰/۵۰ درصد؛ ماهیچه *Cyprinus carpio*، ۰/۶۰ درصد (Sato *et al*., 1986)؛ استخوان و فلس *Cyprinus carpio* به ترتیب ۱/۰۶ درصد و ۱/۳۵ درصد (Duan *et al*., 2009)؛ ماهی *Rutiluse rutiluse* و پوست *Brama australis* هردو دارای کلاژن ۱/۵ درصد (Majewski and Felisiak 2007; Sionkowska *et al*., 2015) و همچنین کلاژن به‌دست‌آمده از برخی بی‌مهرگان آبزی مثل کلاژن محلول در اسید *Nerita crepidularia*، ۱/۷۸ درصد (Palpandi *et al*., 2010)، دارای مقادیر بالاتری کلاژن است. از طرفی نسبت به کلاژن به‌دست‌آمده

www.SID.ir

Archive of SID

از پوست ماهی *Takifugu rubripes*، ۱۰/۷ درصد؛ *Pogonias cromis*، ۱۸/۱ درصد؛ *Archosargus probatocephalus*، ۳۱/۹ درصد؛ *Ctenopharyngodon idella*، ۸ درصد؛ *teolabrax japonicus*، ۵۴/۱ درصد؛ *Scomber japonicus*، ۴۹/۸ درصد؛ *Heterodontus japonicus*، ۵۰/۱ درصد؛ *Lates niloticus*، ۵۸/۷ درصد؛ *Catla catla*، ۲۶/۱۰ درصد و *Cirrhinus mrigala*، ۲۲/۹۰ درصد (Ogawa *et al*., 2003; Mahboob, 2015; Muyonga *et al*., 2004; Nagai and Suzuki, 2000)، ماهیان کیلکا دارای درصد پایین‌تری کلاژن هستند. بررسی‌های انجام‌یافته نشان داد که کلاژن حاصل از بافت مخلوط کیلکا ماهیان نسبت به برخی از ماهیان استخوانی دارای مقادیر کمتری کلاژن هستند که این به دلایل زیر یک امر طبیعی هست: ۱- مواد اولیه به‌کاررفته در این تحقیق بافت مخلوط کل بدن ماهی کیلکا بود که درصد بیشتری از آن را بافت‌های ماهیچه تشکیل می‌دادند. با توجه به اینکه ماهیچه مهره‌داران نسبت به سایر بافت‌های بدن دارای مقادیر کمتری کلاژن است، به دست آمدن چنین نتیجه‌ای منطقی است. این نتایج کاملاً مشابه با مطالعات انجام‌یافته توسط Sato و همکاران (۱۹۸۶) هست که نشان می‌دهد مقدار کلاژن در ماهیچه ماهیان مختلف متفاوت بوده و مقدار کمی کلاژن است و بین مقادیر ۰/۳۴ تا ۲/۱۹ درصد بر پایه وزن مرطوب متغیر است. ۲- Sato و همکاران (۱۹۸۶) در ادامه مطالعاتشان نشان می‌دهند که ماهی ساردین، Chub mackerel، horse mackerel دارای محتوای کلاژنی کمی هستند و به این دلیل ساختمان و حالت بافت بدنی آن‌ها نازک و نرم است و در مورد ماهیانی که دارای محتوای کلاژنی بالاتری در ساختمان بدن خود می‌باشند دارای بافت بدنی محکمی هستند؛ بنابراین مطالعات انجام‌یافته نشان می‌دهد که بین محتوای کلاژن و استحکام بافت بدنی ارتباط وجود دارد. ماهی کیلکا نیز دارای بافت بدنی نازک و نرمی بوده و از استحکام بافتی برخوردار نیستند؛ که می‌تواند ناشی از محتوای کم کلاژن آن باشد. با توجه به صید انبوه ماهیان کوچک‌جثه و پایین بودن مصرف خوراکی آن‌ها، بهره‌وری ازاین‌گونه‌ها در صنایع مختلف مانند استخراج ترکیبات زیست فعال می‌تواند موردتوجه باشد. با بررسی میزان کلاژن بین سه گونه ماهی کیلکا مشخص شد که کیلکای چشم درشت نسبت به دو ماهی کیلکای دیگر دارای مقدار کلاژن بیشتری است. لذا به نظر می‌رسد که بدون مصرف هزینه جداسازی و تفکیک بافت‌ها در ماهیان ریز می‌توان به مقدار قابل‌توجهی کلاژن دست‌یافت که ازنظر ساختاری با کلاژن به‌دست‌آمده طی تحقیق‌های انجام‌شده از هر یک از بافت‌های سایر ماهیان قابل‌مقایسه است و با توجه به میزان ذخایر بالای کیلکا در دریای خزر و بالا بودن صید می‌توان با برنامه‌ریزی و به‌کارگیری روش‌های نه‌چندان پیچیده به استخراج این پروتئین مفید پرداخت.

منابع

نادری جلودار، م. و عبدلی، ع.أ.، ۱۳۸۳. اطلس ماهیان حوزه جنوبی دریای خزر (آب‌های ایران). موسسه تحقیقات شیلات ایران، صفحات ۱۵۰– ۲۵.

Abedin, M. Z., Karim, A. A., Ahmed, F., Latiff, A. A., Gan, C. Y., Ghazali, F. C. and Sarker, M. Z. I., 2013. Isolation and characterization of pepsin-solubilized collagen from the integument of sea cucumber (*Stichopus vastus*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 93(5):1083-8.

Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A. and Hara, K., 2008. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. Food Chemistry, 108: 49–54.

Chuaychan, S., Benjakul, S., Kishimura, H., 2015. Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (Lates calcarifer). LWT - Food Science and Technology, 63: 71-76.

Cui, F. X., Xue, C. H., Li, Z. J., Zhang, Y. Q., Dong, P., Fu, X. Y. and Gao, X., 2007. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber (*Stichopus japonicas*). Food Chemistry, 100(3): 1120–1125.

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.

Hashim, P., Mohd Ridzwan, M. S., Bakar, J. and Mat Hashim, D., 2015. Collagen in food and beverage industries. International Food Research Journal, 22(1): 1 – 8.

www.SID.ir

Archive of SID

Jeong, H., Venkatesan, J. and Kim, S., 2013. Isolation and Characterization of Collagen from Marine Fish (*Thunnus obesus*). Biotechnology and Bioprocess Engineering, 18: 1185-1191.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. Nature, 27:7680 – 685.

Liu, Z., Oliveira, A. C. and Su, Y. C., 2010. Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 58(2):1270-4.

Mahboob, S., 2015. Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. Journal of Food Science and Technology, 52(7):4296–4305.

Majewski, J. and Felisiak, K., 2007. Seasonal Changes in Collagen Fat and Water Content in Roach Tissues and Their I nfluence on the Deheading Cut Work. Acta scientiarum Polonorum. Piscaria, 6(2): 15-22.

Martínez-Ortiz, M. A., Hernández-Fuentes, A. D., Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Vargas-Torres, A. and Aguirre-Álvarez, G., 2015. Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: partial characterization. CyTA – Journal of Food, 13(2): 253–258.

Muyonga, J. H., Cole, C. G. B. and Duodu, K. G., 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). Food chemistry, 86: 325–332.

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

Nair, R., Sevukarajan M. and Kumar, T. M., 2010. Collagen based drug Delivery systems. A reviewJITPS,1(7): 288-304.

Nalinanon, S., Benjakul, S. and Kishimura, H., 2010a. Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) stomach. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90: 1492-1500.

Ogawa, M., Moody, M. W., Portier, R. J., Bell, J., Schexnayder, M. A. and Losso, J. N., 2003. Biochemical Properties of Black Drum and Sheepshead Seabream Skin Collagen. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 8088-8092.

Ogawa, M., Portier, R. J., Moody, M.W., Bell, J., Schexnayder, M. A. and Losso, J. N., 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). Food chemistry, 88: 495–501.

Okada, M., Machino, T. and Kato, S., 1988. Bone Softening, a Practical Way to Utilize Small Fish. Marine Fisheries Review, 50(3): 1-7.

Palpandi, C., Ramasamy, P., Rajinikanth, T. and Vairamani, S., 2010. Extraction of Collagen from Mangrove Archeaogastropod Nerita (Dostia) crepidularia Lamarck, 1822. American-Eurasian Journal of Scientific Research, 5(1): 23-30.

Pati, F., Adhikari, B. and Dhara, S., 2010. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. Bioresource Technology, 101: 3737- 3742.

Potaros, T., Raksakultahi, N., Runglerdkreangkrai, J. and Worawattanamateekul, W., 2009. Characteristics of Collagen from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin isolated by two different Methods. Kasetsart Journal (Natural Science), 43: 584-593.

Ramasamy, P., Subhapradha, N., Shanmugam, V. and Shanmugam, A., 2014. Isolation and structural characterisation of acid- and pepsin-soluble collagen from the skin of squid *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson, 1830). Natural Product Research**,** 28(11):838-42.

Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M. and Ikeda, S., 1986. ASimplified Method for Determining Collagen in Fish Muscle. Bulletin of the japanese society of scientific fisheries, 52(5): 889-893.

Senaratne, L. S., Park, P. J. and Kim, S. K., 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. Bioresource Technology, 97: 191–197.

www.SID.ir

Archive of SID

Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S. and Kishimura, H., 2010. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Food chemistry, 124: 97–105.

Sionkowska, A., Kozlowska, J., Skorupska, M. and Michalska, M., 2015. Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. International Journal of Biological Macromolecules, 80: 605 – 609.

Wibawa, S. F., Retnoningrum, D. S. and Suhartono, M. T., 2015. Acid Soluble Collagen from Skin of Common Carp (*Cyprinus carpio* L), Red Snapper (*Lutjanus sp*.) And Milkfish (*Chanos chanos*). World Applied Sciences Journal, 33 (6): 990-995.

Whitehead, P. J. P., 1985. Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeioidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings., Part 1-Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. FAO Fisheries Synopsis, 125(7/1):1-303.

Zelechowska, E., Sadowska, M. and Turk, M., 2010. Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food chemistry, 24: 325–329.

Zhang, J., Duan, R., Huang, L., Song, Y. and Regenstein, J. M., 2014. Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii Kishinouye*). Food chemistry, 150:22-6.

Zeng, S. K., Zhang, C. H., Lin, H.,Yang, P. Hong, P. Z. and Z. Jiang, 2009. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Food chemistry, 116: 879–883.

www.SID.ir