

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

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 زیست‌شناسی 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

تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۰

* نویسنده مسوول

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۹

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

چکیده

پژوهش کنونی به منظور 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 حالی که 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 $\alpha 1$ و $\alpha 2$ هستند.

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

۱. مقدمه

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 کیسه‌ی هوایی ماهی خاویار هنوز به‌طور تجاری در تصفیه نوبه‌های الکلی به کار می‌رود. کلاژن محلول پوست ماهی به‌طور وسیعی مطالعه شده است و به‌طور 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 هم‌چنین 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 هور در هرمزگان تشکیل می‌دهد (سازمان شیلات ایران: ۱۳۸۹). ماهی هور 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 قزل‌آلای رنگین‌کمان اشاره نمود که توسط هدی شهیری طبرستانی (۱۳۸۷) که به‌منظور استفاده بهینه از فرآورده‌های جانبی ماهی، کلاژن اسیدی (ASC)، از پوست و استخوان ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus*)

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 مصرف‌کنندگان 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 ژله‌کنندگی 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 هیدروکسی پرولین کلاژن در ماهی سیاه و سرگوسفندی کاملاً 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 گلاسیین ۱/۳ به‌عنوان اسیدآمینه اصلی و متیونین بسیار کم، تیروزین و هیستیدین مانند سایر کلاژن‌ها 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

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 نمونه‌ها مجدداً 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 سانتریفوژ 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

(mykiss) جداسازی گردید اشاره نمود. بازده استخراج کلاژن در مورد پوست و استخوان به ترتیب ۹/۴۸٪ 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 به وجود 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 برابر ۰/۸۴۴٪ 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 منظور جداسازی 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

برای اندازه‌گیری خاکستر، بوته‌ها را پس از خشک شدن داخل آن (مانند رطوبت) در دسیکاتور خنک کرده و وزن نموده، سپس نمونه داخل آن را توزین کرده، سپس بوته‌ها را روی شعله قرار می‌دهیم و می‌گذاریم 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 550°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:

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

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 110°C درجه سانتیگراد با استفاده از اسید هیدروکلریک 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 به دست 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

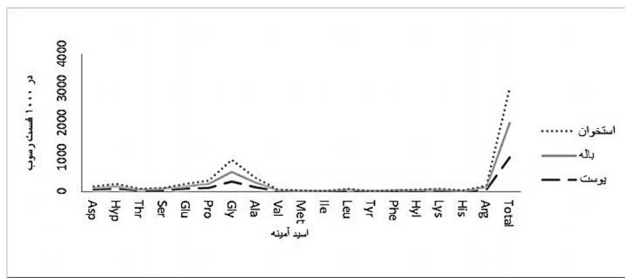
نتایج نشان داد که پوست از مقادیر بیشتری رطوبت برخوردار است اما از نظر آماری اختلاف معنی داری بین رطوبت پوست، باله و استخوان وجود ندارد ($P > 0.05$)، در حالی که استخوان در مقایسه با باله و پوست محتوای خاکستر و چربی بیشتری را نشان داد و از این نظر با پوست و باله از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشت ($P < 0.05$). در مقابل میزان پروتئین پوست و باله از استخوان بیشتر بوده و درصد پروتئین پوست اختلاف معنی داری

شستشو گردید. در نهایت نیز مواد باقی مانده با سانتریفیوژ با دور 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 ($\text{pH} = 7.2$) حاوی یک درصد SDS و اوره ۳/۵ مولار حل شده، الکتروفورز نیز بر روی ژل‌های ۵/۳ در بافر فسفات ۰/۱ مولار ($\text{pH} = 7.2$) حاوی SDS یک درصد انجام شد. پس از تهیه ژل تصویر دو بعدی ملاحظه شده در الکتروفورز مورد بررسی و تفسیر قرار گرفت.

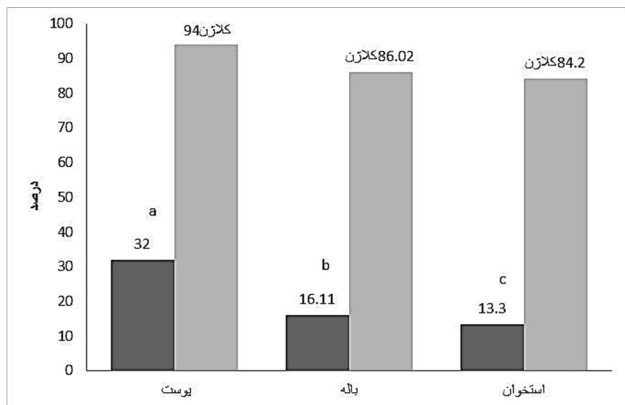
پس از تهیه ژل به منظور رنگ آمیزی آن، ژل را به مدت ۱۰ دقیقه در محلول آب مقطر حاوی اتیدیوم برمایید قرار داده و سپس با آب مقطر خالص شستشو داده و به وسیله دستگاه ژل داکتیو متر بدینوسیله نور UV باندهای پروتئین کلاژن را مشاهده و بررسی گردید. در روش مطلوب محلول سازی برای الکتروفورز دو بعدی باید تمام پیوندهای غیرکوالانت در کمپلکس‌های پروتئینی شکسته شده و تجمع‌های 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 اندازه‌گیری 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:

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



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



نمودار ۲: مقایسه درصد پروتئین نمونه ضایعات ماهی هورور *Thunnus tonggol* و کلژن 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 کلژن از پوست و استخوان استخراج شده، نکته حائز اهمیت آن است که میزان محصول کلژن به دست آمده از پوست ماهی هورور دم دراز به مراتب بالاتر (به میزان ۱۰/۹٪) از مقدار آن در باله (۷/۵٪) و نیز استخوان ماهی هورور بود (۱/۶٪). میزان محصول کلژن 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 هورور دم دراز بدست آمده است (۱۹/۵ میلی گرم بر هر گرم نمونه). کلژن استخراج شده از

با میزان پروتئین باله و استخوان از خود نشان داد ($P < 0/05$). نتایج حاصل از آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد پوست ماهی هورور دم دراز مقادیر بالاتری از هیدروکسی پرولین را نسبت به باله و استخوان داشته و از نظر آماری اختلاف معنی داری بین پوست ماهی هورور و بخش‌های دیگر یعنی باله و استخوان وجود دارد ($P < 0/05$).

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

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

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن است ($P < 0/05$).

ترکیب اسیدهای آمینه پوست، باله و استخوان ماهی هورور در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ به صورت میزان اسی آمینه در ۱۰۰۰ قسمت رسوب نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اسید آمینه گلیسین (Gly) به عنوان اسید آمینه غالب در هر سه جزء وجود دارد و بعد از این اسید آمینه اسیدهای آمینه آلانین، پرولین، گلوتامیک اسید و هیدروکسی پرولین در مقام‌های بعدی قرار خواهند گرفت. مقایسه کلژن‌ها در سه تیمار نشان‌دهنده آن است که کلژن پوست مقادیر بیشتری از هیدروکسی پرولین، پرولین و آرژنین داشته اما مقادیر کمتری از گلیسین و هیدروکسی لیزین را دارد؛ و در مجموع با توجه به جدول ۱ پوست ماهی هورور دم دراز مقادیر بالاتری از کلژن را در مقایسه با باله و استخوان داشته و از نظر آماری اختلاف معنی داری با دو بخش دیگر دارد ($P < 0/05$).

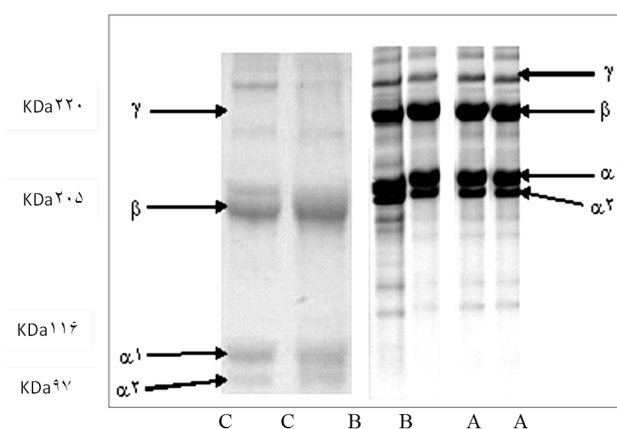
الگوی الکتروفورز از پوست، باله و استخوان تحت شرایط کاهشی و غیر کاهشی در شکل ۱ نشان داده شده است. هیچ گونه اختلافی در الگوها بین کلژن از پوست، باله و استخوان مشاهده نشد. هر سه کلژن از پوست، باله و استخوان حداقل دو زنجیره متفاوت α شامل $\alpha 1$ و $\alpha 2$ را در برداشتند؛ و از نظر آماری اختلاف معنی داری بین سه تیمار آزمایش وجود نداشت ($P > 0/05$).

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 ماریچ سه گانه را ایفا می‌نماید و لیزین
 هیدروکسیلاسیون شده در تشکیل و نگه داشتن باندهای عرضی
 جهت ترکیب باندهای 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 از ۰/۲٪) و متیونین (۱/۳۳ - ۱/۲۴٪) می-
 باشد (Owusu-Apente, 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
 هور دم از نوع کلاژن نوع I باشد. کلاژن نوع I دارای دو زنجیره
 مشخص $\alpha 1$ و یک زنجیره $\alpha 2$ 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 هور دم دراز *Thunnus tonggol* بیشترین

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 محتوی 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 محتوی پروتئینی آنها
 می‌باشد. محتوی 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 استخوان (C)
 ماهی هور 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 به ترتیب ۳۹/۹٪، ۳۷/۳٪ و ۴۱/۱٪ می‌باشد. درجه
 هیدروکسیلاسیون لیزین در کلاژن پوست، باله و استخوان نیز به-
 ترتیب 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

- Go' mez-Guille'n, M. C.; Montero, P., 2001. Extraction of gelatin from megrim (*Lepidorhombus boschii*) skins with several organic acids. *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 *Mesocostoides 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 Biochem 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 fish scales. *Bioscience, Biotechnology and Bioinformatics*, 15: 101–106.
- 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 $\alpha 1$ و $\alpha 2$ 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
- شهری 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؛ ۲۴–۲۵ مهرماه؛ مشهد.
- Antonie F.R.; Wei C.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..

- 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 *Asthenosoma iijimai*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 115B: 63-68.
- Owusu-Apenten, 2002. *Food protein analysis*. New York: Marcel Dekker, Inc. *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *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. *Biochemistry*, 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