

مقایسه ساختاری کلاژن استخراج شده از دیواره خیار دریایی *Holothuria parva* با کلاژن نوع I مهره داران

نسیم ادیب زاده سرشکی^{۱*}، سعید امین زاده^۲، شهلا جمیلی^۳، پرگل قوام مصطفوی^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
^۲ استادیار، گروه دام و آبزیان، پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
^۳ استادیار، گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: کلاژن دارای کاربرد های فراوانی در زمینه داروسازی و پزشکی، تهیه محصولات بهداشتی و آرایشی و صنایع غذایی می باشد. در سال های اخیر توجه زیادی به جداسازی کلاژن از موجودات دریایی شده است که علت آن عدم محدودیت استفاده از آن در رژیم غذایی و عدم ابتلا به بیماری های TSE^۱ و BSE^۲ می باشد. هدف از انجام این تحقیق استخراج کلاژن از دیواره خیار دریایی *Holothuria parva* و مقایسه ساختاری آن با کلاژن نوع I مهره داران می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق جهت مقایسه ساختاری کلاژن حل شده با پیپسین (PSC^۳) استخراج شده از دیواره خیار دریایی جنس *Holothuria parva* و کلاژن نوع I مهره داران (Type I Calf skin) از آزمون های سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE)^۴، طیف بینی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR^۵) و کالری متری روبشی دیفرانسیلی (DSC)^۶ استفاده شده است.

یافته ها: الگوی پروتئینی SDS-PAGE کلاژن حل شده با پیپسین استخراج شده از دیواره خیار دریایی و نمونه کلاژن نوع I مهره داران نشان می دهد که قسمت عمده در هر دو کلاژن از زنجیره α_1 با وزن تقریبی ۱۳۰ kDa و مقدار جزئی β و γ تشکیل شده اند با این تفاوت که در PSC استخراج شده از خیار دریایی به صورت ساختار $(\alpha_1)_2$ و در کلاژن نوع I مهره داران به صورت $\alpha_1(\alpha_2)$ می باشد. طیف FT-IR کلاژن حل شده با پیپسین دارای یک باند پهن در ناحیه 3420 cm^{-1} و باند تیز در ناحیه 11638 cm^{-1} می باشد که شباهت زیادی به طیف FT-IR کلاژن نوع I مهره داران دارد. از آزمون DSC ماکزیمم دمای انتقالی PSC، $46/94$ درجه سانتی گراد تعیین گردید که نشان دهنده پایداری حرارتی کمتر نسبت به کلاژن نوع I مهره داران (62 درجه سانتی گراد) می باشد.

نتیجه گیری: کلاژن استخراج شده از خیار دریایی *Holothuria parva* نوع I تعیین شده و با توجه به پایداری حرارتی مناسب می تواند در مصارف صنعتی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین پایین بودن ماکزیمم دمای انتقالی کلاژن استخراج شده نشان دهنده محتوی کمتر ایمنو اسیدهای پرولین و هیدروکسی پرولین نسبت به کلاژن نوع I مهره داران می باشد.

کلمات کلیدی: *Holothuria parva*، خیار دریایی، FT-IR، DSC، SDS-PAGE، کلاژن حل شده با پیپسین (PSC)

مقدمه

می شود که هرکدام حاوی بیش از ۱۰۰۰ آمینو اسید هستند

(۶). فیبریل های کلاژن چارچوب عمده بیومکانیکی برای اتصال

سلول و لنگر اندازی ماکرومولکول ها فراهم می کنند و موجب تعیین

کلاژن فراوان ترین پروتئین در بافت جانوران می باشد. مولکول

کلاژن از سه پلی پپتید مجزا به نام زنجیره های آلفا تشکیل

آدرس نویسنده مسئول: گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی،

دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

Email: nasimadibzadeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۲/۱۴

- 1- Transmissible Spongiform Encephalopathy
- 2- Bovine Spongiform Encephalopathy
- 3- Pepsin solubilized collagen
- 4- SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
- 5- Fourier Transform Infrared
- 6- Differential Scanning Calorimetry

ادامه داد (۲). با این وجود هنوز دانش بسیار مختصری از کلاژن استخراج شده از خیار دریایی و خواص ترکیبات شیمیایی آن وجود داشت تا این که در سال ۲۰۰۲، Saito با انتشار مقاله ای در ارتباط با شناخت کلاژن خیار دریایی جنس *Stichopus* به این سوالات پاسخ داد (۱۵). Cui در سال ۲۰۰۷ با انتشار مقاله ای در ارتباط با شناسایی کلاژن استخراج شده از خیار دریایی *Stichopus* به همراه تعیین دمای پایداری حرارتی آن اطلاعات جدید تری در ارتباط با شناخت کلاژن استخراج شده از این خیار دریایی ارائه داد (۵). جدیدترین فعالیت تحقیقاتی در سال ۲۰۱۰ توسط Liu در ارتباط با خالص سازی کلاژن از خیار دریایی جنس *Parastichopus* و مطالعه ساختاری آن انجام شده است (۱۲). با توجه به برنامه های موجود در سند راهبردی بیوتکنولوژی کشور و اینکه تاکنون هیچگونه تحقیقی در ارتباط با جداسازی و شناسایی کلاژن از خیار دریایی در ایران انجام نشده است، تحقیق و مطالعه در این زمینه (استخراج ترکیبات با ارزش نظیر کلاژن از منابع دریایی) می تواند مفید باشد و موجب گسترش کاربرد رشته بیوتکنولوژی دریایی گردد. اهداف کلی اجرای این پژوهش عبارتند از:

- جداسازی و خالص سازی کلاژن محلول در پیپسین (PSC) از دیواره خیار دریایی جنس *Holothuria parva*.
- شناسایی ساختاری کلاژن جداسازی شده با استفاده از آزمون های FT-IR، SDS-PAGE و DSC.
- مقایسه نتایج حاصل از این پروژه با کلاژن نوع I مهره داران و سایر تحقیقات انجام شده بر روی کلاژن استخراج شده از سایر جنس های خیار دریایی و سایر جانوان دریایی.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه

مطابق مقالات و تحقیقات انجام شده، ۶ عدد خیار دریایی جنس *Holothuria parva* با میانگین وزن ۱۰۰ گرم و طول ۱۸ سانتی متر از سواحل جنوبی ایران از اطراف اسکله شهید بهشتی چابهار در طول و عرض جغرافیایی (۴۱°۵۷'۱۷" N و ۳۵° ۴۴'۰۱" E)

شکل بافت و حفظ و نگهداری آن می شوند. فیبریل های بالغ کلاژن از فیبریل های اولیه (پروکلاژن) ۱۰ میکرومتری تشکیل شده اند که می توانند به طول صدها میکرومتر رشد کنند. پپتیدهای کلاژن دارای ظرفیت بالای نگه داری آب، فعالیت زیاد آنتی اکسیدانی و پتانسیل بالای کاهش فشار خون می باشند (۸). پپتیدهای کلاژن غنی از آمینو اسید های آبریز هستند. این آمینو اسیدها که در هنگام هیدرولیز با آنزیم و یا طی فرآیند تهیه غذا آزاد می شوند، دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قوی می باشند. آمینو اسید پرولین که در کلاژن به وفور وجود دارد در مقابل اکسیداسیون بسیار مقاوم می باشد خصوصاً در موقعیت های که اتم هیدروژن به گروه عاملی OH و یا گروه های عاملی دارای اتم نیتروژن متصل باشد (۱۱، ۱۷). کلاژن کاربرد های فراوانی در زمینه داروسازی و پزشکی، تهیه محصولات بهداشتی، آرایشی و صنایع غذایی دارد (۱۸). کلاژن همچنین کاربردهای فراوانی در داروسازی و مهندسی بافت از جمله ساخت دریچه های قلبی و پوست مصنوعی را دارد (۱۰). کلاژن در داروسازی می تواند به اشکال ورقه ای، لوله ای، اسفنجی، پودر و محلول های قابل تزریق ساخته شود (۴، ۷). در سال های اخیر توجه زیادی به جداسازی کلاژن از موجودات دریایی شده است که علت آن عدم محدودیت استفاده از آن در رژیم غذایی و عدم ابتلا به بیماری های TSE و BSE می باشد (۱۲). رشته های کلاژن پستانداران، استوانه ای شکل بوده، اما در خارپوستان دوکی شکل می باشد. رشته های کلاژن خارپوستان دو قطبی با سرآمیدی و سرکوبوکسیلی هستند ولی رشته های کلاژن در پستانداران به شکل تک قطبی می باشد (۱۴). Matsumura در سال ۱۹۷۳ و ۱۹۷۴ با انتشار اولین مقالات در زمینه مطالعه مورفولوژیکی و تهیه و خالص سازی فیبرل کلاژن از خیار دریایی جنس *Stichopus* در این زمینه پیشرو بوده است (۱۴). در سال ۱۹۸۲ Bailey با انتشار مقاله ای تحت عنوان تناقض اتصالات متقاطع وسیع و مقاومت مکانیکی پایین در کلاژن استخراج شده از فیلامنت های چسبناک سفید خارج شده در اثر تحریک مکانیکی^۱ از خیار دریایی *Holothuria forskali*، تحقیق در زمینه مطالعه کلاژن استخراج شده از خیار دریایی را

1- Cuvierian Tubule

2- Thermal Stability Temperature

سپس سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله با ۱ لیتر آب مقطر مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت استرلیزه گردید (۱۲).

حل کردن مواد غیر کلاژنی

مخلوط حاصل از مرحله قبل را از یک پارچه تنظیف عبور داده و ذرات نامحلول را جدا کرده و مایع فیلتر شده در دور ۹۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. سپس رسوب با ۱۰۰ میلی لیتر محلول NaOH ۰/۱ مولار به مدت ۷۲ ساعت در سرد خانه ۴ درجه استیرر گردید.

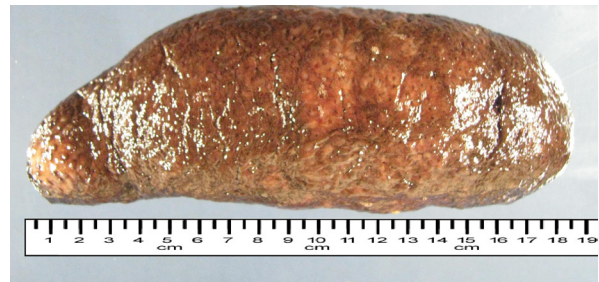
خارج کردن NaOH از محیط

در این مرحله محلول حاصله را در دور ۹۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ کرده و شناور را دور ریخته و رسوب با ۱ لیتر آب مقطر مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه استیرر گردید. سپس pH آن را اندازه گیری کرده و بعد در دور ۹۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. رسوب را دوباره با یک لیتر آب مقطر مخلوط کرده و pH آن اندازه گیری شد و آنقدر این مراحل را تکرار کرده تا pH آن به pH آب مقطر نزدیک شود.

استخراج کلاژن محلول در پپسین

رسوب مرحله قبل را وزن کرده و به مقدار ۱ درصد از وزن آن آنزیم پورسین پپسین (ساخت شرکت Merck) به همراه استیک اسید ۰/۵ مولار اضافه کرده و به مدت ۴۸ ساعت در سردخانه ۴ درجه سانتی گراد استیرر شد. محلول بدست آمده در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ (SIGMA ۳k۳۰ centrifuge) شد. شناور را جمع آوری کرده و به رسوب باقی مانده، دوباره به مقدار ۱ درصد وزنی/ وزنی آنزیم پورسین پپسین به همراه استیک اسید ۰/۵ مولار اضافه کرده و مجدداً به مدت ۴۸ ساعت استیرر گردید. محلول را در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیفیوژ کرده و شناور جمع آوری شده به شناور قبلی اضافه شد. به شناور حاصله، محلول ۰/۸ مولار NaCl اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد استیرر گردید. سپس این محلول را در دور ۹۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ کرده و بعد ۵۰ میلی محلول

(۳۶°، ۶۰°) جمع آوری شدند (۵، ۱۲). عملیات جمع آوری در آذر ماه ۱۳۸۹ با کمک غواص انجام شد و با استفاده از یخ خشک به آزمایشگاه دام، طیور و آبزیان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری منتقل گردید (شکل ۱). کلیه نمونه ها در سردخانه آزمایشگاه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان شروع آزمایشات نگهداری شد.



شکل ۱- خیار دریایی *Holothuria parva* مورد تحقیق.

استخراج کلاژن از خیار دریایی *Holothuria parva* تمامی مراحل در یخچال ۴ درجه سانتی گراد انجام شده است (۱۲).

بریدن پوست خیار دریایی به قطعات ریز

ابتدا یک خیار دریایی *Holothuria parva* به کمک ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن گردید و پوست از امعاء و احشاء داخلی جدا شد و با کمک یک قیچی به قطعات ریز تبدیل شد.

مرحله شستشو

۱۰۰ گرم از قطعات پوست با ۲ لیتر آب مقطر در یک ارلن مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد استیرر گردید. این مرحله ۲ بار تکرار شده و در هر بار آب مقطر را دور ریخته و با ۲ لیتر آب مقطر مجدداً استیرر گردید (۱۲).

جدا سازی کلاژن از دیواره خیار دریایی

تکه های خیار دریایی را با یک لیتر محلول EDTA ۴ میلی مولار و Tris-HCl (pH=8) ۰/۱ مولار مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت در سردخانه آزمایشگاه در ۴ درجه، استرلیزه گردید. مخلوط حاصله توسط دستگاه سانتریفیوژ مدل (Biofuge stratus Heraous Model) با دور ۹۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. شناور را دور ریخته و رسوب با یک لیتر آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه استرلیزه گردید و

گردد با سرعت افزایشی ۱ درجه سانتی گراد بر دقیقه راه اندازی شد (۱۲).

آزمون طیف بینی FT-IR

طیف بینی مادون قرمز یکی از تکنیک های مورد استفاده برای تعیین ساختار ثانویه پلی پپتیدها و پروتئین ها است. این تکنیک طیف بینی، دارای قابلیت عدم تخریب نمونه می باشد. در این طیف بینی، گروه های عاملی موجود در ترکیبات مختلف، دارای قدرت جذب متفاوت اشعه های مادون قرمز در ناحیه های مختلف عدد موج را دارا می باشند. اطلاعات طیف بینی مادون قرمز تحت عنوان ارتعاشات واحد ساختاری (گروه های عاملی) نمودار می شوند. باندهای آمید I و آمید II از باندهای غالب در ساختاری پروتئین و پلی پپتید می باشند. حساس ترین ناحیه در طیف باند آمیدی I با عدد موج $1600-1170 \text{ cm}^{-1}$ است که متعلق به ارتعاشات کششی پیوند C=O در اتصالات پپتیدی پلی پپتید یا پروتئین می باشد. در مقایسه با آن باندهای آمید II متعلق به ارتعاشات پیوند CN می باشد (۹). به منظور مطالعه و بررسی گروه های عاملی PSC استخراج شده از خیار دریایی جنس *Holothuria parva* در ابتدا با استفاده کمپرسور دستی از کلاژن نوع I مهره داران و کلاژن حل شده با پیسین استخراج شده تحت فشار ۱۰ تن، قرص KBr تهیه شد. سپس قرص های حاصله را در سل مخصوص دستگاه FT-IR مدل TENSOR۲۷ ساخت شرکت BRUKER قرار داده و با استفاده از نرم افزار OPUS آنالیزهای مربوطه انجام شده و طیف مربوطه تهیه گردید (۱۶).

یافته ها

نتایج آزمون SDS-PAGE

کلاژن حل شده با پیسین استخراج شده از خیار دریایی جنس *Holothuria parva* با کمک SDS-PAGE شناسایی شد. وزن مولکولی جزء غالب آن در حدود ۱۳۰ kDa مشاهده شد و این وزن مولکولی مشابه کلاژن نوع I مهره داران می باشد (شکل ۲) (۱۲). وجود باند پهن در وزن مولکولی مذکور نشان دهنده حضور رشته های α (سه زنجیره α) می باشد. همچنین واحد های زیر ساختاری β و γ (اجزاء غیر غالب) در شکل ۲ مشاهده می شوند.

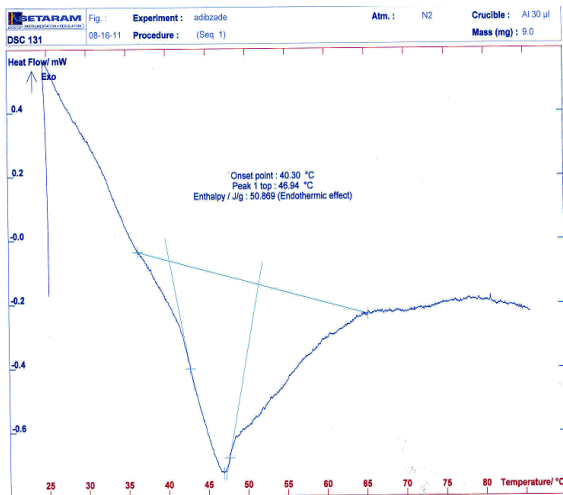
استیک اسید ۰/۵ مولار به آن اضافه کرده و محلول حاصله را در کیسه دیالیز ریخته و در مقابل Na_2HPO_4 ۰/۰۲ مولار (pH=۸) و استیک اسید ۰/۱ مولار به مدت ۱۲ ساعت دیالیز شد. نهایتاً کلاژن حل شده در پیسین بدست آمده با دستگاه Freeze Dryer مدل CoolSafe SCANVAC ساخت دانمارک خشک شد. در این مرحله نمونه ها با کمک نیتروژن مایع ابتدا منجمد و سپس طی مدت ۷۲ ساعت در دستگاه مذکور خشک شدند (۱۲).

آزمون SDS-PAGE

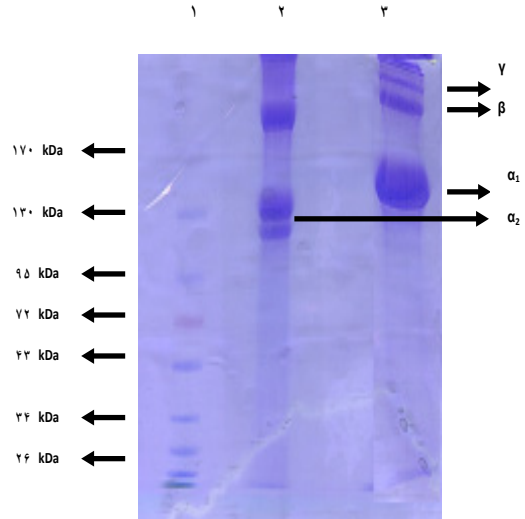
برای انجام این آزمون از ژل پلی آکریل آمید ۳۰/۸٪ استفاده شد. در این مرحله از ژل پایین ۱۲/۵٪ و از ژل بالای ۴٪ استفاده شد. پودر کلاژن محلول در پیسین و کلاژن نوع I مهره داران در بافر نمونه و آب مقطر حل شده و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش گذاشته شد و سپس هر دو روی ژل منتقل گردیدند و نهایتاً الکتروفورز با ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۴ ساعت انجام شد. بعد از الکتروفورز، ژل باکوماسی آبی به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی گردید. سپس با محلول رنگ بر شامل متانول، استیک اسید گلاسیال و آب مقطر رنگ بری صورت پذیرفت (۱).

آزمون DSC

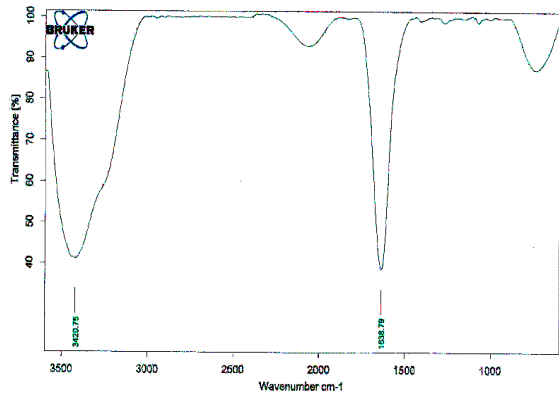
DSC (گرماسنجی روبشی تفاضلی) رایج ترین تکنیک آنالیز حرارتی است که انتقالات حالات و فازها را در مواد غذایی نشان می دهد. گرماسنجی پروتئین ها به طور معمول با استفاده از این تکنیک انجام می شود. DSC دما را اسکن می کند و ظرفیت گرمایی نمونه را در فشار اتمسفر اندازه گیری می کند. تکنیک DSC شکلی از گرماسنجی است که در آن گرمای مبادله شده در واکنش ها و فرآیندها اندازه گیری می شود (۳). با استفاده از دستگاه DSC۱۳۱ ساخت شرکت SETARAM فرانسه بیشترین دمای انتقالی (TS) کلاژن استخراج از خیار دریایی *Holothuria parva* بدست آمد. مقدار ۴۰ میلی گرم از پودر کلاژن خشک شده توسط دستگاه Freeze-dryer را در ۱ میلی لیتر آب دی یونیزه حل کرده و محلول کلاژن به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط نگهداری شد. سپس ۵۰۰ میلی گرم از محلول را وزن کرده و به درون ظرف مخصوص خوب چسبانده شد، سپس دستگاه از دمای ۲۰ تا ۸۰ درجه سانتی



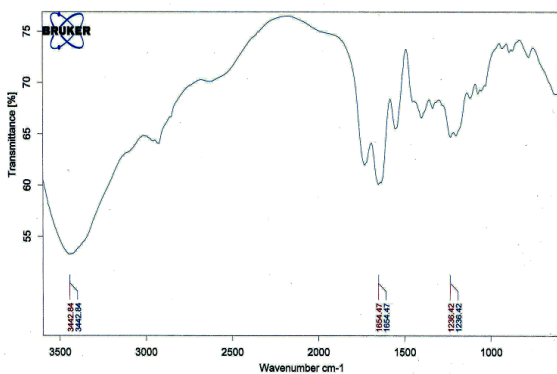
شکل ۳- ترمو گرام DSC کلژن محلول در پپسین.



شکل ۲- SDS-PAGE کلژن حل شده با پپسین.
(۱: مارکر پروتئین، ۲: Calf Skin Type I، ۳: PSC)



شکل ۴- طیف FT-IR ، PSC ، استخراج شده از خیار دریایی *Holothuria parva*.



شکل ۵ - طیف FT-IR (Calf skin collagen type I).

نتایج آزمون DSC

در منحنی ترموگرام DSC (شکل ۳) مشاهده می شود با افزایش درجه حرارت، منحنی از ناحیه گرما زا به ناحیه گرماگیر منتقل شده تا اینکه از دمای ۴۶/۹۴ درجه سانتی گراد یعنی دمای انتقالی کلژن محلول در پپسین این روند معکوس شده و با افزایش درجه حرارت منحنی دوباره به ناحیه گرما زا نزدیک می شود.

نتایج آزمون طیف بینی FT-IR

همان طور که در شکل های ۴ و ۵ مشاهده می شود طیف FT-IR کلژن حل شده با پپسین دارای یک باند پهن در ناحیه 3420 cm^{-1} است که نشان دهنده ارتعاشات کششی پیوند های آزاد N-H آمینو اسیدها در ساختار پلی پپتیدی کلژن می باشد (۹). باند تیز در ناحیه 1638 cm^{-1} نشان دهنده ارتعاشات کششی پیوند C=O آمینو اسیدها موجود در ساختار کلژن می باشد. گروه عاملی N-H به عنوان یک گروه الکترون دهنده موجب شیفت گروه C=O در ناحیه مذکور شده است بطوری که باند ارتعاشی این گروه عاملی در عدد موج پایینتری در طیف FT-IR ظاهر شده است (۹).

بحث

الگوی پروتئینی SDS-PAGE کلاژن حل شده با پپسین استخراج شده از خیار دریایی جنس *Holothuria parva* و نمونه کلاژن نوع I مهره داران (Type I Calf skin) نشان می دهد که قسمت عمده در هر دو کلاژن از زنجیره α_1 با وزن تقریبی ۱۳۰ kDa تشکیل شده اند با این تفاوت که PSC استخراج شده از دیواره خیار دریایی مورد مطالعه (*parva Holothuria*) دارای ساختار $\alpha_1(\alpha_1)$ در حالی که کلاژن نوع I مهره داران به صورت $\alpha_1\alpha_1(\alpha_1)$ می باشد. این نتیجه مشابه نتایج گزارش شده از خیار های دریایی *Stichopus japonicus* و *Parastichpus californicus* با ساختار $\alpha_1(\alpha_1)$ و با وزن مولکولی به ترتیب ۱۳۵ و ۱۳۸ کیلودالتون می باشد (۱۲،۵). پایین تر بودن ماکزیمم دمای انتقالی بدست آمده از منحنی ترموگرام DSC کلاژن حل شده با پپسین خیار دریایی جنس *Holothuria parva* از دمای انتقالی کلاژن نوع I مهره داران (۶۲ درجه سانتی گراد) نشان می دهد که مارپیچ کلاژن بدست آمده از دیواره خیار دریایی مورد مطالعه، پایداری حرارتی کمتری نسبت به کلاژن نوع I مهره داران دارد هرچه میزان ایمینو اسید هیدروکسی پرولین و پرولین در ساختار کلاژن بیشتر باشد ماکزیمم دمای انتقالی کلاژن بیشتر خواهد بود. ماکزیمم دمای انتقالی کلاژن حل شده با پپسین استخراج شده از خیار دریایی *Parastichpus californicus* ۳۳/۲ درجه سانتی گراد می باشد (۱۲). بیشترین دمای انتقالی (۵۷ درجه سانتی گراد) و در نتیجه بیشترین پایداری حرارتی مربوط به کلاژن حل شده با پپسین استخراج شده از خیار دریایی *Stichopus japonicus* می باشد (۵). میزان محتوی ایمینو اسیدی (مجموع پرولین و هیدروکسی پرولین) در کلاژن نوع I مهره داران و خیار های دریایی *Stichopus japonicus* و *Parastichpus californicus* به ترتیب ۱۰۰۰ residues/۲۱۵، ۱۶۱ و ۱۵۳ گزارش شده است (۱۲،۵). با توجه به ماکزیمم دمای انتقالی مشاهده شده در کلاژن نوع I مهره داران و خیار های دریایی *Stichopus japonicus* و *Parastichpus californicus* نتیجه گیری می شود میزان محتوی ایمینو اسیدی کلاژن استخراج شده از خیار

دریایی جنس *parva Holothuria* کمتر از ۱۰۰۰ residues/۱۶۱ و بیشتر از ۱۵۳ می باشد. همچنین محتوی ایمینو اسیدی کلاژن استخراج شده، بسیار کمتر از کلاژن نوع I مهره داران است. همانطور که از طیف FT-IR کلاژن نوع I مهره داران مشخص است باند هایی در ناحیه amide A با طول موج 3442 cm^{-1} و amide I با عدد موج 1654 cm^{-1} و amide III با طول موج 1236 cm^{-1} وجود دارند. باند های مشاهده شده در ناحیه amide III نشان دهنده حضور ارتعاش کششی CN و خمشی N-H ساختار ثانویه کلاژن نوع I است. شباهت طیف های FT-IR کلاژن نوع I مهره داران و کلاژن استخراج شده از *Holothuria parva* بخصوص در ناحیه amide A و ناحیه amide I دلیل دستیابی به کلاژن حل شده با پپسین با ساختار نزدیک به کلاژن نوع I می باشد.

منابع

- (۱) مصطفائی ع . راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل، دانشکده پزشکی . دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه. ۱۳۷۸.
- (2)- Bailey AJ, Gathercole LJ, Dlugosz J. Proposed Resolution of the Paradox of Extensive Cross Linking and Low Tensile Strength of Cuvierian Tubule Collagen from the Sea Cucumber *Holothuria forskali*. *Int J Biol Macromol*, 1982;4 (6): 329–334.
- (3)- Boehm K, Rosgen J, Hinz HJ, Pressure Modulated Differential Scanning Calorimetry An Approach to the Continuous, Simultaneous Determination of Heat Capacities and Expansion Coefficients. *Anal chem*, 2006; 78: 984-990.
- (4)- Chvapil M, Kronenthal RL, Van Winkle W, Medical Jr, Hall DA. Surgical Applications of Collagen. *International Review of Connective Tissue Research*, D.S.Jakson (Eds). New York, Academic press, 1973;1–61.
- (5)- Cui FX, Xue CH, Li ZJ, Zhang YQ, Dong P, Gao X, Characterization and Subunit Composition of Collagen from the Body Wall of Sea Cucumber *Stichopus Japonicus*. *Food Chem*, 2007; 100: 1120-1125.
- (6)- Friess W. Review article Collagen Biomaterial for Drug Delivery. *Eur J Pharm and Biopharm*, 1998; 45: 113–136.
- (7)- Gorham SD, Collagen, In D.Byrom (ED). *Biomaterials*, New York: Stockton Press, 1991;55-122.
- (8)- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Fhahidi F. Isolation and Characterization of Collagen from the Cartilages of Brownbanded Bamboo Shark (*Chiloscyllium Punctatum*) and Blacktip Shark (*Carchahinus Limbatus*). *Food science and technology*, 2010; 43: 792-800.
- (9)- Kong J, YU S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structure. *Acta Biochim Biophys sin*, 2007; 39(8): 549-559.
- (10)- Lee C, Singla A, Lee Y. Biomedical Applications of Collagen. *Int J Pharm*, 2001; 221: 1–22.
- (11)- Li B, Chen F, Wang X, Ji B, Wu Y. Isolation and Identification of Anti-Oxidative Peptides from Porcine Collagen Hydrolysates by Consecutive Chromatography and Electrospray Ionization—Mass Spectrometry. *Food Chem*, 2007; 102: 1135–1143.
- (12) Liu Z, Su Y and Oliver A. Purification and Characterization of Solubilized Collagen from Skin and Connective Tissue of Giant Red Sea Cucumber (*Parastichopus californicus*). *J. Agri. Food Chem*, 2010; 58: 1270-1274.
- (13)- Matsumura T. Collagen Fibrils of the Sea Cucumber, *Stichopus Japonicus*: Purification and Morphological study. *Conn Tiss Res*, 1974; 2(2): 117–125.
- (14)- Rainey JK, Wen CK, Goh MC, Hierarchical Assembly and the Onset of Banding in Fibrous Long Spacing Collagen Revealed by Atomic Force Microscopy. *Matrix Biol*, 2002; 21: 647–660.
- (15)- Saito M, Kunisaki N, Urano N, Collagen as the Major Edible Component of Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*). *J Food Sci.*, 2002; 67: 1319–1322.
- (16)- Singh P, Benjakul S, Maqsood S, Kishimur H. Isolation and Characterisation of Collagen Extracted from the Skin of Striped Catfish (*Pangasianodon Hypophthalmus*). *Food Chem*, 2011; 124 : 97–105.
- (17)- Waszkowiak K. Antioxidative Activity of Rosemary Extract Using Connective Tissue Proteins as Carriers. *Int J Food Sci, Technol*, 2008; 43: 1437–1442.
- (18)- Weiss JB, Jayson MIV. *Collagen in Health and Disease*. Edinburgh, New York, Churchill Livingstone. 1982; 141–423.