

استخلاص الكولاجين من جلد سمك المزلق *Brachirus orientalis* ودراسة بعض صفاته الكيميائية ومحتواه من الاحماض الامينية

ام البشر حميد جابر الموسوي و محمد زيارة اسكندر

قسم علوم الاغذية / كلية الزراعة / جامعة البصرة

ahmedguad77@gmail.com

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة استخلاص الكولاجين المذاب بحامض الخليك الثلجي 0.5 مولاري من جلد سمك المزلق، بعد ازالة الدهن والبروتينات غير الكولاجينية واجراء الديلز في الماء المقطر، ومن ثم دراسة بعض صفاته التي شملت التركيب الكيميائي ونسبة الحاصل، والتي بلغت 12.15% على اساس الوزن الرطب، كما واجري الترحيل الكهربائي للكولاجين المستخلص، واطهرت النتائج وجود نوعين مختلفين من السلاسل، تمثلا بسلسلة $\alpha 1$ ، وسلسلة $\alpha 2$ ، بوصفه كولاجين من النوع الاول، كذلك لوحظ ظهور حزمة β ذات وزن جزيئي اكبر. ودرس محتوى الكولاجين من الاحماض الامينية. وقد ابدت تباينا في الأحماض الأمينية الرئيسية للكولاجين، مثل الكلايسين والبرولين، والهيدروكسي برولين والهيدروكسي لايسين. وعند قياس طيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية التي بين وجود قمة امتصاص واحدة، عند طول موجي 232 نانومتر. وشخصت المجاميع الفعالة بتقنية الأشعة تحت الحمراء FTIR التي اوضحت وجود الأمايدات (A, B, I, II و III) 3408.57، 2934.89، 1651.73، 1540.85 و 1243.38 سم⁻¹ على التوالي.

الكلمات المفتاحية : الكولاجين، سمك المزلق، الحوامض الامينية، نسبة الحاصل

المقدمة

يعد الكولاجين البروتين الهيكلي الرئيسي خارج الخلايا (ECM) Extracellular matrix في الكثير من الأنسجة الرابطة، وهو البروتين الأكثر وفرة في جسم الإنسان والحيوان اذ يشكل حوالي 25-35% من البروتين الكلي في الجسم (Muyonga et al., 2004)، يوجد في الكائنات الحية على الاقل 29 نوعاً من الكولاجين، وأكثر من 42 سلسلة ببتايد متعددة مختلفة، وتصنف اشكال الليفات الكولاجينية طبقاً للتشابه في التركيب والتنظيم الجزيئي الدقيق (Myllyharju and Kivirikko, 2004).

يلعب كولاجين النوع الأول دوراً مهماً في بنية الجلد، اذ تصل نسبته الى 70% من وزن الجلد الجاف، وانّ تركيبة ألياف الكولاجين ضرورية للجلد القوي والصحي (Oikarinen, 2006)، وهو البروتين المعروف بالحلزونات الثلاثي، وهو واسع الانتشار في كافة أنحاء الجسم، وله وظائف مهمة في الجسم، منها اسناد واستقرار الانسجة، وتماسك و ثبات الخلية، و تكوين الأوعية، وتشكيل وترميم الانسجة، والمحافظة على استقرار الهيكل النسيجي وغيرها (Kadler et al., 2007).

جزئة الكولاجين عسوية الشكل تسمى التريوكولاجين، وهي تتكون من ثلاث سلاسل ببتيدية ملتفة حول بعضها مكونة الحلزون الثلاثي، وهي الوحدة الاساسية لألياف الكولاجين بعد تجمعها، يبلغ طول الوحدة الاساسية 300 نانومتر، وقطر الحلزون الثلاثي 1.5 نانومت تقريباً (Brinckmann *et al.*, 2005). يعد تركيب الكولاجين فريداً جداً في تسلسل الأحماض الأمينية، اذ ان التركيب الاولي للكولاجين هو سلسلة من حوامض أمينية متعددة الببتيد polypeptide مرتبة خطياً. ويكون الترتيب الثلاثي للحوامض الأمينية تكرارياً (Gly-X-Y)، حيث X و Y عموماً اما برولين proline أو هيدروكسي برولين hydroxyproline. وان وجود هذين الحامضين مباشرة في السلسلة الفا يعطي الصلابة بواسطة التراكيب الحلقية التي تمتلكها. ان السلاسل الثلاثة في التركيب الحلزوني للكولاجين تكون في العموم متساوية في الطول اذ تحتوي كل سلسلة تقريباً 1000 حامض اميني (Whitford, 2005).

الكولاجين مادة حيوية مهمة في التطبيقات الطبية لما يتميز به من خصائص مهمة منها انه غير سمي Non-toxic و عديم او قليل المستضد Non-antigenic، وقابل للتحلل الحيوي وغيرها (Fišerová, 2009)، وله استعمالات مهمة اخرى منها في الصناعات الجلدية و التجميلية و الطبية والغذائية، وكذلك يستعمل في انتاج الضمادات الطبية وأوعية ناقلة للعقاقير فضلاً عن الأغلفة القابلة للأكل في بعض الصناعات الغذائية (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005).

نتيجة لعدم وجود دراسات محلية حول استخلاص وتنقية الكولاجين، وللحاجة الماسة لهذا البروتين في الدراسات البحثية والبحوث التطبيقية، ولتوفر كميات كبيرة من مخلفات الأسماك وخصوصاً أسماك المزلق الذي في الغالب يتخلص من جلوده قبل عملية الطبخ، لذا هدفت هذه الدراسة الى استخلاص وتنقية وتوصيف الكولاجين من جلد سمك المزلق.

مواد وطرق العمل

جلبت أسماك المزلق نوع المزلق الطيني (*Brachirus orientalis* (Oriental sole) من محلات بيع الأسماك في سوق العشار بوزن 250 ± 20 غم وبطول 13-15 سم وعرض 6-7 سم من الوسط. نزعتم الجلود من الأعلى والأسفل وازيلت القشور (الأصداف) وقطعت الجلود بواسطة سكين حادة بحجم 0.5 سم 2×5 سم²، وغسلت بالماء المقطر البارد ووضعت في أكياس من البولي اثيلين وحفظت في المجمدة درجة حرارة (-18±2) م°، استخلص الكولاجين بواسطة الحامض حسب طريقة (Nagai and Suzuki, 2000) مع اجراء بعض التحويرات، واجريت كل ظروف الاستخلاص عند درجة حرارة بين 4-8 م°.

نقعت جلود اسماك المزلق في محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH نو تركيز 0.1 مولاري بنسبة 30:1 (و/ح) لمدة 24 ساعة مع التحريك المستمر بواسطة المحرك المغناطيسي، لغرض ازالة البروتين غير الكولاجيني، وخلال هذه الفترة استبدل محلول النقع كل 8 ساعات، ثم غسلت بالماء المقطر البارد عدة مرات لحين الوصول الى اس هيدروجيني متعادل، ولغرض التخلص من الدهن عوملت قطع الجلود بكحول البيوتانول butyl alcohol 10% (ح/ح) بنسبة 30:1 (و/ح) لمدة 24 ساعة مع التحريك، ثم غسلت قطع الجلود المعالجة بالماء المقطر البارد عدة مرات لغرض التخلص من الكحول، ونقعت قطع الجلود الخالية من الدهن بمحلول حامض الخليك الثلجي Glacial Acetic acid 0.5 مولاري بنسبة 30:1 (و/ح) لمدة 48 ساعة مع

التحريك بين فترة وأخرى وبعدها تم الترشيح من خلال طبقتين من قماش الململ، وحفظ الراشح في الثلاجة، ثم نعتت المادة المتبقية مرة ثانية بمحلول حامض الخليك الثلجي 0.5 مولاري بنسبة 1:15 (و/ح) لمدة 24 ساعة مع التحريك بين فترة وأخرى، وتم الترشيح من خلال طبقتين من قماش الململ، وخلط الراشح الناتج مع الراشح السابق، ثم تم اجراء الترسيب بمحلول ملح كلوريد الصوديوم NaCl ذو تركيز 2.6 مولاري في محلول Tris-HCl 0.05 مولاري واس هيدروجيني 7.5، وتم اجراء الطرد المركزي تحت التبريد 10000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة اخذ الراسب واعيدت عملية اذابته بـ 10 احجام من 0.1 مولاري من حامض الخليك الثلجي ووضع في اكياس الديلزة المنشطة مسبقا، وهي ذات وزن جزئي 14 كيلو دالتون (cut-off of 14 kDa) مقابل 30 حجم من محلول 0.05 مولاري حامض الخليك الثلجي / 24 ساعة، بعدها استبدل الحامض بالماء المقطر بنفس النسبة السابقة /48 ساعة، وجرى الاستبدال كل 4 ساعات، الى حين الوصول الى التعادل، ثم جرى التجفيد بجهاز Freeze - dryer على درجة حرارة -55 م / 1.5 بار، ثم وزن الناتج ووضع في عبوات محكمة الغلق وخرن في التجميد عند -18 م° لحين اجراء الفحوصات.

التركيب الكيميائي

قدرت النسبة المئوية للرطوبة والدهن والبروتين (النتروجين الكلي) × العامل الخاص بالكولاجين (5.55) والرماد لجلد سمك المزلق والكولاجين المحضر منه وفق الطرق المذكورة في (A O A C (2000). وقدرت السكريات الكلية في الكولاجين حسب طريقة الفينول حامض الكبريتيك التي ذكرها (Dubois et al. 1956).

حساب الحاصل للكولاجين

تم حساب الحاصل للكولاجين المحضر من جلد سمك المزلق على اساس الوزن الرطب للجلود كما ذكره Zeng et al. (2012) والموضح بالمعادلة التالية :-

$$\text{الحاصل \%} = \frac{\text{وزن الكولاجين المنتج المجفد (غم)}}{\text{وزن المادة الاولية (غم)}} \times 100$$

تقدير الوزن الجزئي

اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد اكريل امايد (SDS-PAGE) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis التي ذكرها (Laemmli 1970).

تقدير الأحماض الأمينية

قدرت الأحماض الأمينية حسب الطريقة التي ذكرها (Shahiri et al. 2012) مع اجراء بعض التحويرات والتي تنص على هضم الكولاجين (100 ملغم) تحت ضغط منخفض يبلغ 6 مولاري HCl ودرجة حرارة 115 م° لمدة 24 ساعة، بوجود 2-mercaptoethanol في انبوية المنظومة الخاصة بالجهاز Pico Tag system تم الحقن بجهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC.

الكشف عن الترتوفان

تم الكشف عن الحامض الأميني الترتوفان حسب طريقة روزنهايم Acree-Rosenheim التي ذكرها (Das 1980).

فحص طيف الأشعة المرئية - الأشعة فوق البنفسجية

اتبعت الطريقة التي ذكرها Yan *et al.* (2008) وذلك باذابة عينات الكولاجين في 0.5 مولاري حامض الخليك وبتركيز 2 ملغم / مل وقيست الإمتصاصية بجهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية، عند طول موجي من 200-500 نانومتر، وبمعدل مسح 210 نانومتر/ دقيقة.

التشخيص بمطياف الأشعة تحت الحمراء

أخذ وزن 2 ملغم من الكولاجين المحضر من جلد اسماك المزلق ومزجت مع بروميد البوتاسيوم KBr، وشكلت أقراص جافة من المزيج، ووضعت في خلية الجهاز (FT-IR)، تم الحصول على الإمتصاص الضوئي عند عدد موجي 400-4000 سم⁻¹، وحسب الطريقة التي أوردتها (Muyonga *et al.* (2004).

النتائج

التركيب الكيميائي

توضح النتائج في جدول (1) المحتوى الكيميائي لجلود وكولاجين سمك المزلق، اذ لوحظ ان نسبة المواد الصلبة الكلية في الجلود 32.69% ونسبة البروتين كانت 29.27% وبلغت نسبة الدهن 2.58% ونسبة الرماد 0.69% وبلغت النسبة المئوية للرطوبة 67.31%، وكانت البروتين والدهن والرماد والرطوبة ونسبة المواد الصلبة ونسبة السكر في الكولاجين المحضر 93.41%، 0.37%، 0.24%، 4.54%، 95.46%، 1.43% على التوالي وكانت نسبة الحاصل 12.15% على اساس الوزن الرطب.

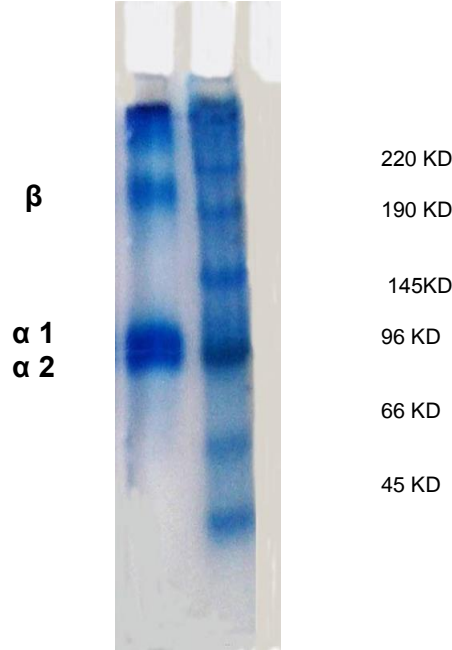
جدول (1) المحتوى الكيميائي لجلود وكولاجين سمك المزلق ونسبة الحاصل%

المادة		التركيب الكيميائي %
كولاجين جلد السمك	جلد سمك المزلق	
95.46	32.69	المواد الصلبة الكلية
93.41	29.27	N×5.55 البروتين
4.54	67.31	الرطوبة
0.37	2.58	الدهن
0.24	0.69	الرماد
1.43	-	السكريات
12.15	-	نسبة الحاصل % على اساس الوزن الرطب

الوزن الجزيئي للسلاسل الببتيدية للكولاجين

استعملت طريقة الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريل امايد ذو تركيز 7.5% وبوجود مادة SDS لتحديد انماط السلاسل الببتيدية ومعرفة الأوزان الجزيئية. اذ بين الشكل (1) وجود نوعين مختلفين من سلاسل الفا α تمثل ذات وزن جزيئي اكبر بحدود 105-110 كيلو دالتون، وα2 ذات وزن جزيئي اقل 96 كيلو دالتون لكلا

النوعين فضلاً عن وجود حزمة ذات وزن جزيئي كبير β بحدود 210 كيلو دالتون ناتجة من ارتباط نوعين من سلاسل الفا (α dimer).



شكل (1) الترحيل الكهربائي للكولاجين المحضر من سمك المزلق

محتوى الأحماض الأمينية للكولاجين المحضر من سمك المزلق

توضح النتائج في جدول (2) محتوى الكولاجين المحضر من جلود سمك المزلق من الأحماض الأمينية باستعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) إذ لوحظ ان الكلايسين glycine اكثر الأحماض الأمينية تواجداً في الكولاجين، وبلغت نسبته 31.2%. اما نسبة الالينين و حامض الجلوتاميك والارجينين و حامض الاسبارتيك وكانت 9.5%، 7.7%، 6.1%، 5.1% على التوالي، وسجلت النتائج ايضاً ارتفاع في نسبة كل من البرولين والهيدروكسي برولين 11.4% و 8.7% على التوالي وكان المجموع الكلي لهما 20.1%، كما توضح النتائج في هذا الجدول وجود نسب منخفضة ومتفاوتة للأحماض الأمينية، ومنها الهستيدين 1.1% والتايروسين 0.6% والميثيونين 1.4% والايزوليوسين 1.3% والليوسين 1.2% والفينيل الانين 1.7% واللايسين 3.1% والهيدروكسي لايسين 0.9% .

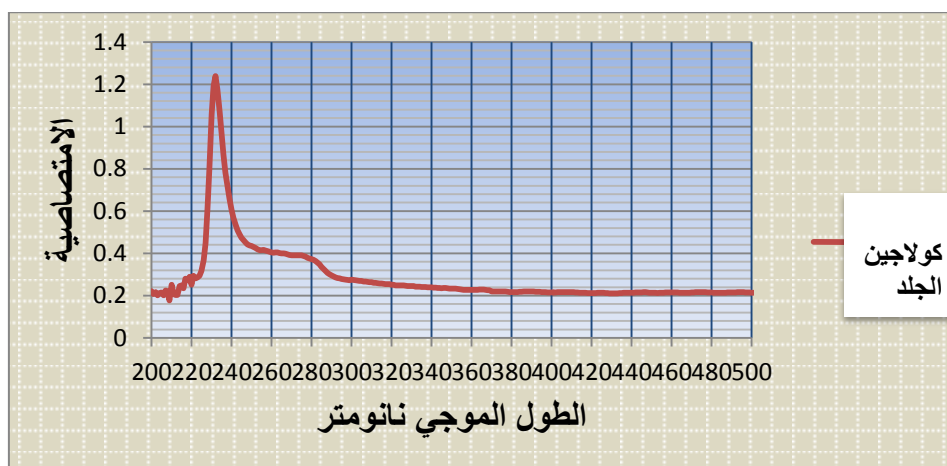
عند الكشف عن الحامض الاميني التريتوفان باستخدام كشف روزنهايم Acree-Rosenheim reaction كانت النتيجة سالبة، وهذا دليل على عدم وجود التريتوفان.

فحص مطياف الأشعة المرئية - الأشعة فوق البنفسجية

يمثل الشكل (2) منحنى مطياف الأشعة المرئية - فوق البنفسجية UV-vis spectra لكولاجين جلد سمك المزلق، إذ يلاحظ وجود قمة امتصاصية واحدة عند الطول الموجي 232 نانوميتر.

جدول (2) محتوى الكولاجين من الاحماض الامينية غم/100غم

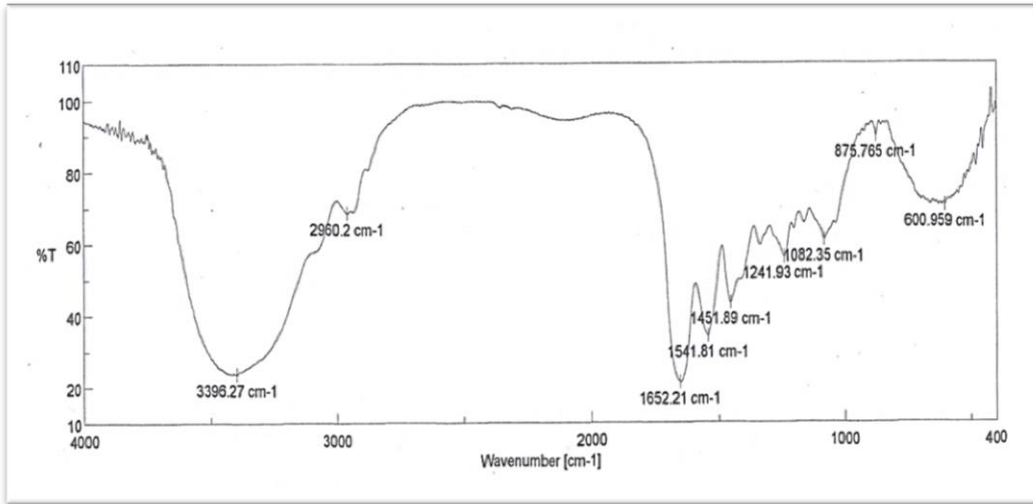
النسبة (غم/100غم)	الحامض الاميني	النسبة (غم/100غم)	الحامض الاميني
0.6	تايروسين	5.1	حامض الاسبارتيك
2.2	فالين	7.7	حامض الجلوتاميك
1.4	ميثيونين	3.4	سيرين
1.3	ايزوليوسين	31.2	كلايسين
1.2	ليوسين	1.1	هستيدين
1.7	فينيل الاتين	6.1	ارجنين
3.1	لايسين	3.2	ثريونين
0.9	هيدروكسي لايسين	9.5	الاتين
99.98	المجموع الكلي	11.4	برولين
20.1	مجموع الحوامض الإمينية	8.7	هيدروكسي برولين



شكل (2) منحنى الأشعة المرئية - فوق البنفسجية لكولاجين جلد سمك المزلق

التشخيص بمطياف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR)

يبين الشكل (3) مرتسم مطيافية الأشعة الحمراء FT-IR لكولاجين جلد سمك المزلق. اذ يلاحظ ما يأتي :-
 - الامايد A، عند العدد الموجي 3408.57 سم⁻¹ والامايد B عند العدد الموجي 2934.89 سم⁻¹ والامايد I عند
 العدد الموجي 1651.73 سم⁻¹ والامايد II عند العدد الموجي 1540.85 سم⁻¹ والامايد III عند العدد الموجي
 1243.38 سم⁻¹، فضلاً عن وجود قمم امتصاص قرب العدد الموجي 1451 سم⁻¹ في الكولاجين المحضر.



شكل

(3) مرئسم طيف الأشعة تحت الحمراء لكولاجين جلد سمك المزلق

المناقشة

ان نسبة البروتين في جلود سمك المزلق بلغت 29.27 %، وهي اعلى بقليل من نسبة البروتين في جلد سمك السلور المخطط (الجري) (27.26 %) و ان نسبة الدهن في جلد المزلق كانت 2.58 %، وهي مقارنة لنسبة الدهن في جلد سمك السلور العملاق والتي بلغت 2.69 % الا انها اقل بكثير من نسبة الدهن في كل من جلد سمك السلور المخطط 20.24 %، نسبة الرماد في جلد سمك المزلق 0.69 % وهي اعلى بقليل من نسبة الرماد في جلد سمك السلور المخطط و جلد سمك السلور (الجري) العملاق التي بلغت النسبة 0.23 % و 0.25 % على التوالي (Thitipramote and Rawdkuen, 2011)، ويعود السبب في ارتفاع نسبة المواد الصلبة الكلية في الكولاجين المحضر الى كفاءة عملية التجفيد وارتفاع نسبة البروتين فيه فقد بلغت 93.41 % وهذه النتيجة جاءت مقارنة لما حصل عليه Hema et al. (2013) عند تحضيره الكولاجين من جلد سمك التونة Tuna والروهو Rohu الكارب وسمك القرش Dog Shark اذ بلغت نسبة البروتين 91.08 % و 89.94 % و 90.8 % على التوالي. ارتفاع الرطوبة في الكولاجين المحضر ربما يعود الى الإختلاف في تركيب الكولاجين، اذ تساعد بعض المواد على ربط الماء مثل السكريات التي بلغت 1.43 % وهذه النتيجة جاءت مقارنة لنسبة السكر المرتبط بالكولاجين المحضر من جلد العجل calf skin 1.45 % وهي اقل من نسبة السكر المرتبط بالكولاجين المحضر من جلد الحبار الفرعون 3.40 % (Nalinanon et al., 2012)، وقد يعزى سبب انخفاض نسبة الدهن الى ازالة الدهن بالمذيب لعدة مرات قبل عملية الإستخلاص، فضلا عن ان نسبة الدهن قليلة اصلاً في المادة الاولية، ويعزى سبب انخفاض نسبة الرماد في كولاجين جلد الأسماك الى اجراء عملية (التصديف)، أي ازالة الصدفة التي تغطي الجلد والتي تحتوي على نسبة من العناصر المعدنية، ومن نتائج الترحيل الكهربائي يلاحظ وجود نوعين مختلفين على الاقل من سلاسل الفا α في كولاجين جلد سمك المزلق، مما يدل على انه من النوع الأول، وان السلسلة الثالثة هي α_3 ، ان وجدت فانه من الصعب فصلها تحت هذه الظروف بسبب كون المسافة التي تقطعها هي المسافة نفسها التي تقطعها α_1 عند الترحيل وبالتالي سوف يكونان في نفس الموقع (Kimura, 1992). احتوى الكولاجين المحضر على نسب متباينة من الحوامض الامينية ويمثل حامض الكلايسين النسبة الاكبر من مجموع الحوامض الامينية الكلية وتعد هذه النسبة من الصفات المميزة للكولاجين اذ

تكون نسبة الكلايسين بحدود ثلث كمية الحوامض الامينية للكولاجين (طاهر،1990)، ان نسبة الحامضين (البرولين والهيدروكسي برولين) جاءت مقارنة لما وجدته Zeng et al.(2012) اذ بلغ مجموعهما في جلد سمك الكوبيا (*Rachycentron canadum* (Cobia) 20.3%، لكن النتائج كانت أعلى مما وجدته Li et al.(2013) عند دراسته الحوامض الأمينية لكولاجين جلد سمك الماكريل الاسباني Spanish mackerel اذ بلغت 17.7%، ان الاختلاف في نسبة هذين الحامضين مرتبط ببيئة ودرجة حرارة جسم الحيوان (Rigby,1968). ان وجود الهيدروكسي برولين وهيدروكسي لايسين يعد من الصفات الفريدة للكولاجين ، كما يعد حامض الهيدروكسي لايسين من الحوامض الامينية غير الاعتيادية الموجودة في الكولاجين وتتفاوت نسبة الهيدروكسي لايسين في الكولاجين تبعاً للعمر والحالة المرضية (Pearson and Young,1989).

ان عدم وجود التريتوفان صفة مميزة للكولاجين، اذ يعد الكولاجين من البروتينات الناقصة التي لا تحتوي على التريتوفان (الطائي، 1987). وجاءت هذه النتيجة متفقة مع Hema et al.(2013) عند تحضيرهم الكولاجين من جلود ثلاثة أنواع من الأسماك، هي التونة Tuna، والروهو Rohu، والقرش الكلب Dog Shark اذ لم يظهر التريتوفان في كل العينات. إن عدم وجود التريتوفان في الكولاجين المحضر من جلد سمك المزلق يعد دليلاً على نقاوته وعدم وجود بروتينات اخرى (Pearson and Young,1989). واطهرت النتائج وجود قمة امتصاص واحدة للكولاجين المحضر عند طول موجي 232 نانومتر واتفقت مع Liu et al.(2007) عند قياس الامتصاصية لكولاجين جلد سمك سلور القناة، اذ امتلك أعلى امتصاصية عند طول موجي 232 نانومتر، بصورة عامة، فإن الكولاجين يمتلك اعلى امتصاصية في مدى قريب من 200-240 نانومتر، ويعود ذلك للغياب الكامل للتريتوفان والانخفاض الكبير في التايروسين (Hema et al., 2013) ان الإمتصاصية المميزة القريبة من الطول الموجي 220 نانومتر ساهم بها الإنتقال الألكتروني نوع $n \pi^*$ للأصرة المزدوجة $C = O$ في الأواصر البيبتيدية (Liu and Liu, 2006). ان الإمتصاصية المميزة للكولاجين في مدى امتصاصية يتراوح بين 220-230 نانومتر مع وجود امتصاصية قليلة أو عدم وجود امتصاصية وعند طول موجي 280 نانومتر هي خاصة مميزة لبروتين الكولاجين وان وجود قمة امتصاص صغيرة عند الطول الموجي يدل على نقاوة الكولاجين المحضر، وان وجود مثل هذه القمة يعود الى الارتفاع النسبي للتايروسين والفينيل الالينين في النوعين كليهما من الكولاجين (Yan et al., 2008). ان ظهور حزمة الامايد A ذات امتصاصية واسعة لكولاجين جلد السمك، التي تعود أساساً الى الإهتزاز الإمتطاطي لكل من OH وNH، تعزى بشكل رئيس الى وجود الأواصر الهيدروجينية (Doyle et al., 1975). ان حزمة الامايد B في كولاجين جلد السمك تعود الى الإهتزاز الإمتطاطي غير المتماثل للمجموعة CH_2 (Abe and Krimm, 1972)، أما حزمة الامايد I فتعود بالأساس الى الإهتزاز الإمتطاطي لمجموعة $C=O$ او مقترن بالأصرة الهيدروجينية لمجموعة $-COO$ (Payne and Veis, 1988)، وان حزمة الامايد II تعود الى الاهتزاز الانحنائي المستوي لمجموعة NH والاهتزاز الامتطاطي لمجموعة CN (Barth, 2007) بينما الأمايد III وهي حزمة ضعيفة في مطيافية الأشعة تحت الحمراء، تقع في العادة بين عدد موجي 1250-1350 سم⁻¹ (Mansur et al., 2002) وتعود الحزموه الى الإهتزاز الانحنائي المستوي لمجموعة NH المقترن بالإهتزاز الامتطاطي لمجموعة CN الناتجة عن ترابط الامايد، فضلاً عن الامتصاص الناشئ عن الإهتزاز التذبذبي لمجموعة CH_2 في هيكل الكلايسين والسلسلة الجانبية للبرولين (Plepis et al., 1996) وهي تشير الى ان الاواصر الهيدروجينية مرتبطة بالكولاجين، ان النسبة بين الامايد III والعدد الموجي

1450 سم⁻¹ يستعمل للدلالة على التركيب الحلزوني الثلاثي للكولاجين اذا كانت النتيجة قريبة من 1.0 (Plepis 1.0) (Singh *et al.*, 1996). ان النسبة بين العدد الموجي 1450 سم⁻¹ وامتصاص الامايد III للكولاجين كان 1.166، وهي نسبة قريبة من 1.0، وهذا يؤكد التركيب الحلزوني الثلاثي، وجاءت هذه النتيجة متوافقة مع Singh *et al.* (2011) الذي وجد ان النسبة بين العدد الموجي 1450 سم⁻¹ وامتصاص الامايد III لكولاجين جلد سمك السلور المخطط بحدود 1.16 والذي عدها مؤشرا على التركيب الحلزوني للكولاجين، فضلاً عن وجود قمم امتصاص قرب العدد الموجي 1451 سم⁻¹ في الكولاجين المحضر. هذا يطبق الى حد كبير على حلقة pyrrolidine في البرولين والهيدروكسي برولين بحسب ما ذكره (Muyonga *et al.* (2004).

استنتاجات الدراسة

نستج من الدراسة الحالية امكانية تحضير كولاجين النوع الأول من جلود سمك المزلق المتوفر في السوق المحلية وبكميات كبيرة بنقاوة عالية وبنسبة حاصل عالية واستخدام بعض التقنيات الحديثة وتوصيفه وبالتالي استخدامه في العديد من المجالات الغذائية والطبية والصيدلانية.

المصادر

الطائي، منير عبود جاسم. (1987). تكنولوجيا اللحوم والأسماك. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. مطبعة جامعة البصرة
 طاهر، محارب عبد الحميد (1990). علم اللحوم. مطبعة دار الحكمة، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة البصرة، كلية الزراعة.

- Abe, Y. and Krimm, S.(1972). Normal vibrations of crystalline polyglycine I. *Biopolymers*, 11 (9); 1817–1839 .
- AOAC. (2000). Official methods of analysis. Arlington: Association of Official Ananalytical Chemists (17th Ed.). Washengton DC, USA .
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica. Biophysica Acta*. 1767: 1073-1101.
- Brinckmann, J.; Notbohm, H. and Mueller, P. K.(2005). Collagen Primer in Structure, Processing and Assembly, Springer /New York . 35 : 21-27.
- Das, D. (1980). Biochemistry. Academic Publishers. 2ed edition , p. 56.
- Doyle, B.B.; Bendit , E. G.; and Blout , E. R. (1975). Infrared spectroscopy of collagen and collagen – like polypeptides . *Biopolymers*. 14: 937-957.
- Dubois , M.K. ; Gillis, A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. and Smith. F.(1956) . Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemical* . 28: 350-356.
- Fišerová, K. (2009). Determination Of Collagen Degradation Degree Using Spectroscopy, Ph.D. Thesis: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 82p.
- Hemaa, G.S.; Shynia, K.; Suseela , M.; Anandana, R.; George, N. and Lakshmanan, P.T. (2013). A simple method for isolation of fish skin

- collagen- biochemical characterization of skin collgagen extracted from Albacore Tuna (*Thunnus Alalunga*), Dog Shark (*Scoliodon Sorrakowah*), and Rohu (*Labeo Rohita*). Annals of Biological Research, 4 (1) :271-278.
- Kadler, K.E; Baldock, C.; Bella, J. and Boot-Handford R.P. (2007). Collagens at a glance. J. Cell Sci. ,120: 1955-1958.
- Kimura, S. (1992). Wide Distribution of the Type I Collagen $\alpha 3$ Chain in Bony Fish. Comparative Biochemistry and Physiology. 102B: 255-260.
- Kittiphattanabawon, P.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Nagai, T. and Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chemistry. 89(3): 363– 372.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Li, Z.R.; Wang, B.; Chi, C.F.; Zhang, Q.H.; Gong, Y.D.; Tang, J.J.; Luo, H.Y. and Ding, G.F.(2013). Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorous niphonius*). Food Hydrocolloids. 31: 103–113.
- Liu, H.; Li, D. and Guo, S. (2007). Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictaurus punctaus*). Food Chemistry. 101: 621- 625.
- Liu, Y. K. and Liu, D. C. (2006). Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. Food Chemistry. 99: 244–251.
- Mansur, H.S.; Oréface R.L.; Pereira, M.M.; Lobato, Z.I.P.;Vasconcelos, W.L. And Machado, L.J.C. (2002). FTIR And UV-Vis Study Of Chemically Engineered Biomaterial Surfaces For Protein Immobilization. Spectroscopy-An International Journal. 16 (3-4):351-360.
- Muyonga, J. H.; Cole, C. G. B. And Duodu, K. G. (2004) . Characterization Of Acid Soluble Collagen From Skins Of Young And Adult Nile Perch (*Lates Niloticus*). Food Chemistry. 85: 81–89.
- Myllyharju, J. And Kivirikko, K.I. (2004). Collagens, Modifying Enzymes And Their Mutations In Humans, Ies And Worms. Trends Genet 20:33-43.
- Nagai , T. and Suzuki, N. (2000). Isolation of Collagen from Fish Waste Material—Skin, Bone and Fins. Food Chemistry. 68: 277-281.
- Nalinanon, S.; Benjakul, S. and Kishimura, H. (2012). Partial Characterization of Collagen from Pharaoh Cuttlefish (*Sepia Pharaonis*) Skin . International Conference on Nutrition and Food Sciences. 39:47-51.
- Oikarinen, A. (2006). Connective tissue and aging. Int. J. Cos . Sci. 26 : 107.
- Payne, K.J. and Veis, A.(1988). Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. Biopolymers. 27 (11):1749–1760.

- Pearson, A. M. and Young, R. B. (1989). Muscle and Meat Biochemistry . United Kingdom Edition published by academic press limited 24-28 oval road, london nw1 7dx.
- Plepis, A. M.; Goissis, G. D. and Das Gupta, D. K. (1996). Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. Polymer Engineering and Science. 36(24): 2932–2938.
- Rigby , B.(1968). Amino-acid composition and thermal stability of skin collagen of the Antarctic ice-fish. Nature, 219, 166-167.
- Shahiri, T. H.; Maghsoudlou, Y.; Motamedzadegan, A.; Sadeghi- mahoona, A. R. and Rostamzad, H.(2012). Study on some properties of acid-soluble collagens isolated from fishskin and bones of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). International Food Research Journal. 19(1): 251-257.
- Singh, p.; Benjakul , S.; Maqsood, S. and Kishimura, H. (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Food Chemistry. 124: 97–105.
- Thitipramote, N. and Rawdkuen, S.(2011). Histological structure and chemical composition of the farmed giant catfish's skin. Journal of the Microscopy Society of Thailand. 4(2): 89-93.
- Whitford, D.(2005). Protein Structure and Function. John Wiley and Sons Ltd., England, 528 p.
- Yan, M.; Li, B.; Zhao, X.; Ren, G.; Zhuang, Y., Hou, H., Zhang, X. ; Chen, L. and Fan. Y. (2008). Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) . Food Chemistry. 107 : 1581–1586.
- Zeng, S.K.; Yin, J.J.; Yang, S.Q.; Zhang, C.H.; Yang, P. and Wu, W.L. (2012). Structure and Characteristics of Acid and Pepsin-Solubilized Collagens from the Skin of Cobia (*Rachycentron canadum*). Food Chemistry. 135: 1975-1984.

Extraction Of Collagen From Fish Oriental Sole *Brachirus orientalis* Skin And Studying Of Some Chemical Characristics And Amino Acid Composition

Aum-El-Basher, H.J.AL-Mossawi and Mohammed Zyarah Eskander*

Dep. of Food Science / College of Agriculture / Univ. of Basrah

Abstract

This study includes the extraction of acid soluble collagen (Acetic acid 0.5 M) from fish Oriental sole skin . After the removal of fat and non-collagenous proteins and dialyzed against distilled water, some the chemical properties were studied, that includes chemical composition and the percentage of yield were 12.15 % on the basis of wet weight. According to the electrophoretic patterns, the collagen consisted of two different chains (α_1 and α_2), were characterized to be type I, β chain components as well as the observed was larger molecular weight , When estimating amino acid collagen observed that there is variation in the percentage of amino acid major such as glycine , proline , hydroxyproline and hydroxy lysine, When measuring the absorption spectrum of ultraviolet (UV) there was a single peak absorption at 232 nm for collagen fish skin, FTIR showed regions of amides A, B, I, II and III were 3408.57, 2934.89, 1651.73, 1540.85 and 1243.38 cm^{-1} respectively.

Key word : collagen , fish Oriental sole , amino acid , yield