جداسازی و شناسایی ترکیب اسیدهای آمینه در گوشت ماهی کپور دریایی (*Cyprinus carpio*) حوزه جنوبی دریای خزر

- **انوار بحرانی***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **رسول قربانی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **جمشید فولادی**: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران
- **سعید نوجوان**: گروه شیمی، دانشکده علوم شیمی و نفت، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۸

چکیده

مطالعه حاضر به‌منظور جداسازی و تشخیص اسیدهای آمینه ضروری موجود در بافت عضله ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) صورت گرفت. بدین‌منظور در سال ۱۳۹۷ تعداد سه قطعه ماهی کپورمعمولی از پره‌های مستقر در سواحل جنوبی دریای خزر نمونه‌برداری و پس از زیست‌سنجی، بافت هدف (عضله) ماهیان جداسازی و در مخزن ازت با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در آزمایشگاه، جهت استخراج پروتئین از روش حل کردن/ رسوب دادن در نقطه ایزوالکتریک، تبدیل پروتئین به اسیدآمینه با روش هیدرولیز اسیدی و برای جداسازی اسیدهای آمینه ضروری از روش کروماتوگرافی لایه نازک استفاده گردید. در این روش از صفحات تجاری TLC Silica gel 60F254 (ساخت شرکت مرک آلمان) به‌عنوان فاز ساکن و از فاز متحرک (بوتانل/اسید استیک/آب) به نسبت‌های (۱:۲:٤) تهیه و جهت آشکارسازی اسیدهای آمینه از معرف نین‌هیدرین استفاده گردید. مقدار کمی اسیدهای آمینه و فاکتور بازداری (Rf) آن‌ها محاسبه گردید. فاز متحرک و ساکن بهینه‌سازی شده و با کیفیت بالا جداسازی را نشان می‌دهد. یافته‌ها به‌روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) نشان دادند که تمامی اسیدهای آمینه ضروری (آرژنین، هیستیدین، فنیل آلانین، ایزولوسین، ترئونین، والین، لوسین، متیونین و لیزین) در بافت عضله ماهی کپور وجود دارد. اسیدآمینه تریپتوفان به‌دلیل هیدرولیز اسیدی تخریب و مشاهده نگردید. ارزیابی ترکیب ۱۷ اسیدآمینه ضروری و غیرضروری به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) اختلاف معنی‌داری را بین اسیدهای آمینه نشان داد به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان اسیدآمینه درگوشت ماهی کپور به لیزین وگلوتامیک اسید وکم‌ترین میزان به آسپارتیک اسید و متیونین اختصاص دارد. بنابراین با توجه به عدم توانایی بدن انسان در ساخت اسیدهای آمینه ضروری، مصرف کپورماهیان در جیره غذایی می‌تواند به‌عنوان تامین‌کننده نیازهای تغذیه‌ای انسان در رشد، تولید انرژی، عضله‌سازی و درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌شمار آید.

کلمات کلیدی: اسیدآمینه، دریای خزر، کپور دریایی، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، HPLC

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: anvarbahrani@gmail.com

(DOI): 10.22034/aej.2020.115473

مقدمه

برخی از اسیدهای آمینه و متابولیت آن‌ها تنظیم‌کننده‌های مهم مسیرهای سوخت و ساز اصلی هستند که برای نگه‌داری، رشد، مصرف غذا و بهره‌برداری از مواد مغذی، ایمنی، رفتار، دگردیسی لاروها، تولید مثل و نیز مقاومت در برابر عوامل استرس‌زای محیط زیست عوامل بیماری‌زا در ماهیان مختلف است. بنابراین، تعاریف متعارف اسید آمینه‌های ضروری و غیرضروری برای فیف‌ها با اکتشافی‌های متعدد به چالش می‌کشد که تائورین، گلوتامین، گلیسین، پرولین و هیدروکسی پرولین باعث رشد، توسعه و سلامت حیوانات آبزی می‌شود. اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری نقش کلیدی در متابولیسم سلولی، فیزیولوژی، رشد و سلامت آبزیان دارند و نوید توسعه افزایش اثربخشی، اطمینان و بهره‌وری را در تولید جهانی آبزی‌پروری را می‌دهند (Peng و همکاران، ۲۰۰۸). در ماهیان به‌عنوان کامل‌ترین منبع پروتئین شناخته شده‌اند (Erdem و همکاران، ۲۰۰۹). ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین ماهی به عوامل درونی هم‌چون نوع گونه، اندازه بدن و جنسیت و عوامل خارجی چون منابع غذایی، فصل، مقادیر درجه حرارت و شوری آب وابستگی دارد (Borresen و همکاران، ۱۹۹۲). بیست نوع اسیدآمینه می‌تواند در اثر هیدرولیز پروتئین به‌وجود آید (Hardi و همکاران، ۱۹۸۵). اسیدآمینه‌های ضروری در تغذیه انسان مهم هستند به این دلیل که بدن انسان از نظر فیزیولوژیکی توانایی ساخت این اسیدآمینه‌ها را ندارد. بنابراین تنها راه فراهم کردن این اسیدآمینه‌های ضروری، مصرف غذاهای حاوی آن‌هاست. تمام اسیدآمینه‌های ضروری برای ساخت پروتئین در بدن انسان مورد نیاز می‌باشند (گورابی و حسینی، ۱۳۹۷). بافت ماهیچه بیش‌تر از سایر بافت‌ها تحت تاثیر ترکیب اسیدهای آمینه جیره غذایی قرار می‌گیرد، هم‌چنین ترکیبات اسیدهای آمینه بافت ماهیچه در ماهیان پرورشی می‌تواند با ماهیان وحشی متفاوت باشد (ذاکری و همکاران، ۱۳۹۱). کپورمعمولی (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) یکی از گونه‌های با ارزش ماهیان استخوانی است که در نواحی جنوبی دریای خزر از نظر اقتصادی حایز اهمیت است (قلیچ‌پور و همکاران، ۱۳۸۹). کپورمعمولی متعلق به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) است که این خانواده بزرگ‌ترین خانواده در بین ماهیان است. ماهی کپورمعمولی به‌دلیل رشد سریع، امکان تکثیر مصنوعی و تغذیه و نگهداری به‌صورت متراکم و دارا بودن مقاومت بالا در مقابل عوامل فیزیکی و شیمیایی آب از جمله ماهیان مهم پرورش جهان است (حق‌پناه و همکاران، ۱۳۹۶). این گونه یکی از ماهیان مورد علاقه ساکنان شرقی دریای خزر بوده، اما متاسفانه میزان صید آن در سال‌های اخیر به‌شدت کاهش یافته است (قربانی و همکاران، ۱۳۸۹). تعیین ارزش غذایی ماهی کپورمعمولی دو منطقه بندر انزلی و بهشهر نشان داد که مصرف این ماهی در زمان استراحت جنسی (پاییز) از پروتئین بالاتری برخوردار است (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۴). بررسی پروفایل اسیدهای آمینه درسه قطعه کپور معمولی صید شده از استان گیلان با عامل مشتق سازO-فتال دی آلدهید(OPA) و با روش HPLC نشان داد بیش‌ترین مقدار به اسیدآمینه‌های ضروری (لوسین) و غیرضروری (گلوتامیک اسید) اختصاص یافته است (قمی و همکاران، ۱۳۹۰).بررسی تغییرات ۱۷اسیدآمینه‌در فیله کپورمعمولی تهیه شده از استخرهای پرورش ماهی بابلسر طی ۶ ماه نگه‌داری در سردخانه ۱۸- درجه به‌وسیله روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد میزان اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری کاهش یافته است. بیش‌ترین تغییر معنی‌دار مربوط به اسیدآمینه لیزین و کم‌ترین به‌اسیدآمینه پرولین‌اختصاص‌یافت (خانی و همکاران، ۱۳۹۱). مقایسه پروفیل اسیدهای آمینه فیله ماهی کپور معمولی و گورامی عظیم الجثه به‌منظور تجزیه و تحلیل فاز پرورشی ماهی گورامی عظیم الجثه (*Osphronemus goramy*) به‌مدت یک‌سال و با جیره تجاری ماهی کپور پرورش یافتند. نتایج HPLC نشان داد اسیدهای آمینه ضروری آرژنین، هیستیدین، لیزین، ترئونین و تریپتوفان و اسیدهای آمینه غیرضروری آلانین و سرین در ماهی گورامی عظیم الجثه در مقایسه با کپور معمولی به‌صورت معنی‌دار در سطوح بالاتری قرار داشته و نسبت اسیدهای آمینه ضروری به غیرضروری در دو گروه از ماهیان فاقد اختلاف معنی‌دار بود (سوداگر و همکاران، ۱۳۹۷). آنالیز ترکیب اسیدآمینه عضله کپورمعمولی (در کشور هند) به‌روش‌کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که غنی از اسیدهای آمینه اسیدگلوتامیک و گلایسین می‌باشد (Mohanty و همکاران، ۲۰۱۴). مطالعه تطبیقی درخصوص تجزیه و تحلیل میزان سمیت آمین‌های بیوژن (هیستامین، کدوسین و پوترسین) ماهی و محصولات دریایی درکشورهند به‌وسیله روش HPLC نشان داد تعیین خطی بودن (۵-۱۰۰نانوگرم) با تکرار پذیری حدود ۳٪ بسیار مناسب اما پرهزینه و زمان بر بوده و در روش TLC مقدار خطی بودن کاهش یافته (۲۰-۳۰۰ نانوگرم) و با تکرار پذیری ۸٪ یک روش غربال‌گری مناسب، سریع و به صرفه است (jeya Shakila و همکاران، ۲۰۱۴). هدف از این مطالعه تطبیقی اندازه‌گیری کمی‌و کیفی‌اسیدهای‌آمینه‌موجوددرکپوردریایی‌باروش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) است. کروماتوگرافی لایه نازک(TLC) که یک تکنیک کروماتوگرافی با بستر باز است و عموماً در یک لایه نازک از فاز ساکن پوشش یافته برروی شیشه انجام می‌شود. برای جداسازی بهینه در تکنیک TLC به دو فاز ساکن و متحرک نیاز است. دلیل اصلی استفاده فراوان از تکنیک مذکور پاسخ‌دهی آن در زمان کم و هزینه کم‌تر است.

(DOI): 10.22034/aej.2020.115473

(طهماسبی و حسین‌زاده، ۱۳۹۲).HPLC یک فرایند جذب سطحی پویا است که یکی از پرکاربردترین روش‌های کروماتوگرافی است که با بهره‌گیری از یک فاز متحرک مایع، ترکیبات یک مخلوط را روی فاز ساکن جدا می‌کند (یوسفی و همکاران، ۱۳۹۲). مطالعه‌ای در خصوص جداسازی اسیدهای آمینه ماهی به‌روش کروماتوگرافی لایه نازک در ایران مشاهده نگردید. قبل از فرایند اندازه‌گیری اسیدهای آمینه، مراحل استخراج پروتئین عضله به‌روش حل کردن/رسوب دادن در نقطه ایزوالکتریک انجام و جهت تبدیل پروتئین استخراج شده به اسیدآمینه از هیدرولیز اسیدی استفاده شد. جداسازی و تشخیص اسیدهای آمینه موجود در بافت عضله ماهی کپور در تعیین ارزش غذایی آن امری ضروری است. اسیدهای آمینه ضروری، غیرضروری برای ماهیان و سایر آبزیان به سه دسته اسیدهای آمینه ضروری (آرژنین، هیستیدین، ایزولوسین، لوسین، لیزین، متیونین، فنیل آلانین، ترئونین، تریپتوفان، والین) اسیدهای آمینه غیرضروری (آلانین، آسپارژین، آسپارتات، گلوتامات، گلایسین، سرین، تیروزین) و اسیدهای آمینه نیمه‌ضروری (سیستئین، گلوتامین، هیدروکسی پرولین، تئورین) تقسیم می‌شوند (Peng و همکاران، ۲۰۰۸).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در این مطالعه تعداد ۳ نمونه ماهی کپورمعمولی از تورهای شرکت‌های تعاونی پره ماهیان استخوانی مستقر در سواحل جنوبی دریای خزر در نواحی صیادی استان‌های گلستان (گمیشان) و گیلان (آستارا) انتخاب شد. پس از زیست‌سنجی نمونه‌ها و توزین آن‌ها داده‌ها ثبت گردید. ۳ نمونه ماهی به‌ترتیب دارای طول کل ۲۹/۹، ۲۸/۷، ۲۸/۳ سانتی‌متر و وزن کل ۳۸۰، ۳۲۲، ۳۳۸ گرم به‌طور تصادفی انتخاب شدند. نمونه‌های بافت عضله ماهیان از ناحیه زیرین باله پشتی بلافاصله پس از صیدجداسازی و درلوله فالکون قرارداده شد، لوله‌های فالکون حاوی بافت عضله در مخزن ازت با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و تا آماده‌سازی نمونه‌ها به فریزر۳۰- درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه الزهراء انتقال یافت (تعداد نمونه‌های تهیه شده در هر ناحیه صیادی بستگی به فصل صید گاهاً بیش‌تر از سه نمونه بوده اما برای شناسایی اسیدهای آمینه به روش کروماتوگرافی لایه نازک تعداد نمونه اهمیت ندارد، زیرا سنجش به‌روش کیفی انجام‌می‌پذیرد و هدف تشخیص اسیدهای‌آمینه ضروری در ماهی کپور بوده است).

مراحل استخراج پروتئین: استخراج پروتئین به‌روش حل کردن/ رسوب دادن در نقطه ایزوالکتریک (Chen و همکاران، ۲۰۰۹). انجام گرفت. برای آماده‌سازی نمونه جهت استخراج پروتئین مقدار ۱ گرم از بافت عضله ماهی در نیتروژن مایع قرار گرفته سپس در آب حل شد. در ادامه به‌وسیله هموژنایزر به‌مدت ۲۰ دقیقه خرد و یکنواخت گردید. سپس pH نمونه حل شده به‌وسیله سود به ۱۱/۵ رسید. این مرحله، حلالیت در نقطه ایزوالکتریک نام دارد که در آن پروتئین‌ها در آب حل می شوند. نمونه با دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. سه لایه (چربی، پروتئین‌های محلول، قسمت های حل نشده) در این مرحله تشکیل و لایه میانی یعنی (پروتئین‌های محلول) جداسازی گردید. در مرحله بعد رسوب دادن در نقطه ایزوالکتریک انجام شد و pH محلول جدا شده به‌بوسیله هیدروکلریک اسید به ۵/۵ رسانده شد. نمونه مجدداً با دور ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید که نتیجه آن تشکیل دو لایه آب و رسوب پروتئین عضله ماهی است که در نهایت رسوب برای هیدرولیز جداسازی می‌گردد.

هیدرولیز اسیدی: برای تبدیل پروتئین‌ها به اسیدهای آمینه با استفاده از روش‌هیدرولیز اسیدی،حدود ۱۰۰ میلی‌گرم‌از پروتئین‌های استخراج شده در ۱۰ میلی‌لیتر از هیدروکلریک اسید ۶ نرمال حل شد و نمونه به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد در حالت رفلاکس قرارداده شد. نمونه هیدرولیز شده از کاغذ صافی عبور داده شد و خشک گردید. سپس در آب و متانول با نسبت ۳۰/۷۰ حل شده و از فیلتر ۴۵ میکرونی عبور داده شد (محسنی‌اژیه، ۱۳۹۳).

تهیه‌محلول‌های‌استاندارد اسیدهای‌آمینه:مقدار ۱ میلی‌گرم از اسیدهای آمینه ضروری استاندارد با ۱میلی‌لیتر آب یونیزه حل شد و در میکروتیوپ قرار گرفت، سپس با دستگاه ورتکس میکسر به‌مدت ۵ دقیقه همگن شد.

کروماتوگرافی لایه نازک(TLC):کروماتوگرافی لایه نازک یک روش جداسازی ساده، انعطاف‌پذیر، حساس و با هزینه‌ای مناسب برای تجزیه و تحلیل کمی و کیفی مواد حتی در مقادیر بسیار کم، در آزمایشگاه می‌باشد. تکنیک TLC قابلیت اندازه‌گیری موازی و هم‌زمان بسیاری از مواد را در حداقل زمان مورد نیاز، دارد و می‌تواند به‌صورت دستی با روشی ارزان و آسان انجام شود. TLC هم‌چنین در جداسازی انانتیومرهای ترکیبات‌مختلف نیز موفق بوده است(Bushanو همکاران، ۲۰۱۴). TLC به‌عنوان تکنیک تهیه‌ای برای جداسازی و خالص‌سازی نمونه‌ها نیز به‌کار می‌رود. تعداد زیادی از اسیدهای آمینه با TLC اندازه‌گیری می‌شوند. در این مطالعه کروماتوگرافی لایه نازک بر روی صفحات سلیکاژل با ابعاد ۲۰×۲۰سانتی‌متر تهیه شده از شرکت مرک در سه تکرار انجام گرفت. در مرحله لکه‌گذاری صفحه سلیکاژل را از یک‌جهت‌و به‌فاصله ۲سانتی‌متراز پایین، به‌طور افقی با مداد خط‌کشی کرده و فواصلی به طول ۱/۵ سانتی‌متر با مداد روی خط‌کشی تعیین

(DOI): 10.22034/aej.2020.115473

گردید. نمونه‌های آماده‌سازی شده بافت ماهی را از ابتدای خط و سپس اسیدهای آمینه استاندارد را لکه‌گذاری نموده و با هود خشک شد (این کار برای تشخیص تعداد لکه‌ها با استانداردها صورت می‌پذیرد). بهتر است لکه‌گذاری اسیدهای آمینه استاندارد برای بار دوم،تکراروخشک‌شوند.دراین مرحله آماده‌سازی مخزن کروماتوگرافی انجام می‌شود. در مورد کروماتوگرافی لایه نازک که به‌صورت بالا رونده است، حلال در ته مخزن قرارداده شد (عوض‌پور و همکاران، ۱۳۹۲). لازم به ذکر است در این آزمایش جهت تشخیص اسیدهای آمینه از فازهای متحرک متعددی مانند (اتانول۹۶٪/آب۳:۷)، (n پروپانول/آب ۳:۷)، (بافرآب، اسیتونیتریل۳:۷)، (n بوتانل/استیک اسید/آب ۱:۲:۴)، (فنول/آب ۱:۲ استفاده شد و فاز متحرک بهینه‌سازی گردید. برای این منظور ابتدا مخزن را شستشو داده و سپس حلال‌های n بوتانل/آب HPLC و اسیداستیک با نسبت‌های (۲:۱:۴) مخلوط گردید و به ته مخزن به‌آرامی اضافه گردید، مدت زمانی حدود ۱۵ دقیقه جهت اشباع مخزن مورد نیاز است. پس از آن صفحه سلیکاژل لکه‌گذاری شده در درون‌مخزن‌قرار داده‌شد.هنگامی‌که ارتفاع حلال تاحدود ۲سانتی‌متری از بالای صفحه آمد، صفحه سلیکاژل از مخزن خارج و زیر هود قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. در این مرحله جهت تشخیص اسید آمینه و اندازه‌گیری RF از معرف نین‌هیدرین برای آشکارسازی نمونه به‌صورت اسپری استفاده شد. سپس صفحه سلیکاژل در آون با دمای پایین خشک گردید. در این مرحله لکه‌ها نمایان شده و حرکت لکه‌های استاندارد اسیدهای آمینه به فاصله طی شده توسط حلال سنجیده شد.

$$Rf = \frac{\text{فاصله طی شده توسط آنالیت}}{\text{فاصله طی شده توسط حلال}}$$

آزمایش مذکور با سه تکرار انجام شد و اسیدهای آمینه استاندارد در نمونه ماهی کپور جداسازی گردید (شکل۱). مراحل فوق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا انجام شد. اسیدآمینه تریپتوفان به‌دلیل تخریب در هیدرولیزاسیدی مشاهده نگردید. جهت حفظ تریپتوفان که یک اسیدآمینه با ارزش‌تر است بهتر است از هیدرولیز بازی استفاده گردد.

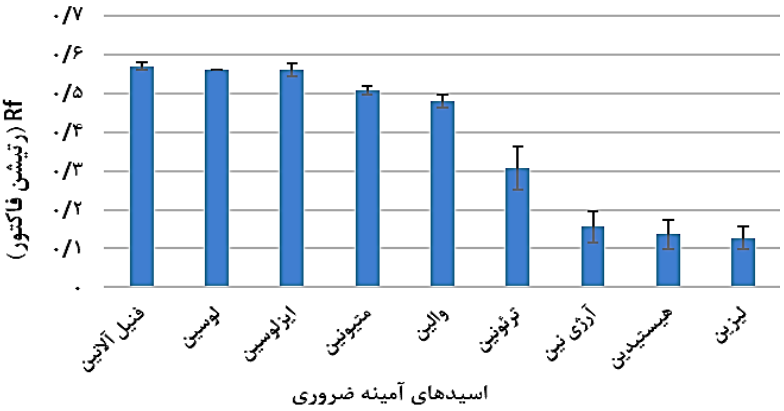
کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC): روش‌های زیادی برای جداسازی و شناسایی اسیدهای آمینه پیشنهاد شده است. بهتر است برای جداسازی اسیدهای آمینه از روش‌های دقیق‌تر آنالیزی مانند HPLC استفاده شود. در مطالعه حاضر نیز جهت تعیین غلظت اسیدهای آمینه یک نمونه از بافت عضله به‌صورت تصادفی انتخاب و پس از مشتق‌سازی با عامل مشتق ساز OPA به دستگاهHPLC ساخت کمپانی Agilent تزریق شد. در این روش از ستون C18 و از روش کروماتوگرافی با فاز معکوس با حجم تزریق ۱۰۰میکرولیتر استفاده گردید. نتایج با استفاده از نرم‌افزار اتوکروم ۳۰۰۰ به‌دست آمد. اسید آمینه تریپتوفان به‌دلیل هیدرولیز اسیدی قابل اندازه‌گیری نمی‌باشد.

شکل۱: جداسازی اسیدهای آمینه ضروری ازبافت عضله سه نمونه ماهی کپور معمولی (۲نمونه گمیشان/۱نمونه آستارا) با روش کروماتوگرافی لایه نازک در سه تکرار- (ا = تکرار اول؛ ب = تکرار دوم؛ پ = تکرار سوم)

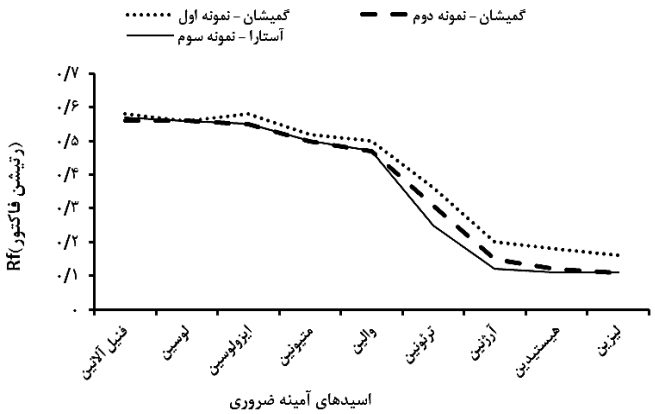
(DOI): 10.22034/aej.2020.115473

نتایج

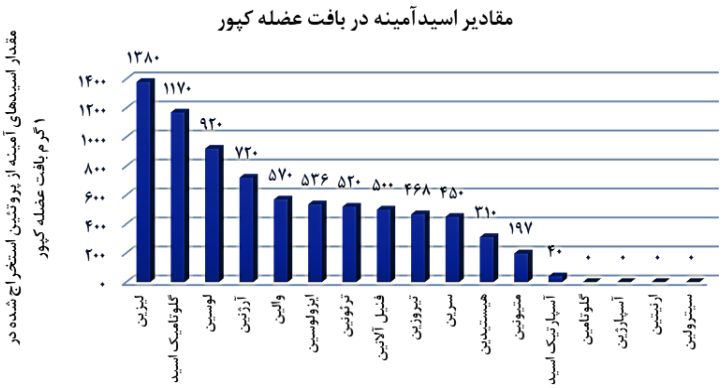
در این مطالعه پس از ارزیابی کیفی به‌روش TLC و تشخیص اسیدهای آمینه ضروری، نمودار میانگین Rf اسیدهای آمینه ضروری رسم شد (شکل‌های ۲ و ۳). بیش‌ترین مقدار Rf به اسیدآمینه فنیل آلانین و کم‌ترین مقدار به اسیدآمینه لیزین اختصاص دارد. انحراف معیار اسیدهای آمینه ضروری بسیار ناچیز بوده و این نشان می‌دهد پراکندگی داده‌ها به میانگین Rf نزدیک است. Rf اسیدآمینه تریپتوفان به‌دلیل این‌که خارج از محدوده باندهای تشکیل شده نمونه ماهی آشکارسازی شد، محاسبه نگردید و به‌طور کیفی می‌توان نتیجه گرفت که هنگام تبدیل پروتئین به اسیدآمینه تخریب شده است. یکی از روش‌های تولید اسیدهای آمینه استخراج از منابع پروتئینی است و نیمی از اسیدهای آمینه، ضروری بوده که باید از طریق رژیم غذایی تامین شوند (محسنی‌اژیه، ۱۳۹۳). ارزیابی ترکیب اسیدهای آمینه با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC در بافت عضله ماهی کپور نشان داد که بیش‌ترین مقدار اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری به‌ترتیب به لیزین و گلوتامیک اسید اختصاص دارد (شکل‌های ۴ و ۵) و هم‌چنین میانگین و انحراف معیار داده‌ها به‌ترتیب ۵۹۹ و ۳۵۹ به‌دست آمد.



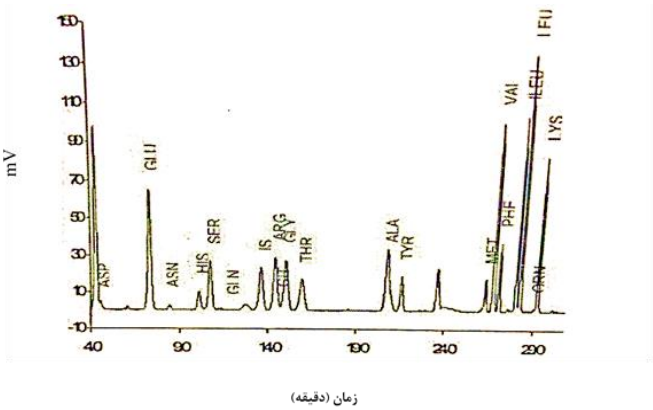
شکل۲: محاسبه میانگین و انحراف معیار رتیشن فاکتور(RF) از اسیدهای آمینه ضروری



شکل۳: محاسبه میانگین و انحراف معیار رتیشن فاکتور(RF) از اسیدهای آمینه ضروری سه نمونه کپور ماهی



شکل۴: اندازه‌گیری مقادیر اسیدهای آمینه در بافت عضله کپور (HPLC)



شکل ۵: محاسبه غلظت اسیدهای آمینه به‌صورت کروماتوگرام مشخص شده است.

(DOI): 10.22034/aej.2020.115473

بحث

مصرف آبزیان به‌عنوان منبع مهم پروتئینی حائز اهمیت است. بالا بودن میزان پروتئین بر رشد اندام‌ها، ترمیم بافت‌ها و عملکرد صحیح سیستم ایمنی در ابتدای رشد جانوران تاثیرگذار است (خنیفر و همکاران، ۱۳۹۲). اسیدهای آمینه نقش مهمی در تنظیم فرایندهای بیان ژن ایفا می‌کنند از جمله سنتز پروتئین که توسط mRNA انجام می‌پذیرد. کمبود اسیدهای آمینه منجر به عدم سنتز پروتئین و در نتیجه بیماری کمبود پروتئین در انسان می‌شود. بنابراین گنجاندن اسیدهای آمینه ضروری در رژیم غذایی مصرفی حیاتی است (Akram و همکاران، ۲۰۱۱).

با وجود مزیت‌های فراوان، سهم مصرف آبزیان و فراورده‌های شیلاتی در سبد غذایی خانوار ایرانی در مقایسه با سایرگوشت‌های مصرفی پایین است (دادگر و همکاران، ۱۳۹۳). اسیدهای آمینه می‌توانند به‌عنوان یک اثر انگشت پایدار طبیعی ترکیب بیوشیمیایی سلول‌ها و اطلاعات حیاتی آنان را شرح دهند. مطالعه قمی و همکاران (۱۳۹۰) بر روی سطوح اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری سه گونه ماهی سفید دریای خزر، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی کپورمعمولی نشان داد که تفاوت‌های اندکی در نسبت‌ها وجود دارد و مصرف ماهیان گران‌قیمت‌تری چون ماهی سفید دریای خزر از ارزش غذایی بالاتری نسبت به دو گونه قزل‌آلا و کپورمعمولی ندارد. پروتئین‌های ماهی از با ارزش‌ترین پروتئین‌های حیوانی هستند، زیرا در مقایسه با پروتئین‌های گیاهی که به‌طور معمول از نظر یک یا چند اسیدآمینه فقیر هستند، حاوی تمامی اسیدهای آمینه ضروری (ایزولوسین،لوسین،تریپتوفان،ترئونین،والین،فنیل‌آلانین، هیستیدین، متیونین و لیزین) به‌مقدار و نسبت مناسب می‌باشند، اگر چه ماهیان آب شیرین در مقایسه با ماهیان آب‌شور (دریایی) مقادیر کم‌تری پروتئین دارند، اما اختلاف معنی‌داری در ترکیب اسیدآمینه آن‌ها وجود ندارد (گورابی و حسینی، ۱۳۹۷). TLC می‌تواند یک روش تحلیلی اولیه قبل از تزریق نمونه به HPLC باشد. بسیاری از روش‌های مطلوب در شیمی صنعتی، صنعت غذا و دارو، خالص‌سازی رنگ‌ها، سم‌شناسی محیط زیست، آب و ... به‌عنوان یک مرجع از TLC استفاده می‌کنند. مطالعه ترکیب اسیدهای آمینه با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در بافت عضله ماهی کپور نشان داد که بیش‌ترین مقدار اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری به‌ترتیب به لیزین و گلوتامیک اسید اختصاص دارد. این ماهی دارای ارزش غذایی بالایی است و به‌عنوان یک منبع ارزشمند پروتئینی نقش تعیین‌کننده‌ای در سلامت انسان دارد. ترکیب اسیدهای آمینه در گونه‌های دریایی و پرورشی این ماهی با توجه به بستر تغذیه‌ای می‌تواند متفاوت باشد. بررسی سطوح اسیدهای آمینه در سه قطعه کپورمعمولی صید شده از استان گیلان به‌روش OPA با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) نشان داد، بیش‌ترین مقدار به اسیدآمینه‌های ضروری (لوسین) و غیرضروری (گلوتامیک اسید) اختصاص یافته است (قمی و همکاران، ۱۳۹۰).

عرضه جهانی ماهی در پنج دهه گذشته برای مصرف انسانی با نرخ متوسط سالیانه ۳/۲٪ رشد داشته، که از رشد ۱/۶٪ جمعیت جهان فراتر رفته است. مصرف سرانه ماهی در اتحادیه اروپا بسیار متغیر بوده و از ۵ کیلوگرم در صربستان و آلبانی به ۹۰ کیلوگرم (۲۰۱۴) در ایسلند که بالاترین مصرف‌کننده ماهی در جهان است، رسید. مصرف سرانه ماهی در پرتغال نیز به ۵۳ کیلوگرم رسید، که دومین رتبه مصرف‌کننده در کشورهای اتحادیه اروپا و تقریباً رتبه سوم در جهان پس از ژاپن محسوب می‌شود (Fernandes Coutinho، ۲۰۱۷).

بهینه‌سازی عرضه اسیدآمینه با توجه به الزمات استفاده از پروتئین برای رشد بدن تحت تاثیر محدودیت‌های محیط زیستی از لحاظ مواد مغذی یک ضرورت عمومی در سیستم‌های جانوری است. باید توانست با رشد سالیانه آبزی‌پروری جهانی این اعتماد را حاصل کرد که این رشد بازتاب مصرف پروتئین با ارزش بالای بیولوژیکی برای مصرف انسانی است. تغذیه منظم از بافت عضله ماهی اهمیت دارد، زیرا علی‌رغم سنتز پایین پروتئین عضله، بهره‌وری و کارایی بالایی دارد (Kaushik و همکاران، ۲۰۱۰).

بنابراین با توجه به اهمیت اسیدهای آمینه در صنعت غذا، دارو، کشاورزی، بهداشت و سلامت جامعه و از طرفی دیگر دارا بودن ۱۸۰۰ کیلومتر مرز آبی در جنوب و ۷۰۰ کیلومتر در شمال کشور تاییدکننده منابع ارزشمند پروتئینی است که می‌توان با مدیریت بهینه صید و ارزیابی ذخایر روش‌های استخراج پروتئین از منابع دریایی را افزایش داد تا علاوه بر تضمین سلامت افراد جامعه در کاهش هزینه‌های صنعتی تولید اسیدآمینه گامی موثر برداشت.

تشکر و قدردانی

به رسم ادب و احترام مراتب سپاس صمیمانه خود را از اساتید بزرگوار و مهربان جناب آقای دکتر رسول قربانی، جناب آقای دکتر جمشید فولادی و جناب آقای دکتر سعید نوجوان اعلام می‌دارد و از کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا خانم سمانه سلیمان کمال تشکر را دارد.

(DOI): 10.22034/aej.2020.115473

منابع

۱. **آووجا، س.، ۲۰۰۳.** کروماتوگرافی و جداسازی، ترجمه طهماسبی، ر. و حسین‌زاده، ر.، ۱۳۹۲. چاپ اول، تهران، فدک ایستاتیس. ۲۵۳ صفحه.

۲. **حق‌پناه، ع.؛ قروی، ب. و ایری، ی.، ۱۳۹۶.** بررسی امکان پرورش ماهی کپور دریایی (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1758) در استخرهای خاکی آب شیرین در استان گلستان. مجله بهره‌برداری و پرورش آبزیان. دوره ۶، شماره ۳، صفحات ۴۳ تا ۴۹.

۳. **خانی، م.؛ انصاری‌فرد، س. و خوشخو، ژ.، ۱۳۹۱.** بررسی تغییرات آمینواسیدها در فیله کپورمعمولی پرورشی *Cyprinus carpio* در طی ۶ ماه نگه‌داری در سردخانه در دمای ۱۸- سانتی‌گراد. مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی. دوره ۲، صفحات ۷۹ تا ۸۸.

۴. **سوداگر، م.؛ فرحی، ا.؛ یوسفی‌سیاه‌کلرودی، س.؛ مازندرانی، م.؛ دادگر، ش. و اجاق، م.، ۱۳۹۷.** مقایسه عملکرد رشد، بازده فیله و پروفیل اسیدهای آمینه ماهیان کپورمعمولی پرورشی (*Cyprinus carpio*) و گورامی عظیم‌الجثه (*Osphronemus goramy*) پرورش یافته در استخرهای بتونی. نشریه علوم آبزی‌پروری. دوره ۶، شماره ۸، صفحات ۳۳ تا ۴۱.

۵. **خنیفر، ژ.؛ احمدی، ع.؛ قورچیان، ه.ا.؛ حاجی‌حسینی، ر.؛ شیخها، م.ح. و حقیرالسادات، ب.ف.، ۱۳۹۲.** مقایسه اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری در پروتئین میکروبی حاصل از کشت پلوروتوس فلوریدا بر روی ضایعات لیگنوسلولزی. مجله پزشکی هرمزگان. دوره ۱۷، شماره ۲، صفحات ۱۱۳ تا ۱۲۰.

۶. **دادگر، ش.؛ صالحی، ح.؛ حاجی‌میررحیمی، س.د. و تیموری، م.، ۱۳۹۳.** سنجش سرانه مصرف آبزیان و ارزیابی موانع و راه کارهای توسعه مصرف در استان مرکزی. مجله علمی شیلات ایران. دوره ۲۳، شماره ۴، صفحات ۱۷ تا ۲۸.

۷. **ذاکری، م.؛ کوچهین، پ. و غفله‌مرمضی، ج.، ۱۳۹۱.** مقایسه ترکیب اسیدهای آمینه در بافت ماهیچه ماهیان وحشی و پرورشی نر و ماده شانگ زرد باله. مجله علوم و فنون دریایی. دوره ۱۱، شماره ۲، صفحات ۵۸ تا ۶۶.

۸. **عوض‌پور، م.؛ سیفی‌پور، ف.؛ عبدی، ج.؛ نبوی، ت. و زمانیان عضدی، م.، ۱۳۹۲.** جداسازی رنگ‌های خوراکی از فراورده‌های قنادی به‌روش کروماتوگرافی با لایه نازک. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. دوره ۸، شماره ۳، صفحات ۷۳ تا ۷۸.

۹. **قلیچ‌پور، م.؛ شعبانی، ع. و شعبان‌پور، ب.، ۱۳۸۹.** مقایسه ساختار ژنتیکی دو جمعیت کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در مناطق قره‌سو و انزلی با استفاده از هشت نشانگر ریزماهواره. مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک. دوره ۲، شماره ۵، صفحات ۴۱ تا ۴۸.

۱۰. **قربانی، ر.؛ یلقی، س. و عقیلی، ک.، ۱۳۸۹.** بررسی و تحلیل وضعیت صید شرکت‌های تعاونی صید پره ماهیان استخوانی استان گلستان در سال بهره‌برداری ۱۳۸۵-۱۳۸۴. مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر. سال ۴، شماره ۳، صفحات ۳۹ تا ۴۷.

۱۱. **قمی، م.ر.؛ جدیددخانی، د. و حسن‌دوست، م.، ۱۳۹۰.** مقایسه پروفیل اسیدچرب و اسیدآمینه و ترکیب شیمیایی لاشه در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) و ماهی سفیددریای خزر (*Rutilus frisii kutum*). مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی. واحد آزادشهر. دوره ۵، شماره ۴، صفحات ۱ تا ۱۶.

۱۲. **گورابی، ر.ط. و حسینی، س.و.، ۱۳۹۷.** اهمیّت مصرف ماهی در پیشگیری از بیماری‌ها. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. دوره ۲۵، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۹.

۱۳. **محسنی‌اژیه، ع.؛ نوجوان، س. و قاسم‌پور، ع.،۱۳۹۳.** بررسی روش‌های مختلف کروماتوگرافی تهیه‌ای برای خالص‌سازی اسیدهای آمینه حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های روده‌ای از منابع طبیعی. پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه (دانشگاه شهید بهشتی). ۷۳ صفحه.

۱۴. **نوروزی، م.؛ مرشدی، ح. و قدرتی، ش.، ۱۳۹۴.** تعیین ارزش غذایی ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio* Linnaeus1758) در دوره استراحت جنسی (پاییز) و رسیدگی جنسی (بهار) در دو منطقه بندرانزلی و بهشهر. نشریه توسعه آبزی‌پروری. دوره ۹، شماره ۱، صفحات ۸۱ تا ۹۱.

۱۵. **یوسفی، م.؛ نادری، م. و بهراد، ز.، ۱۳۹۲.** مقدمه‌ای بر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا کاربرد آن در جداسازی نانوذرات طلا. فصلنامه تخصصی دانش آزمایشگاهی ایران. دوره ۱، صفحات ۳۷ تا ۴۵.

۱۶. **Bushan, R.; Martens J. and Batra, S., 2014.** Amino Acids Thin-Layer (Planar) Chromatography. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier. pp: 1-27.

۱۷. **Borresen, T., 1992.** Quality of Wild and reared fish. In: Huss, H.H., M. Jacobsen and J. Liston (Eds.). Quality assurance in the food industry. Elsevier, Amsterdam. pp: 1-17.

۱۸. **Chen, Y.C.; Tou, J.C. and Jaczynski, J., 2009.** Amino acid and mineral composition of protein and other components and their recovery yields from whole Antarctic krill (*Euphausia superba*) using isoelectric solubilization/ precipitation. Journal of Food Science. Vol. 74, No. 2, pp: 31-39.

۱۹. **Erdem, M.; Baki, B. and Samsun, S., 2009.** Fatty acid and Amino acid compositions of Cultured and wild Sea Bass from different Regions in Turkey. Journal of Animal and Veterinary Advances. Vol. 8, No. 10, pp: 1959-1963.

(DOI): 10.22034/aej.2020.115473

۲۰. **Fernandes Coutinho, F., 2017.** Potential benefits of functional amino acids in fish nutrition. Departamento de Biologia. 105 p.

۲۱. **Hardy, P.M., 1985.** The protein amino acids. In: chemistry and biochemistry of the amino acids (Barrette, G.C., ed.). Chapman and Hall, London. pp: 6-24.

۲۲. **Jeya, S.R.; Vasundhara, T.S. and Kumudavally, K.V., 2001.** A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. ElSEVIER, Food Chemistry. Vol. 75, pp :255-259.

۲۳. **Kaushik, S.J. and Seiliez, I., 2010.** Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. Aquaculture Research. Vol. 41, pp: 322-332. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02174.x

۲۴. **Akram, M.; Asif, H.M.; Uzair, M.; Akhtar, N.; Madni, A.; Ali Shah, S.M.; ul Hasan, Z. and Ullah, A., 2011.** Amino acids: A review article. Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 5, No. 17, pp: 3997-4000.

۲۵. **Mohanty, B.; Mahanty, A.; Ganguly, S. and Sankar, T.V., 2014.** Amino Acid Compositions of 27 Food Fishes and Their Importance in Clinical Nutrition. Journal of Amino Acids. pp: 1-7.

۲۶. **Peng, L.; Kangsen, M.; Trushenski, J. and Guoyao, W., 2008.** New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. DOI 10.1007/s00726-008-0171-1.

(DOI): 10.22034/aej.2020.115473

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 3, Autumn 2020

Investigation of Amino Acids composition in Common Carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) using High-performance Liquid Chromatography (HPLC) and Thin Layer Chromatography (TLC) from the southern of Caspian Sea

- **Anvar Bahrani*:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- **Rasul Ghorbani:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- **Jamshid Fooladi:** Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
- **Saeed Nojavan:** Department of chemistry, Faculty of Chemistry, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Keyword: Amino acids, Caspian Sea, Common Carp, HPLC, Thin layer chromatography

Abstract

The present study aimed to isolate and detect essential amino acids (EAAs) in muscle tissue of common carp (*Cyprinus carpio*). Fish contains the highest protein content. Three pieces of common carp were collected from gillnets found on beaches of the southern Caspian Sea. Biometrics of collected samples were determined. Target tissue (muscle) of the fish was isolated and kept in nitrogen tanks at -196°C. Dissolution/deposition techniques were used to extract protein from the fish flesh at the isoelectric point, proteins were hydrolyzed into amino acids, and thin layer chromatography (TLC) was used to isolate essential amino acids in the laboratory. Commercial TLC silica gel 60 F_{254} plates (made by Merck, Germany) were used as the stationary phase and butane/acetic acid/water as the mobile phase. Ninhydrin reagent was used to detect amino acids. Quantitative amino acid analysis was carried out and the retention factor (Rf) was calculated. TLC results showed that all EEAs (Arginine, Histidine, Phenylalanine, Isoleucine, Threonine, Valine, Leucine, Methionine and Lysine) were present in muscle tissue of common carp. Tryptophan was totally destroyed with acid hydrolysis and not detected in the analysis. Analysis of 17 essential and nonessential amino acids showed that the highest EAA content of fish flesh belonged to Lysine, Glutamic acid and the lowest content belong to Aspartic acid and Methionine. Since human body cannot synthesize EAAs, common carp should be included in human diet because it is a general source of nutritional components that contribute to growth, energy production, muscle building and treatment of many diseases.

* Corresponding Author's email: anvarbahrani@gmail.com