

## 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 شهیدبهبشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۸

### چکیده

مطالعه حاضر به منظور جداسازی و تشخیص اسیدهای آمینه ضروری موجود در بافت عضله ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) صورت گرفت. بدین منظور در سال ۱۳۹۷ تعداد سه قطعه ماهی کپور معمولی از پره‌های مستقر در سواحل جنوبی دریای خزر نمونه برداری 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) به عنوان فاز ساکن و از فاز متحرک (بوتانل/اسید استیک/آب) به نسبت‌های (۱:۲:۴) 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 به روش 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 به دلیل هیدرولیز اسیدی تخریب و مشاهده نگردید. ارزیابی ترکیب ۱۷ اسیدآمینه ضروری و غیر ضروری به وسیله کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) اختلاف معنی‌داری را بین اسیدهای آمینه نشان داد به طوری که بیش‌ترین میزان اسیدآمینه در گوشت ماهی کپور به لیزین و گلوتامیک اسید و کم‌ترین میزان به آسپارتیک اسید و متیونین اختصاص دارد. بنابراین با توجه به عدم توانایی بدن انسان در ساخت اسیدهای آمینه ضروری، مصرف کپور ماهیان در جیره غذایی می‌تواند به عنوان تامین‌کننده نیازهای تغذیه‌ای انسان در رشد، تولید انرژی، عضله‌سازی و درمان بسیاری از بیماری‌ها به شمار آید.

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



## 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، دگرذیسی 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 فیفاها با اکتشافی‌های متعدد به چالش می‌کشد که تاکنون، گلوتامین، گلیسین، پرولین و هیدروکسی پرولین باعث رشد، توسعه و سلامت حیوانات آبی 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 آبی‌پروری 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). کپور معمولی (*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). کپور معمولی متعلق به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) است که این خانواده بزرگ‌ترین خانواده در بین ماهیان است. ماهی کپور معمولی 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 متأسفانه میزان صید آن در سال‌های اخیر به‌شدت کاهش یافته است (قربانی و همکاران،

۱۳۸۹). تعیین ارزش غذایی ماهی کپور معمولی 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 در سه قطعه کپور معمولی صید شده از استان گیلان با عامل مشتق ساز O-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 ۱۷ اسیدآمینه در فیله کپور معمولی 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 به اسیدآمینه پرولین اختصاص یافت (خانی و همکاران، ۱۳۹۱). مقایسه پروفیل اسیدهای آمینه فیله ماهی کپور معمولی و گورابی عظیم الجثه به‌منظور تجزیه و تحلیل فاز پرورشی ماهی گورابی عظیم الجثه (*Osporonemus goramy*) به‌مدت یک‌سال و با جیره تجاری ماهی کپور پرورش یافتند. نتایج HPLC نشان داد اسیدهای آمینه ضروری آرژنین، هیستیدین، لیزین، ترئونین و تربیتوفان و اسیدهای آمینه غیرضروری آلانین و سرین در ماهی گورابی 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 کپور معمولی (در کشور هند) به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که غنی از اسیدهای آمینه اسیدگلوتامیک و گلیسین می‌باشد (Mohanty و همکاران، ۲۰۱۴). مطالعه تطبیقی در خصوص تجزیه و تحلیل میزان سمیت آمین‌های بیوزن (هیستامین، کدوسین و پوترسین) ماهی و محصولات دریایی در کشور هند به‌وسیله روش HPLC نشان داد تعیین خطی بودن (۵-۱۰ نانوگرم) 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 و همکاران، ۲۰۱۴). هدف از این مطالعه تطبیقی اندازه‌گیری کمی و کیفی اسیدهای آمینه موجود در کپور دریایی باروش 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 بر روی 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.



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 به مدت 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 می‌شوند. نمونه با دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. سه لایه (چربی، پروتئین‌های محلول، قسمت‌های 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 به‌وسیله هیدروکلریک اسید به ۵/۵ رسانده شد. نمونه مجدداً با دور ۱۰۰۰۰ g 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 روش هیدرولیز اسیدی، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از پروتئین‌های استخراج شده در ۱۰ میلی‌لیتر از هیدروکلریک اسید ۶ نرمال حل شد و نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد در حالت رفلکس قرار داده 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).

**تهیه محلول‌های استاندارد اسیدهای آمینه:** مقدار ۱ میلی‌گرم از اسیدهای آمینه ضروری استاندارد با ۱ میلی‌لیتر آب یونیزه حل شد و در میکروتیوپ قرار گرفت، سپس با دستگاه ورتکس میکسر به مدت 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 به صورت دستی با روشی ارزان و آسان انجام شود. TLC هم‌چنین در جداسازی انانتیومرهای ترکیبات مختلف نیز موفق بوده است (Bushan و 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 ۲۰×۲۰ سانتی‌متر تهیه شده از شرکت مرک در سه تکرار انجام گرفت. در مرحله لکه‌گذاری صفحه سلیکاژل را از یک جهت و به فاصله ۲ سانتی‌متر از پایین، به‌طور افقی با مداد خط‌کشی کرده و فواصلی به طول ۱/۵ سانتی‌متر با مداد روی خط‌کشی تعیین

(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 به روش کروماتوگرافی لایه نازک در ایران مشاهده نگردید. قبل از فرایند اندازه‌گیری اسیدهای آمینه، مراحل استخراج پروتئین عضله به روش 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، اسپارژین، اسپاراتات، گلوتامات، گلايسین، سرین، تیروزین) و اسیدهای آمینه نیمه‌ضروری (سیستئین، گلوتامین، هیدروکسی پرولین، ثورین) تقسیم می‌شوند (Peng و همکاران، ۲۰۰۸).

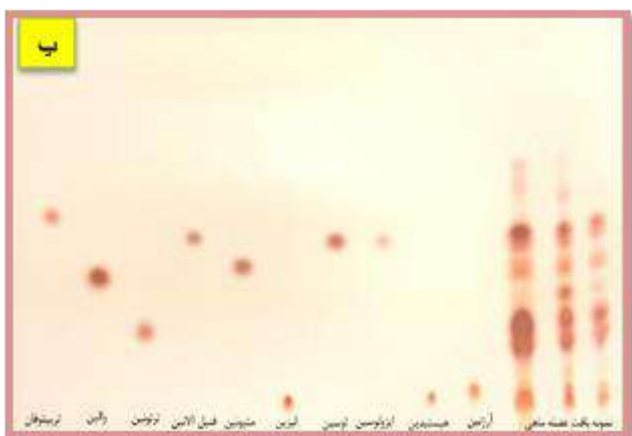
## مواد و روش‌ها

**نمونه برداری:** در این مطالعه تعداد ۳ نمونه ماهی کپور معمولی 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 به ترتیب 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 صید جداسازی و در لوله فالكون قرار داده شد، لوله‌های فالكون حاوی بافت عضله در مخزن ازت با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری و تا آماده‌سازی نمونه‌ها به فریزر ۳۰- 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 به روش کیفی انجام می‌پذیرد و هدف تشخیص اسیدهای آمینه ضروری در ماهی کپور بوده است).

**مراحل استخراج پروتئین:** استخراج پروتئین به روش حل کردن/ رسوب دادن در نقطه ایزوالکتریک (Chen و همکاران، ۲۰۰۹).



کروماتوگرافی با فاز معکوس با حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر استفاده گردید. نتایج با استفاده از نرم افزار اتوکروم ۳۰۰۰ به دست آمد. اسید آمینه تریپتوفان به دلیل هیدرولیز اسیدی قابل اندازه گیری نمی باشد.



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

گردید. نمونه های آماده سازی شده بافت ماهی را از ابتدای خط و سپس اسیدهای آمینه استاندارد را لکه گذاری نموده و با هود خشک شد (این کار برای تشخیص تعداد لکه ها با استانداردها صورت می پذیرد). بهتر است لکه گذاری اسیدهای آمینه استاندارد برای بار دوم، تکرار و خشک شوند. در این مرحله آماده سازی مخزن کروماتوگرافی انجام می شود. در مورد کروماتوگرافی لایه نازک که به صورت بالا رونده است، حلال در ته مخزن قرار داده شد (عوض پور و همکاران، ۱۳۹۲). لازم به ذکر است در این آزمایش جهت تشخیص اسیدهای آمینه از فازهای متحرک متعددی مانند (اتانول / آب ۷:۳)، (n پروپانول / آب ۷:۳)، (بافر آب، اسیتونیتریل ۷:۳)، (n بوتانول / استیک اسید / آب ۴:۲:۱)، (فنول / آب ۲:۱) استفاده شد و فاز متحرک بهینه سازی گردید. برای این منظور ابتدا مخزن را شستشو داده و سپس حلال های n بوتانول / آب HPLC و اسیداستیک با نسبت های (۴:۱:۲) مخلوط گردید و به ته مخزن به آرامی اضافه گردید، مدت زمانی حدود ۱۵ دقیقه جهت اشباع مخزن مورد نیاز است. پس از آن صفحه سلیکاژل لکه گذاری شده در درون مخزن قرار داده شد. هنگامی که ارتفاع حلال تا حدود ۲ سانتی متری 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 اندازه گیری RF از معرف نین هیدرین برای آشکارسازی نمونه به صورت اسپری استفاده شد. سپس صفحه سلیکاژل در آون با دمای پایین خشک گردید. در این مرحله لکه ها نمایان شده و حرکت لکه های استاندارد اسیدهای آمینه به فاصله طی شده توسط حلال سنجیده شد.

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

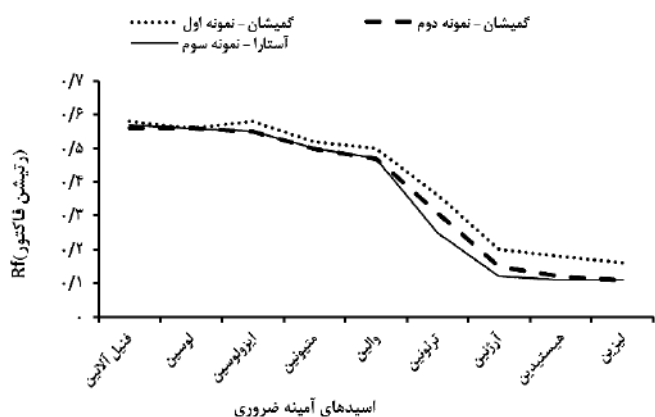
آزمایش مذکور با سه تکرار انجام شد و اسیدهای آمینه استاندارد در نمونه ماهی کپور جداسازی گردید (شکل ۱). مراحل فوق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا انجام شد. اسید آمینه تریپتوفان به دلیل تخریب در هیدرولیز اسیدی مشاهده نگردید. جهت حفظ تریپتوفان که یک اسید آمینه با ارزش تر است بهتر است از هیدرولیز بازی استفاده گردد.

**کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC):** روش های زیادی برای جداسازی و شناسایی اسیدهای آمینه پیشنهاد شده است. بهتر است برای جداسازی اسیدهای آمینه از روش های دقیق تر آنالیزی مانند HPLC استفاده شود. در مطالعه حاضر نیز جهت تعیین غلظت اسیدهای آمینه یک نمونه از بافت عضله به صورت تصادفی انتخاب و پس از مشتق سازی با عامل مشتق ساز OPA به دستگاه HPLC ساخت کمپانی Agilent تزریق شد. در این روش از ستون C18 و از روش

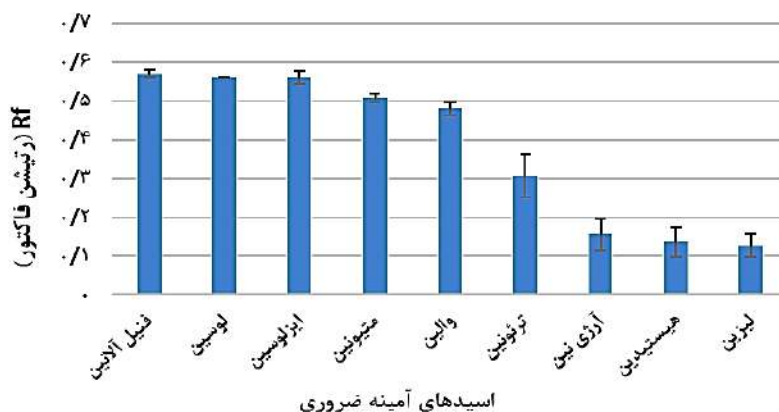
## نتیجه

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 به ترتیب به لیزین و گلوتامیک اسید اختصاص دارد (شکل‌های ۴ و ۵) و همچنین میانگین و انحراف معیار داده‌ها به ترتیب ۵۹۹ و ۳۵۹ به دست آمد.

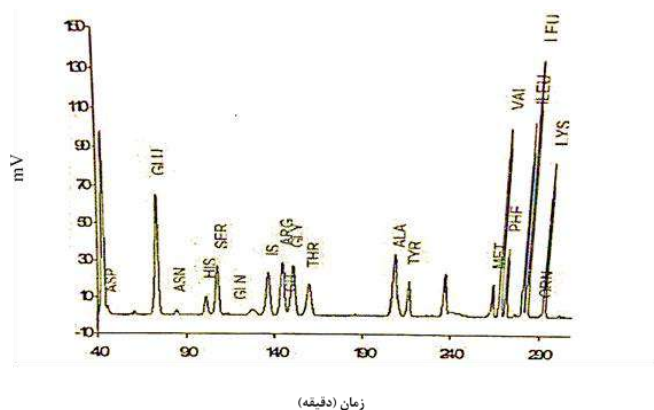
در این مطالعه پس از ارزیابی کیفی به روش TLC و تشخیص اسیدهای آمینه ضروری، نمودار میانگین Rf اسیدهای آمینه ضروری رسم شد (شکل‌های ۲ و ۳). بیشترین مقدار Rf به اسیدآمینه فنیل آلانین و کمترین مقدار به اسیدآمینه لیزین اختصاص دارد. انحراف معیار اسیدهای آمینه ضروری بسیار ناچیز بوده و این نشان می‌دهد پراکندگی داده‌ها به میانگین Rf نزدیک است. Rf اسیدآمینه تریپتوفان به دلیل این که خارج از محدوده باندهای تشکیل شده نمونه ماهی آشکارسازی شد، محاسبه نگردید و به طور کیفی می‌توان نتیجه گرفت



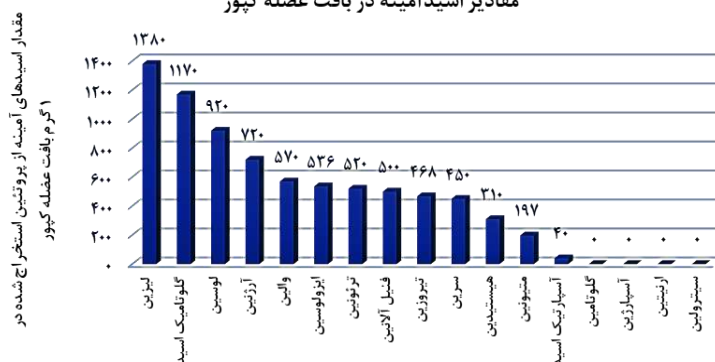
شکل ۳: محاسبه میانگین و انحراف معیار رتیشن فاکتور (Rf) از اسیدهای آمینه ضروری سه نمونه کپور ماهی



شکل ۲: محاسبه میانگین و انحراف معیار رتیشن فاکتور (Rf) از اسیدهای آمینه ضروری



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



شکل ۴: اندازه‌گیری مقادیر اسیدهای آمینه در بافت عضله کپور (HPLC)



**بحث**

مصرف آبزیان به عنوان 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 می کنند از جمله سنتز پروتئین که توسط mRNA انجام می پذیرد. کمبود اسیدهای آمینه منجر به عدم سنتز پروتئین و در نتیجه بیماری کمبود پروتئین در انسان می شود. بنابراین گنجاندن اسیدهای آمینه ضروری در رژیم غذایی مصرفی حیاتی است (Akram و همکاران، ۲۰۱۱).

با وجود مزیت های فراوان، سهم مصرف آبزیان و فراورده های شیلاتی در سبد غذایی خانوار ایرانی در مقایسه با سایر گوشت های مصرفی پایین است (دادگر و همکاران، ۱۳۹۳). اسیدهای آمینه می توانند به عنوان یک اثر انگشت پایدار طبیعی ترکیب بیوشیمیایی سلول ها و اطلاعات حیاتی آنان را شرح دهند. مطالعه کمی و همکاران (۱۳۹۰) بر روی سطوح اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری سه گونه ماهی سفید دریای خزر، ماهی قزل آلا، رنگین کمان و ماهی کپور معمولی نشان داد که تفاوت های اندکی در نسبت ها وجود دارد و مصرف ماهیان گران قیمت تری چون ماهی سفید دریای خزر از ارزش غذایی بالاتری نسبت به دو گونه قزل آلا و کپور معمولی ندارد. پروتئین های ماهی از با ارزش ترین پروتئین های حیوانی هستند، زیرا در مقایسه با پروتئین های گیاهی که به طور معمول از نظر یک یا چند اسید آمینه فقیر هستند، حاوی تمامی اسیدهای آمینه ضروری (ایزولوسین، لوسین، تریپتوفان، ترئونین، والین، فنیل آلانین، هیستیدین، متیونین و لیزین) به مقدار و نسبت مناسب می باشند، اگر چه ماهیان آب شیرین در مقایسه با ماهیان آب شور (دریایی) مقادیر کمتری پروتئین دارند، اما اختلاف معنی داری در ترکیب اسید آمینه آنها وجود ندارد (گورابی و حسینی، ۱۳۹۷). TLC می تواند یک روش تحلیلی اولیه قبل از تزریق نمونه به HPLC باشد. بسیاری از روش های مطلوب در شیمی صنعتی، صنعت غذا و دارو، خالص سازی رنگ ها، سم شناسی محیط زیست، آب و ... به عنوان یک مرجع از TLC استفاده می کنند. 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 غیر ضروری به ترتیب به لیزین و گلوتامیک اسید اختصاص دارد. این ماهی دارای ارزش غذایی بالایی است و به عنوان یک منبع ارزشمند پروتئینی نقش تعیین کننده ای در سلامت انسان دارد. ترکیب اسیدهای آمینه در گونه های دریایی و پرورشی این ماهی با توجه به بستر تغذیه ای می تواند متفاوت باشد. بررسی سطوح

اسیدهای آمینه در سه قطعه کپور معمولی صید شده از استان گیلان به روش OPA با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) نشان داد، بیشترین مقدار به اسید آمینه های ضروری (لوسین) و غیر ضروری (گلوتامیک اسید) اختصاص یافته است (کمی 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 مصرف کننده ماهی در جهان است، رسید. مصرف سرانه ماهی در پرتغال نیز به ۵۳ کیلوگرم رسید، که دومین رتبه مصرف کننده در کشورهای اتحادیه اروپا و تقریباً رتبه سوم در جهان پس از ژاپن محسوب می شود (Fernandes Coutinho, ۲۰۱۷).

بهینه سازی عرضه اسید آمینه با توجه به الزمات استفاده از پروتئین برای رشد بدن تحت تاثیر محدودیت های محیط زیستی از لحاظ مواد مغذی یک ضرورت عمومی در سیستم های جانوری است. باید توانست با رشد سالیانه آبی پروری 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 علی رغم سنتز پایین پروتئین عضله، بهره وری 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 تایید کننده منابع ارزشمند پروتئینی است که می توان با مدیریت بهینه صید و ارزیابی ذخایر روش های استخراج پروتئین از منابع دریایی را افزایش داد تا علاوه بر تضمین سلامت افراد جامعه در کاهش هزینه های صنعتی تولید اسید آمینه 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 می دارد و از کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا خانم سمانه سلیمان کمال تشکر را دارد.



## منابع

۱. آوجا، 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 کپور معمولی 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 کپور معمولی پرورشی (*Cyprinus carpio*) و گورامی عظیم‌الجثه (*Osphronemus goramy*) پرورش یافته در استخرهای بتونی. نشریه علوم آبی‌پروری. دوره ۶، شماره ۸، صفحات ۳۳ تا ۴۱.
۵. خنیفر، ژ.؛ احمدی، ع.؛ قورچیان، 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.؛ کوچپین، 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 کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مناطق قره‌سو و انزلی با استفاده از هشت نشانگر ریزماهواره. مجله تاکسونومی و بیوسیتماتیک. دوره ۲، شماره ۵، صفحات ۴۱ تا ۴۸.
۱۰. قربانی، ر.؛ یلغی، 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*)، کپور معمولی (*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. اهمیت 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 کپور معمولی (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1758) در دوره استراحت جنسی (پاییز) و رسیدگی جنسی (بهار) در دو منطقه بندرانزلی و بهشهر. نشریه توسعه آبی‌پروری. 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.



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.



## 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  $-196^{\circ}\text{C}$ . 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<sub>254</sub> 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 EAAs (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