شروط استخلاص الكولاجين من جلود كل من الأبقار والأغنام والدجاج و المقارنة بينها

منار أبو حسن[1] و أحمد مالو[2]

تاريخ الإيداع 2013/10/27
قبل للنشر في 2014/02/03

الملخص

في البحث المقدم، حُدّدت الشروط الأكثر ملاءمة لاستخلاص الكولاجين بالطريقة الحمضية من مخلفات جلود كل من الأغنام والأبقار والدجاج، وقد بيّنت التجارب باستخدام الحموض العضوية المختلفة أن حمض الخل بتركيز 0.5 M وبحجم 6 مل من الحمض لكل 1غ من الجلد، هو الأفضل لاستخلاص الكولاجين من هذه الجلود خلال 48 ساعة.

وقد استخدم محلول NaOH لنزع البروتينات اللاكولاجينية من المادة الخام بحجم30 مل من المذيب القلوي لكل10غ من الجلد مدة 24 ساعة مع تكرار العملية 5 مرات بتركيز 0.1M في كل مرة.

كما تم التخلص من دهون المادة الخام بواسطة نظامي البوتانول اللامائي بحجم 30 مل من المذيب العضوي لكل 10غ من الجلد على ثلاث دفعات خلال 24 ساعة.

بتطبيق طريقة الديلزة لتنقية الكولاجين، كانت نسبة الكولاجين النقي الناتج تساوي 2% و6% و10.5% في بقايا جلود كل من الأبقار والأغنام والدجاج الخام منزوعة الشعر على الترتيب.

الكلمات المفتاحية: الكولاجين، مخلفات جلود، البروتينات اللاكولاجينية.

[1] طالبة ماجستير، [2] أستاذ، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

The conditions of extracting collagen from skins of sheep, cows, and chickens and compare them

M. Abo Hassan[(1)] and A. Malo[(2)]

Received 27/10/2013
Accepted 03/02/2014

ABSTRACT

The aim of this research is the determination of the appropriate conditions for extracting collagen by acidic method from remnants of skins of sheep, cows, and chickens. The results showed that acetic acid is the best among the various organic acids, for extracting collagen of these skins during 48 hours, at concentration of 0.5 M and the ratio, acidic: skin (6:1).

NaOH solution has been used for 24 hours, at concentration of 0.1 M and the ratio, alkaline: skin (3:1), for extracting Collagen proteins from raw material, by repeating the process 5 times.

To get rid of the raw material fat, anhydrous n-butanol (3:1) has been used on three batches, during 24 hours.

The dialysis method has been used for collagen purification, where the percentage of pure collagen reached 10.5%, 6%, and 2% in remnants of skins of chickens, sheep, and cows, respectively.

Kay words: Collagen, Remnants of skins, Noncollagen proteins.

[(1)] Master Student, [(2)] Professor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

المقدمة

الكولاجين هو البروتين الليفي الرئيس في تركيب النسيج الضام عند الإنسان والحيوان [1] ويشكل نحو 70% من كتلة هذا النسيج. ويشكل هذا البروتين ما يقارب 30% من كامل البروتينات الكلية للكائن الحي، أمَّا كولاجين الجلد فيشكّل ما يقارب 80-90% من كولاجين كامل الجسم، وغالباً ما يؤدي انخفاض الكولاجين في الجسم إلى تدهور الأنسجة الرابطة [1,2,3].

وفق ما تذكره معظم المراجع هناك أكثر من 20 نوعاً مختلفاً من الكولاجين تعمل جميعها على ربط الأنسجة بالهيكل العظمي وتأمين المرونة والقوة اللازمة لبنية الكائن الحي [4,5].

من الناحية الكيميائية الكولاجين عبارة عن مركب بروتيني يتكون من سلاسل ببتيدية تلتف كل ثلاث سلاسل لتشكل حلزوناً ثلاثي البنية [2]. يحتوي الكولاجين في بنيته على بعض الحموض الأمينية النوعية كهيدروكسي البرولين وهيدروكسي الليزين [1] اللذين يميزانه عن غيره من البروتينات الأخرى ويسهمان مع الروابط الهيدروجينية الموجودة بين بقايا الحموض الأمينية في ثبات الحلزون الثلاثي [5,6]، في حين ينعدم في بنيته كل من التربتوفان والسيستئين، ولكنه يحتوي على كميات كبيرة من الغليسين والبرولين [4] إذْ يشكل الغلسين ثلث السلسلة الببتيدية [1,5].

الميزة النادرة والأكثر أهمية في الكولاجين هي الترتيب المنتظم للأحماض الأمينية، إذْ يكون شكل كل سلسلة من النمط Gly-X-Y حيث إنّ Gly غليسين وX برولين وY إما برولين أوهيدروكسي برولين [2,4,5].

الكولاجين مركب حيوي شديد الأهمية يدخل في العديد من الصناعات كالصناعات الغذائية [1,3] إذْ يخضع لعمليات حلمهة غير عكسية حمضية أو قلوية [5] لينتج أحد أهم أشكال الكولاجين المستخدمة في الغذاء وهو الجيلاتين [5,7,8].

كما أن للكولاجين تطبيقات واسعة في المجالات الطبية [2]، الصيدلانية[1,3] والتجميلية ويدخل في الكريمات المستخدمة في ترميم الجلد والجروح [5,7,8].

هناك مصدران رئيسان لاستخلاص الكولاجين هما جلود الخنازير وجلود الأبقار [3,4]. كما تشكل جلود الحيوانات البحرية مصدراً آخرَ لهذا المركب [3,9]. و يمتلك كولاجين الأسماك محتوى أحماض أمينية أقل من كولاجين الثدييات [5,7].

يشكل الكولاجين المنتج من جلود الخنازير ما يقارب 46% من الكولاجين العالمي الكلي يليه المشتق من جلود الأبقار 29.4 %، ومن عظام الأبقار23.1 %، أما بقية المصادر فلا يزيد إنتاجها على 1.5% [5,7].

دُرستْ في هذا البحث إمكانية استخلاص كولاجين نقي من مصادر حيوانية محلية، كبقايا جلود كل من الأغنام الأبقار والدجاج وشروط تنقيته؛ وذلك بدراسة بعض الشروط التي تسهم في الوصول إلى استخلاص أمثل لهذا البروتين المهم، وكذلك هدف هذا البحث إلى مقارنة نسبة الكولاجين الناتج من جلود الأبقار بنسبة الكولاجين الناتج من كل من جلد الأغنام والدجاج كون أن الدراسات على هذه الأنواع قليلة لأنَّ جلد الدجاج لا يستخدم للدوافع الاقتصادية؛ وذلك بسبب أنه يستخدم كمادة غذائية وليس كمنتج ثانوي.

المواد والأجهزة المستخدمة في البحث

استخدم في البحث:

ــ جلود كل من الأغنام والأبقار والدجاج كمادة أولية تم الحصول عليها من المسالخ المحلية.

ــ جهاز الطيف الضوئي (OPTIZEN-3220UV).

ــ مبخر دوار (IK-RV10 digital).

ــ مقياس درجة الحموضة (Mi-180 Bench Meter).

ــ ميزان حساس (Stantorius).

ــ هزازة كهربائية shaker.

مواد البحث وطرائقه

تعتمد عملية استخلاص الكولاجين من مصادره على ثلاث طرائق: الطريقة الحمضية، والطريقة القلوية، والطريقة الأنزيمية [1,10]، وفي هذا العمل اعتمدت الطريقة الحمضية.

تحضير العينات للدراسة، وتشمل مجموعة من العمليات المتتابعة:

ــ إزالة الوبر الصوفي من الجلد:

لمعالجة فروة الجلد يُدهنُ السطح الحاوي على الصوف بمزيج مكون من محلول كبريت الصوديوم وهيدروكسيد الصوديوم لنزع الصوف من الفروة.

ــ نزع البروتينات اللاكولاجينية من الجلد:

وللتخلص من البروتينات اللاكولاجينية يُنقع الجلد بعد تقطيعه إلى قطع صغيرة بمساحة (1×1)cm في محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1M مدداً زمنية مختلفة عند درجات حرارة ثابتة 5°C؛ وذلك بحسب شروط التجربة.

ــ نزع الدهون من الجلد:

أمَّا نزع الدهون فيكون بمعالجة الجلد بواسطة المذيبات العضوية المختلفة وبنسب متباينة بهدف إذابة الدهون المرتبطة بالفروة المعالجة؛ وذلك خلال مدد زمنية مختلفة، وعلى عدة دفعات من المذيب بحسب شروط التجربة.

ــ فصل البروتين الكولاجيني عن الجلد:

ولدراسة الشروط الفُضلى لاستخلاص الكولاجين من فروة الحيوان بعد نزع البروتينات اللاكولاجينية والدهون منها، تُستخدم محاليل الحموض العضوية المختلفة وبحجوم متعددة مدداً زمنية مختلفة أيضاً بحسب شروط التجربة. وبعد الاستخلاص يُرسَّب البروتين المستخلص بواسطة كلوريد الصوديوم حتى تركيز نهائي 0.9 M مدة 24 ساعة ومن ثم يُرشّحُ.

ــ تنقية الناتج الكولاجيني:

يُنقَّى الكولاجين الناتج بعد الاستخلاص بإخضاعه لعملية الديلزة عند درجات حرارة منخفضة، ويستخدم لهذا الغرض حافظات من ورق السولفان، يوضع الكولاجين داخلها بعد إذابته بأقل كمية ممكنة من حمض الخل 0.5 M [6]، ويغمر ورق السولفان مع محتواه من الكولاجين بالماء المقطر مع العمل على تجديد الماء المقطر بين حين وآخر، وتستغرق هذه المرحلة 72 ساعة. تهاجر الجزيئات الصغيرة الحجم نتيجة الديلزة ومن بينها الشوارد الملحية مخترقة غشاء السولفان باتجاه الوسط المائي المقطر، ممَّا يؤدي إلى ترسب البروتينات المنحلة ضمن الحافظة [11].

النتائج والمناقشة

تأثير حجم المذيب القلوي وزمن النقع به في استخلاص البروتينات اللاكولاجينية

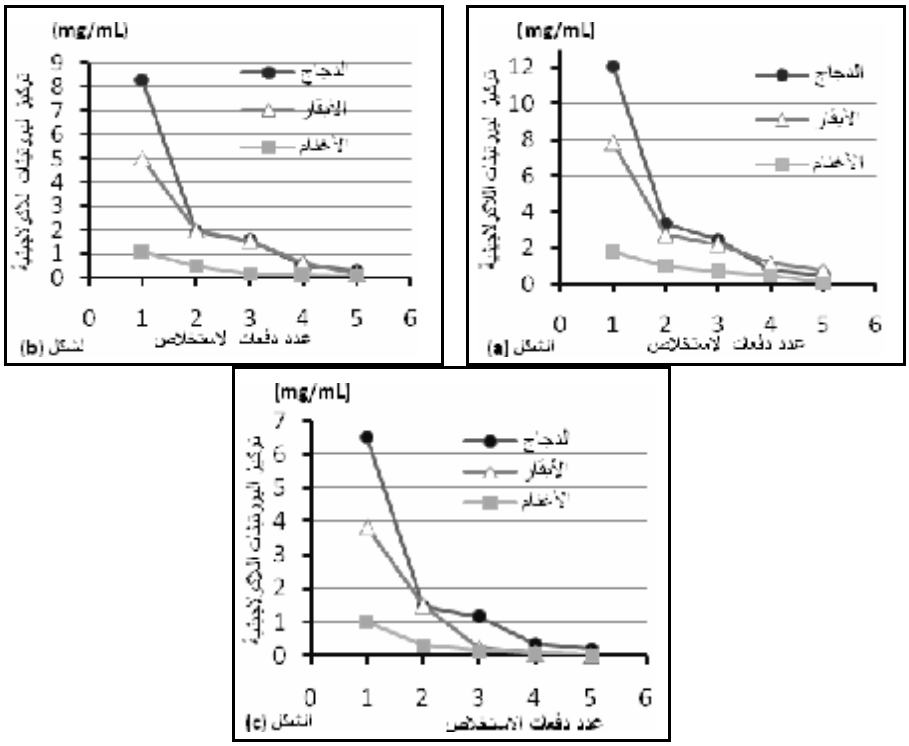
دُرسَ تأثير اختلاف حجم NaOH المضاف إلى الجلد إذْ أُخذت ثلاث عينات لكل نوع من أنواع الجلود المدروسة، كل عينة تزن 10غ أضيف 30 مل و35 مل و40 مل من NaOH بتركيز 0.1M [1,3,6,12] العينة الأولى، والثانية، والثالثة على الترتيب. واستمر نقع الجلد بالمذيب القلوي مدة 24 ساعة مع التحريك، وتعاد عملية النقع هذه 5 مرات، وتطبق شروط المعالجة نفسها في كل مرة، ويُعيَّن تركيز البروتينات اللاكولاجينية المنتزعة من الجلد في كل عملية نقع باستخدام كاشف البيوريت عند طول موجة 540 nm [13].

ولابدَّ من الإشارة هنا إلى أن التراكيز العالية للقلوي NaOH تحدث خللاً في بنية السلسلة الببتيدية للكولاجين. أمَّا المحاليل الشديدة التمديد منه فهي غير قادرة على نزع البروتينات اللاكولاجينية بكفاءة عالية [14].

ويبيّن المخطط (1) التغيرات في تركيز البروتينات اللاكولاجينية المستخلصة بحسب عدد دفعات المذيب القلوي NaOH.

تبيّن الأشكال في المخطط (1) أن تركيز البروتينات اللاكولاجينية المنتزعة بواسطة القلوي يتناقص باستمرار بعد كل عملية استخلاص، وأن تركيز البروتينات اللاكولاجينية في الأبقار أعلى من تركيز البروتينات اللاكولاجينية في جلد الأغنام وأقل ممَّا هي عليه

في الدجاج. كما يلاحظ أن الحجوم المضافة من القلوي NaOH جميعها وعلى اختلافها تسهم في انتزاع كامل للبروتينات اللاكولاجينية بدليل أن تركيز هذه البروتينات خلال المراحل الأخيرة من الاستخلاص قارب الصفر. وقد اكتفيَ بخمس دفعات فقط من القلوي كونها كافية لاستخلاص كامل البروتينات اللاكولاجينية.



المخطط (1) تناقص تركيز البروتينات اللاكولاجينية حسب عدد دفعات الاستخلاص بالقلوي

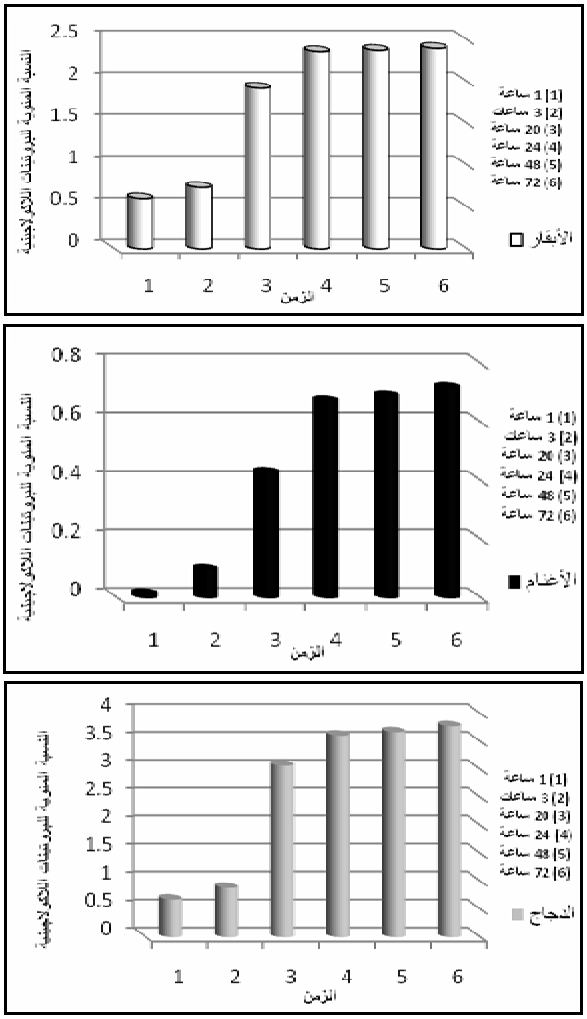
الشكل (a) يمثل إضافة 30 مل من NaOH (0.1 M) إلى 10غ من الجلد، الشكل (b) يمثل إضافة 35مل من NaOH (0.1 M) إلى 10غ من الجلد، الشكل (c) يمثل إضافة 40 مل من NaOH (0.1 M) إلى 10غ من الجلد.

وعليه اعتُمد على أقل حجم مدروس من القلوي كحجم مثالي للاستخلاص أي كل 10غ من الجلد يحتاج إلى 30 مل من NaOH بتركيز 0.1M لانتزاع البروتينات اللاكولاجينية، وقد بلغت كمية البروتينات المنتزعة عند هذا الحجم من القلوي 4.34% و1.19% و5.72% من جلد كل من الأبقار والأغنام والدجاج على الترتيب.

وقد أجريت دراسة مقارنة للدراسة السابقة باستخلاص وحيد للبروتينات اللاكولاجينية ومن خلال هذه التجربة حُدّد أيضاً الزمن اللازم لنقع الجلد في المذيب القلوي NaOH، إذْ

أُضيفَ 30 مل من القلوي مرة واحدة فقط الى عينات من الجلود المختلفة كل منها تــزن 10غ مع التحريك. ثم أجري تتبع لتغير تركيز البروتينات اللاكولاجينية بازديــاد الــزمن باستخدام كاشف البيوريت عند طول موجة 540 nm [13].

يبيّن المخطط (2) تغيرات كمية البروتينات اللاكولاجينية المنتزعة من جلد كــل مــن الأبقار والأغنام والدجاج بازدياد زمن النقع بالقلوي.



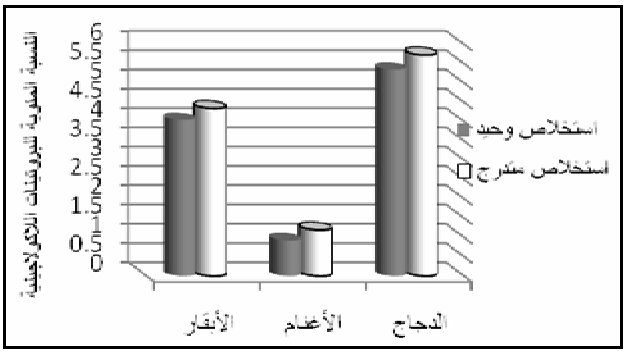
المخطط (2) تزايد كمية البروتينات اللاكولاجينية المستخلصة بازدياد زمن النقع بالقلوي.

نجد من الأشكال في المخطط (2) أنَّ هناك تزايداً كبيراً في كمية البروتينات اللاكولاجينية المنتزعة خلال الساعات الأولى من عملية الاستخلاص وصولاً إلى زمن 24 ساعة ليتناقص هذا التزايد بشدة بعد 24 ساعة، من النقع بالقلوي، وقد بلغت نسبة البروتينات المنتزعة من جلد الأبقار 2.361% و2.376% و2.4%، ومن جلد الأغنام 0.676% و0.692% و0.72%، ومن جلد الدجاج 3.607% و3.669% و3.776% خلال الزمن 24، 48، 72 ساعة على الترتيب، وعلى أساس وزن الجلد الجاف منزوع الشعر.

اعتُمدَ عند دراسة الزمن اللازم للنقع بالقلوي على إضافة واحدة فقط من القلوي وذلك بسببَ أن الدفعة الأولى المضافة من المذيب القلوي هي المسهمة في نزع الجزء الأكبر من البروتينات اللاكولاجينية، كما هو واضح من المخطط (1).

يلاحظ مما سبق أنه لا يوجد فرق جوهري كبير في النسبة المستخلصة من البروتينات اللاكولاجينية بعد زمن 24 ساعة، وعليه اعتمدَ زمن النقع 24 ساعة هو الزمن المثالي لانتزاع البروتينات اللاكولاجينية من الجلد، وهذا يتفق مع العديد من الدراسات [9,12].

نجد أيضاً من هذه الدراسة أن استخلاص البروتينات اللاكولاجينية مرة واحدة فقط يسهم في انتزاع كمية أقل من هذه البروتينات مقارنةً بالاستخلاص المتدرج؛ وذلك عند استخدام الشروط نفسها من زمن النقع، وحجم القلوي، وتركيز القلوي، وكمية الجلد المدروس. ويوضّح المخطط (3) هذه المقارنة.



المخطط (3) مقارنة بين الاستخلاص المتكرر والاستخلاص الوحيد للبروتينات اللاكولاجينية.

نجد من المخطط (3) أن الاستخلاص المتدرج للبروتينات اللاكولاجينية يسهم في انتزاع كمية أكبر من البروتينات اللاكولاجينية مقارنةً بالاستخلاص الوحيد، إذْ أسهم الاستخلاص المتدرج وكما ذُكر أعلاه في انتزاع 4.34% و1.19% و5.72% من البروتينات اللاكولاجينية، في حين أسهم الاستخلاص الوحيد في انتزاع 2.361%

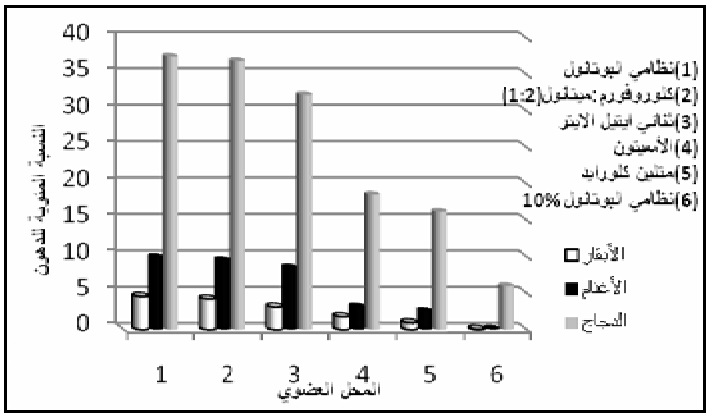
و0.676% و3.607% من هذه البروتينات من جلد كل من الأبقار والأغنام والدجاج على الترتيب.

مما سبق يتبيّن أنه يمكن تحسين إزالة البروتينات اللاكولاجينية بتقليل حجم المذيب القلوي مع زيادة عدد مرات الاستخلاص، لذا اعتُمدَ على الاستخلاص المتدرج للبروتينات اللاكولاجينية من الجلد في التجارب اللاحقة جميعها.

تحديد المذيب الأفضل لنزع الدهون

استخدم العديد من المذيبات العضوية المختلفة والمتوافرة لتعيين أفضلها من أجل نزع الدهون، إذ أضيف 30 مل من كل مذيب من المذيبات المدروسة إلى 10غ من الجلد. ووضعت العينات في حاضنة هزازة مدة 24 ساعة عند درجة حرارة 5°C وسرعة الرج 150 rpm؛ وذلك بحسب شروط التجربة.

حُسبت كمية الدهون المستخلصة بعد الترشيح والتبخير بالطريقة الوزنية، ويوضّح المخطط (4) العلاقة بين نوع المذيب العضوي وكمية الدهون المستخلصة من الجلد.



المخطط (4) العلاقة بين نوع المذيب العضوي وكمية الدهون المستخلصة من الجلد

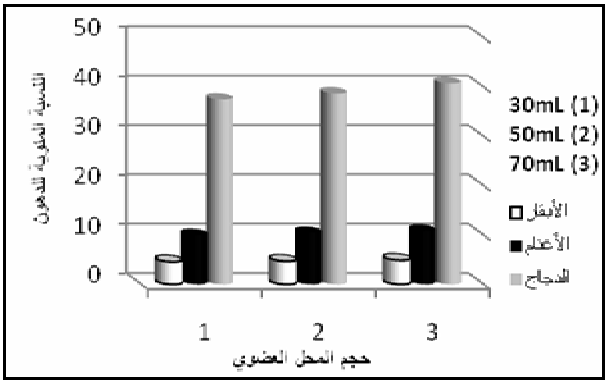
يلاحظ من المخطط (4) أن نسبة الدهون في جلد الدجاج أعلى مما هي عليه في جلد الأغنام، ونسبة الدهون في جلد الأغنام أعلى من نسبته في جلد الأبقار، وقد استطاع نظاما البوتانول انتزاع أكبر كمية ممكنة من الدهون مقارنةً بالمذيبات العضوية الأخرى المدروسة، وقد بلغت نسبة الدهون المنتزعة بواسطة هذا المذيب 4.56% و10% و37.5% من جلد كل من الأبقار والأغنام والدجاج على الترتيب محسوبةً على أساس وزن الجلد الجاف منزوع الشعر.

يلاحظ أن نسبة الدهون المنتزعة من أنواع الجلود جميعها تختلف من محل عضوي إلى آخر، كما أن هناك محلات عضوية كالأسيتون، ومتيلين كلورايد، ونظامي البوتانول 10% لم تحقق كفاءة عالية في انتزاع الدهون من الجلد.

وعلى هذا اعتُمدَ على أن نظامي البوتانول الصرف هو المذيب العضوي الأفضل لنزع الدهون منَ الجلد.

تحديد الحجم المناسب للمحل العضوي لنزع الدهون.

حُدّدتْ هذه النسبة بإضافة المذيب العضوي نظامي البوتانول المضاف بحجوم مختلفة (30,50,70 mL) إلى عينات من الجلد تزن كل منها 10غ، وبحسب شروط التجربة أُجريت الدراسة خلال 24 ساعة وباستخدام حاضنة هزازة عند درجة حرارة 5°C وسرعة تحريك 150 rpm. وبالاعتماد على الطريقة الوزنية حُسبتْ كمية الدهون المستخلصة من الجلد، والمخطط (5) يوضّح العلاقة بين حجم المحل العضوي وكمية الدهون المستخلصة.



المخطط (5) العلاقة بين نسبة (مذيب عضوي: جلد) وكمية الدهون المستخلصة

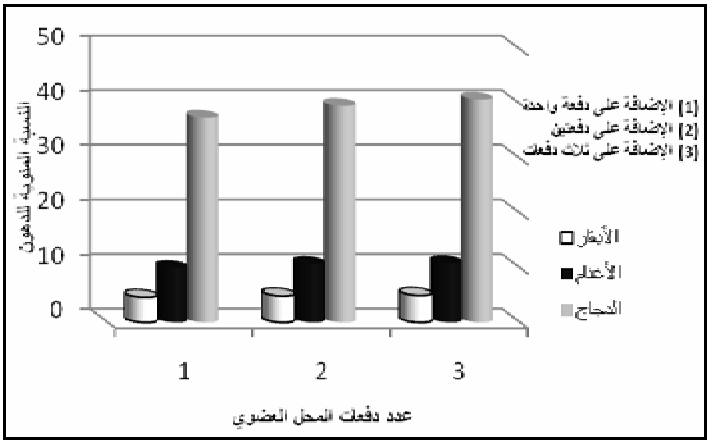
يوضح المخطط (5) أنه بازدياد حجم المذيب العضوي المضاف إلى الجلد تزداد كمية الدهون المنتزعة من الجلد، إذْ يلاحظ أن النسبة المئوية للدهون بلغت عند استخدام حجم 70 مل من المذيب لكل 10غ من الجلد 4.89% و10.87% و40.75% من جلد الأبقار والأغنام و الدجاج على الترتيب.

استطاع هذا الحجم من المحل العضوي نزع كمية أكبر من الدهون مقارنةً بالحجوم الأخرى المدروسة، لذا يعدُّ أن 70مل من نظامي البوتانول لكل 10غ من الجلد هو الأفضل إذا ما أُضيفَ المحل إلى الجلد دفعة واحدة.

الاستخلاص المتكرر للدهون من الجلد

أجريت الدراسة باستخدام 30 مل من نظامي البوتانول، مع الأخذ بالحسبان أن أي حجم أقل من هذا لن يحقق غمراً كاملاً للمادة المدروسة، ويضاف المذيب العضوي إلى الجلد على عدة دفعات، وبعد كل إضافة يسحب المذيب وتضاف الدفعة اللاحقة، ويجرى الاستخلاص في حاضنة هزازة عند درجة حرارة 5°C وسرعة تحريك 150 rpm؛ وذلك خلال 24 ساعة فقط أياً كان عدد الدفعات؛ وذلك وفقاً لشروط التجربة، وحسبت كمية الدهون بعد ترشيح المحل وتبخيره وزنياً.

يبيّن المخطط (6) تزايد كمية الدهون المستخلصة من الجلد بازدياد عدد دفعات المذيب العضوي المضاف إلى الجلد.



المخطط (6) تزايد كمية الدهون المستخلصة بازدياد عدد دفعات المذيب العضوي

يوضّح المخطط (6) أن إضافة المذيب العضوي بحجم 30 مل إلى كلّ 10غ من الجلد على ثلاث دفعات تؤدي إلى استخلاص كمية من الدهون تعادل الكمية التي تم الحصول عليها عندما أضيف المذيب العضوي بحجم 70 مل إلى كلّ 10غ من الجلد على دفعة واحدة.

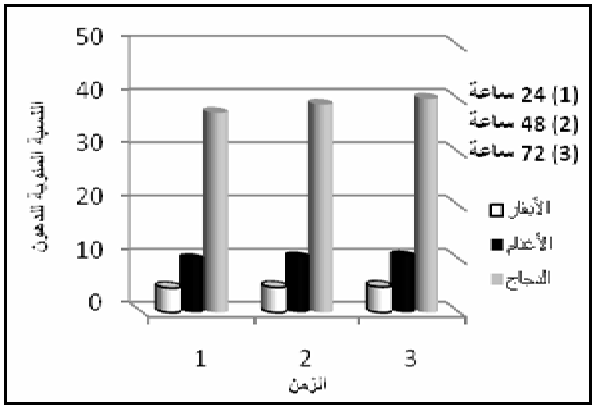
وقد بلغت نسبة الدهون المستخلصة عند إضافة المحل العضوي على ثلاث دفعات 4.92% و10.87% و40.8% من جلد كل من الأبقار والأغنام والدجاج على الترتيب.

لذا اعتُمدَ على إضافة المذيب العضوي بحجم 30 مل إلى كل 10غ من الجلد على ثلاث دفَعات (3×10 مل)؛ وبهذا نكون قد استخدمنا أقل كمية ممكنة من المذيب وحصلنا على أكبر كمية ممكنة من الدهون.

تعيين الزمن اللازم للنقع بالمذيب العضوي

حُدّد الزمن اللازم بنقع الجلد في نظامي البوتانول بنسبة 30 مل لكل 10غ من الجلد في مدد زمنية مختلفة في حاضنة هزازة بسرعة 150 rpm ودرجة حرارة 5°C بحسب شروط التجربة، وحسبت كمية الدهون بالطريقة الوزنية.

يوضّح المخطط (7) العلاقة بين زمن نقع الجلد بنظامي البوتانول وكمية الدهون المستخلصة من الجلد.



المخطط (7) تزايد كمية الدهون المستخلصة بازدياد زمن النقع

يبيّن المخطط (7) أن زيادة زمن نقع الجلد بالمحل العضوي يسهم في زيادة كمية الدهون المستخلصة من الجلد لتصل إلى 4.76% و10.56% و40.15% من جلد كل من الأبقار والأغنام والدجاج على الترتيب عند زمن 72 ساعة، ومن ثمَّ ما حققه زمن النقع مدة 24 ساعة بإضافة المحل العضوي على ثلاث دفعات أفضل مما حققه زمن النقع مدة 72 ساعة عند إضافة المحل العضوي دفعة واحدة.

وبناءً على ما سبق ومن أجل نزع الدهون بكفاءة جيدة من الجلد اعتُمدَ على نقع الجلد بنظامي البوتانول الصرف بحجم 30 مل منه لكل 10غ من الجلد على ثلاث دفعات (3×10 مل) خلال 24 ساعة فقط.

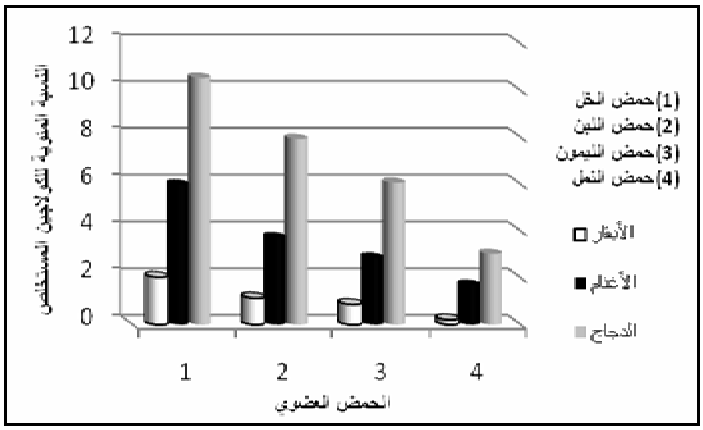
لابدَّ من الإشارة إلى أن نسبة الدهون العظمى في جلد كل من الأبقار والأغنام والدجاج بلغت 4.93% و10.9% و41% على الترتيب، حُدّدت بإضافة نظامي البوتانول الى الجلد بحجم 70 مل لكل 10غ من الجلد مع تكرار هذه العملية عدة مرات إلى حين انتهاء عملية انتزاع الدهون التي كُشف عنها بعملية التبقع على ورقة الترشيح، مع العلم أنه من الإضافة الثالثة للمذيب لم يظهر أي آثار لبقع الدهون على ورقة الترشيح.

من ثمَّ إذا ما اعتمدنا النسب الواردة أعلاه أنها النسب العظمى للدهون في كل من المواد الأولية المدروسة، وبتطبيق شروط نزع الدهون الواردة أعلاه أيضاً نكون قد انتزعنا الدهون بنسبة 99.79% و99.72% و99.51% من جلد كل من الأبقار والأغنام والدجاج على الترتيب.

تحديد الحمض المناسب لاستخلاص الكولاجين

تجري هذه الدراسة بنقع الجلد المنزوع البروتينات اللاكولاجينية ومنزوع الدهون بحموض عضوية مختلفة حمض (الخل والنمل والليمون واللبن) لتحديد الحمض الأفضل لاستخلاص الكولاجين. وبالاعتماد على العديد من الدراسات [3,4,8] طبقت الشروط الآتية: تركيز الحموض 0.5M، وحجم الحمض 60 مل لكل 10غ جلد، وزمن النقع 48 ساعة. بعدها يفصل الجلد عن الرشاحة ويعاد نقع الجلد مرة أخرى بالحمض ذاته وبالشروط السابقة نفسها. تجمع الرشاحتان وتملَح بـــ NaCL حتى تركيز نهائي 0.9 M ليرسب الكولاجين بعد 24 ساعة تقريباً، وبعدها يفصل بالترشيح [3,4].

المخطط (8) يوضّح العلاقة بين نوع الحمض المستخدم وكمية الكولاجين المستخلصة من الجلد التي حسبت على أساس وزن الجلد الجاف المنزوع الشعر.



المخطط (8) العلاقة بين نوع الحمض العضوي و كمية الكولاجين المستخلص

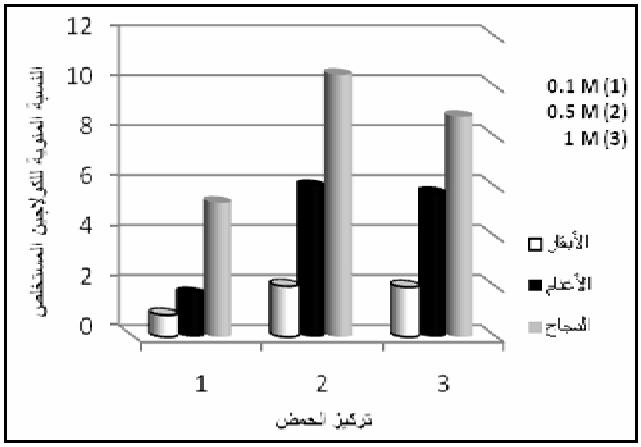
الواضح من المخطط (8)، أن حمض الخل هو الأفضل إذْ أعطى مردوداً أعلى من الكولاجين مقارنةً ببقية الحموض المدروسة، كما يلاحظ أن كمية الكولاجين في جلد الأغنام أعلى مما هي عليه في جلد الأبقار وأقل من كمية الكولاجين الموجودة في جلد الدجاج، إذْ بلغت نسبة الكولاجين المستخلصة من جلد الأبقار والأغنام والدجاج بهذا الحمض2.02% و5.98% و10.54% على الترتيب، وعلى أساس وزن الجلد الجاف المنزوع الشعر.

وعلى ماسبق وجدَ أن حمض الخل هو الحمض الأمثل لاستخلاص الكولاجين. وهذا يتفق مع كثير من الدراسات المرجعية مثل [3,4].

تعيين التركيز الأفضل لحمض الخل

أجريت الدراسة وبحسب شروط التجربة باستخدام تراكيز متعددة للحمض، بزمن نقع 48 ساعة [3]، وبحجم 60 مل لكل 10غ من الجلد [8]. يفصل الجلد عن المذيب الحمضي، ويعاد نقعه بالمذيب الحمضي نفسه ضمن الشروط السابقة [1,15]. تجمع الرشاحتان ويجري التمليح بواسطة NaCL حتى تركيز نهائي 0.9 M، يترك الكولاجين ليترسب مدة 24 ساعة بعدها يفصل بالترشيح.

يحسب وزن الكولاجين على أساس وزن الجلد منزوع الشعر، والمخطط (9) يوضّح العلاقة بين تراكيز حمض الخل وكمية الكولاجين المستخلصة.



المخطط (9) علاقة كمية الكولاجين المستخلصة بتراكيز حمض الخل

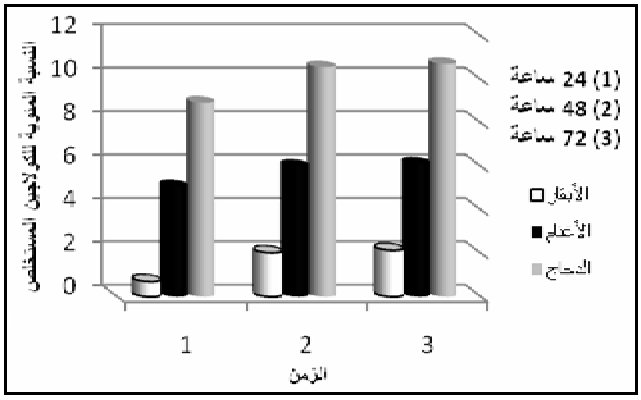
يوضّح المخطط (9) علاقة تركيز الحمض بكمية الكولاجين المستخلصة، ونجد أن التركيز المنخفض من الحمض لا يسهم في انتزاع سوى كمية منخفضة من الكولاجين، والتركيز المرتفع يقود -على الأغلب- إلى تفكك جزء من الكولاجين [2] وهذا ما يوضّحه المخطط (9) إذْ تناقصت كمية الكولاجين المستخلصة عند التراكيز العالية للحمض، أما التركيز M 0.5 فقد أسهم في استخلاص ما يقارب 2% و6% و10.5% من كولاجين جلد الأبقار والأغنام والدجاج المنزوع الشعر على الترتيب.

ومن ثمَّ وللحفاظ على تركيب الكولاجين وحتى لا يتأثر بالتراكيز العالية من حمض الخل، يُعتمد على حمض الخل M 0.5 على أنه الحمض الأفضل لاستخلاص الكولاجين

وهذا يتوافق مع كثير من الدراسات المرجعية المعتمدة على استخلاص الكولاجين من مصادر مختلفة [9,14].

تحديد الزمن الأفضل لاستخلاص الكولاجين بالحمض

نُقع الجلد المنزوع البروتينات اللاكولاجينية والمنزوع الدهون بحجم 60 مل من حمض الخل M 0.5 لكل 10غ من الجلد وبمدد زمنية مختلفة، حسبت كمية الكولاجين المستخلصة على أساس وزن الجلد المنزوع الشعر. المخطط (10) يوضّح علاقة زمن نقع الجلد بحمض الخل بالكمية المستخلصة من الكولاجين.



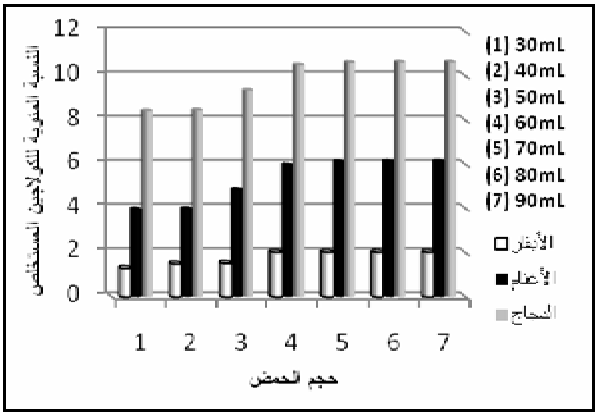
المخطط (10) تزايد النسبة المئوية للكولاجين المستخلص بازدياد زمن النقع بحمض الخل

يلاحظ من المخطط (10) أنه بازدياد زمن نقع الجلد بالحمض تزداد كمية الكولاجين المستخلص، ولكن يُلاحظ بعد 48 ساعة من النقع بحمض الخل أنه لا فائدة واضحة من عملية إطالة زمن النقع، إذْ يؤدي تمديد مدة النقع 24 ساعة أخرى إلى زيادة بنسبة الكولاجين المستخلص لا تتجاوز0.15% في الحالات المدروسة جميعها.

يتبيّن مما سبق أن عملية استخلاص الكولاجين من الجلد بواسطة حمض الخل M 0.5 تكون مرضية بزمن نقع 48 ساعة، وهذا يتوافق مع المرجع [3].

تحديد الحجم الأفضل للاستخلاص

يُنقعُ الجلد منزوع البروتينات اللاكولاجينية والدهون بحمض الخل M 0.5 مدة 48 ساعة، وبحجوم مختلفة من هذا الحمض، ثم يفصل المذيب الحمضي ويعاد النقع مرة ثانية بالشروط السابقة نفسها، بعد ذلك تجمع الرشاحتان، ويجري التمليح بواسطة NaCL حتى تركيز نهائي M 0.9، يترك الكولاجين ليترسب مدة 24 ساعة، بعدها يفصل بالترشيح وذلك وفقاً لشروط التجربة، والمخطط (11) يوضّح العلاقة بين حجم حمض الخل المستخدم وبين كمية الكولاجين المستخلصة.



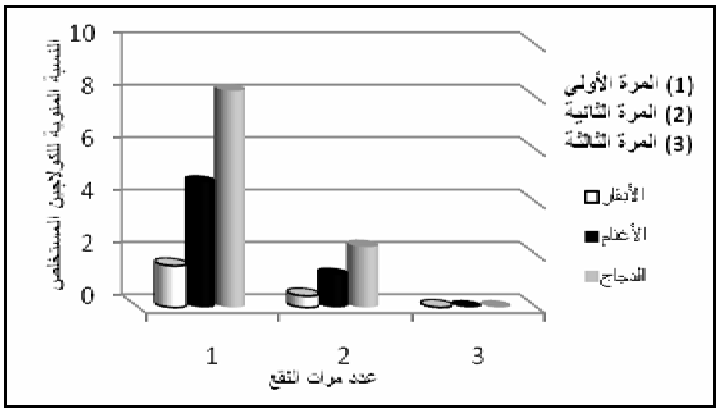
المخطط (11) العلاقة بين نسبة (حمض:جلد) وكمية الكولاجين المستخلص من الجلد

يوضّح المخطط (11) أنه كلما ازداد حجم المحلول الحمضي المضاف إلى الجلد ازدادت كمية الكولاجين المستخلص من هذا الجلد، لكن بدءاً من حجم 60 مل من الحمض لكل 10غ من الجلد تصبح الزيادة في كمية الكولاجين المستخلص طفيفة جداً وتتجه نحو الثبات.

لذا اعتُمدَ على هذا الحجم على أنه الأفضل لاستخلاص الكولاجين، ويتوافق ذلك مع نتائج البَاحث Zelechowska وزملائه [8].

دراسة عدد مرات النقع بالحمض لاستخلاص الكولاجين

في الدراسات والتجارب جميعها التي أجريت عند استخلاص الكولاجين بحمض الخل 0.5 M كان يعاد نقع الجلد بالحمض مرة ثانية وبشروط النقع للمرة الأولى نفسها، وذلك للتأكد من أن كامل الكولاجين قد استُخلصَ بالحمض، وقد لوحظ أن المرة الثانية من النقع بالحمض تسهم في استخلاص ماتبَقى من الكولاجين بعد الاستخلاص الأول، وإن كان ما تبقى جزءاً ضئيلاً. أمّا إعادة النقع للمرة الثالثة فلا تسهم في انتزاع أي جزء من الكولاجين، وهذا ما يوضّحه المخطط (12).



المخطط (12) العلاقة بين كمية الكولاجين المستخلص وعدد مرات النقع بحمض الخل

تسهم المرة الأولى للنقع بالمذيب الحمضي باستخلاص 78.42% من جلد الأبقار و79.32% من جلد الأغنام و78.24% من جلد الدجاج، في حين تسهم المرة الثانية للنقع في استخلاص ما تبقى من الكولاجين بشكل كامل، أي إنّ مرتين من النقع بحمض الخل 0.5 M تكفي لاستخلاص كامل الكولاجين من الجلد، إذا ما اعتمدت الطريقة الحمضية في عملية الاستخلاص، وهذا يتوافق مع نتائج البحوث التي قام بها Suphatharaprateep وزملاؤه [15].

النتيجة

الاستخلاص الأمثل لكولاجين بقايا جلود مصادر حيوانية مختلفة بالطريقة الحمضية استُخدم حمض الخل 0.5 M؛ وذلك بعد معالجة الجلد بإزالة الشعر أولاً بمزيج من محلول كَبريت الصوديوم وهيدروكسيد الصوديوم، ومن ثم إزالة البروتينات اللاكولاجينية بمحلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1 M، وأخيراً إزالة الدهون باستخدام نظامي البوتانول اللامائي.

REFERENCES المراجع

1. Potaros, T., Raksakulthai, N., Runglerdkreangkrai, J., Worawattanamateekul, W. 2009. Characteristics of Collagen from Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) Skin Isolated by Two Different Methods, Kasetsart J, 43, 584 – 593.
2. Wang, L., Yang, B., Du, X., Yang, Y., Liu, J. 2008. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (Ctenopharyngodon idella) by response surface methodology, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9,604-607.
3. Yan, M., Li, B., Zhao, X., Ren, G., Zhuang, Y., Hou, H., Zhang, X., Chen, L., Fan, Y. 2008. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye Pollock (Theragra chalcogramma), Food Chemistry, 107,1581-1586.
4. Cheng, F. Y., Hsu, F. W., Chang, H. S., Lin, L. C., Sakata, R., 2009. Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet, Food Chemistry, 113,563-567.
5. Karim, A. A., Bhat, R., 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins, Food Hydrocolloids, 23,563–576.
6. Senaratne, L. S., Park, P. J., Kim, S. K., 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (Lagocephalus gloveri) skin, Bioresource Technology, 97,191–197.
7. Tavakolipour, H., (2011). Extraction and Evaluation of Gelatin from Silver Carp Waste, World Journal of Fish and Marine Sciences, 3(1),10-15.
8. Zelechowska, E., Sadowska, M., Turk, M., 2010, Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (Gadus morhua), Food Hydrocolloids, 24,325 - 329.
9. Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M., (2005). Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (Priacanthus macracanthus) skin, Journal of the Science of Food and Agriculture, 85,1203-1210.
10. Li,D., Mu, B., Cai, S., Lin, W., (2009). Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen, Ultrasonics Sonochemistry, 16, 605–609.
11. أحمد مالو وسامح حمو، 2010، الكيمياء الحيوية، جامعة دمشق.
12. Sivakumar, P., Suguna, L., Chandrakasan, G., (1997). Purification and partial characterization of a type V like collagen from the muscle of marine prawn, Penaeus indicus, J. Biosci., Vol. 22, Number 2,131-141.
13. Scopes, R. K., (2006). Protein Purification: Principles and Practice (Third Edition), *Springer Advanced Texts in Chemistry*, 349-350.
14. Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., Shimizu, Y., (1987). Isolation of Native Acid – Soluble Collagen from Fish Muscle, Nippon Suisan Gakkaishi, 53(8),1431-1436
15. Suphatharaprateep, W., Cheirsilp, B., Jongjareonrak, A. (2011). Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction, New Biotechnology, Vol. 00, Number00.