دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد سوم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۳
http://japu.gau.ac.ir

مقایسه کینتیک آنزیم تریپسین تخلیص شده از ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) با استفاده از سوبسترای سنتتیک آمیدی و استری

*** عباس زمانی[۱]، رسول مدنی[۲] و مسعود رضائی[۳]**

[۱] استادیار گروه شیلات، دانشگاه ملایر، همدان،

[۲] دانشیار گروه بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، البرز، کرج،

[۳] استاد گروه شیلات، دانشگاه تربیت مدرس، نور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۰

چکیده

در این پژوهش پارامترهای کینتیک آنزیم تریپسین تخلیص شده از ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی (*C.cultriventris caspia*) با استفاده از سوبسترای آمیدی (BAPNA)[۱] و استری (TAME)[۲] مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه کینتیک آنزیم تریپسین بین سوبسترای BAPNA و TAME نشان داد که پارامترهای کینتیکی فعالیت بیشینه (V_{max})، ثابت کاتالیزوری (k_{cat}) و کارایی کاتالیزوری (k_{cat}/K_m) در سوبسترای TAME نسبت به سوبسترای BAPNA بالاتر بودند ولی مقدار ثابت میکائیلیس- منتن (K_m)[۳] در سوبسترای TAME کمتر از سوبسترای BAPNA بود. مقدار V_{max} آنزیم در سوبسترای TAME بطور معنی‌داری بالاتر از نوع BAPNA بود (P<۰/۰۵). مقدار ثابت K_m در سوبسترای TAME کمتر از نوع BAPNA بود ولی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). مقادیر k_{cat} و k_{cat}/K_m در سوبسترای TAME بطور معنی‌داری بالاتر از نوع BAPNA بود (P<۰/۰۵). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که میل ترکیبی آنزیم تریپسین تخلیص شده

1- α-N-benzoyl-DL-arginine-ρ-nitroanilide hydrochloride
2- N-(α-p-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride
3- Michaelis - Menten

*مسئول مکاتبه: zamanibouzandan@yahoo.com

از ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی نسبت به سوبسترای TAME بالاتر از BAPNA است و می‌توان از سوبسترای TAME برای سنجش فعالیت آنزیمی در این گونه استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تریپسین، سوبسترا، کیلکای معمولی، کینتیک

مقدمه

به دلیل رشد روزافزون صنایع در جهان امروز و نیاز به ترکیبات اولیه برای تولید فرآورده‌های مختلف، استفاده از دیگر منابع جهت تامین نیاز اولیه صنایع ضروری به نظر می‌رسد (خانتافانت و بنجاکول،۲۰۱۰). یکی از این ترکیبات که استفاده بسیار زیادی در صنایع مختلف مانند صنایع غذایی، داروسازی، شوینده، چرم‌سازی و غیره دارد آنزیم‌ها می‌باشند. آنزیم‌ها از منابع حیوانی، گیاهی و میکروبی تهیه می‌شوند. تعدادی از آنزیم‌ها به طور سنتی از منابع حیوانی تهیه می‌شوند که می‌توان به لیپاز و تریپسین اشاره کرد (سیمپسون، ۲۰۰۰). آنزیم‌ها، مولکول‌هایی پروتئینی هستند که به عنوان کاتالیزور در واکنش‌های شیمیایی شرکت نموده و نقش مهمی در کاهش انرژی مورد نیاز برای انجام واکنش دارند.

یکی از منابع حیوانی تامین‌کننده آنزیم‌ها که امروزه مورد توجه قرارگرفته است جانوران آبزی هستند (شهیدی و کمیل، ۲۰۰۱). محیط‌های آبی بدلیل دارا بودن گونه‌های متنوع آبزی اعم از ماهیان و بی‌مهرگان آبزی ظرفیت بالایی برای کشف و تولید آنزیم‌های مختلف دارند. بیشتر آنزیم‌های موجود در ماهیان و بی‌مهرگان آبزی در موجودات خشک‌زی نیز دیده می‌شود ولی دارای تفاوت‌هایی در وزن مولکولی، pH و دمای بهینه، پایداری pH و دمایی، خواص بازدارندگی و خصوصیات کینتیکی (مانند سرعت بیشینه و ثابت کاتالیزوری) آنها اشاره کرد (شهیدی و کمیل، ۲۰۰۱). امعا و احشا یکی از مهمترین ضایعات صنایع شیلاتی بوده و ۵ درصد از کل بدن ماهی را تشکیل می‌دهد که ضمایم پیلوریک بعنوان بخشی از این امعا و احشا منبع مهمی از آنزیم‌های گوارشی مخصوصا پروتئازهای قلیایی است که در ۱۰-۸ pH بالاترین فعالیت را دارند (کاستیلو - یانز و همکاران، ۲۰۰۵). امروزه استفاده از این پروتئازها بطور چشمگیری افزایش یافته است زیرا در شرایط سخت مثل دمای ٦۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد، pH بالا و عوامل اکسید کننده مانند پراکسید هیدروژن پایدار هستند (کلومکلائو و همکاران، ۲۰۰۷). یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های پروتئازی موجود در ماهیان آنزیم تریپسین است و

فعالیت کاتالیـــزوری این آنـــزیم نسبت به تریپسین پستانداران بـالاتر بـوده و وزن مولکـولی آن بـین ۲۸۰۰۰–۲۲۰۰۰Da است (کیشیمورا و همکاران، ۲۰۰۵).

آنزیم تریپسین موجود در برخی از ماهیان دارای پایداری حرارتی بالا و فعالیت قلیایی سازگار با شوینده‌ها می‌باشند (سامل و همکاران، ۱۹۹۰). تریپسین یک فاکتور افزایش‌دهنده هیدرولیز پروتئین است بطوریکه اضافه نمودن طحال تون هوور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) که حاوی تریپسین است در هیدرولیز پروتئین‌های عضله ساردین در فرایند تولید سس ماهی تاثیر بالایی دارد و پپتیدهای تولید شده خاصیت ضداکسیداسیونی دارند (کلومکلائو و همکاران، ۲۰۰٦؛ خانتافانت و بنجاکول، ۲۰۰۸). از دیگر کاربردهای آنزیم تریپسین می‌توان به استفاده برای تولید پنیر، تولید سس سویا، ترد کردن و خوش طعم نمودن گوشت، کشت سلول و تولید پروتئین‌های نوترکیب، تشخیص دیابت و درمان آن، مواد شوینده، صنایع چرم‌سازی، هیدرولیز کازئین موجود در شیر خشک مصرفی نوزادان بعنوان کمک هضم و در آزمایشات پروتئومیکس در مرحله طیف‌سنجی جرمی اشاره کرد (جلولی و همکاران، ۲۰۰۹؛ کلومکلائو و همکاران، ۲۰۱۰).

کیلکا ماهیان از مهمترین ماهیان پلاژیک دریای خـزر و از خـانواده شـگ ماهیـان (*Clupeidae*) هستند و متعلق به جنس *Clupeonella* بوده و شامل سه گونهٔ کیلکای معمولی (*C.cultriventris caspia*)، کیلکای آنچوی (*C.engrauliformis*) و کیلکای چشم درشت (*C.grimmi*) می‌باشند که در بین این گونه‌ها، کیلکای معمولی بیش از ۹۰ درصد صید را به خـود اختصـاص داده اسـت (سـازمان شـیلات ایران؛ کریم‌زاده و همکاران،۲۰۱۰). کیلکای معمولی در مناطق مختلف دریا اعم از قسـمت جنـوبی و شمالی دریای خزر پراکنده است و از انواع زئوپلانکتون، سخت پوستان و لارو نرم‌تنان و غیـره تغذیـه می‌کند (کازانچف، ۱۹٦۳). امروزه بیشتر پژوهش‌ها در زمینه استفاده بهتر از ماهیان کوچک پلاژیـک و تولید فرآورده‌هایی با ارزش مثل آنزیم‌ها (به‌جای تولید پودر مـاهی) و یـا اسـتفاده از امعـاء و احشـاء حاصله بعنوان منبع آنزیمی که حین تولید کنسرو بجـای مـی‌مانـد در حـال انجـام اسـت (بوگـاتف و همکاران، ۲۰۰۷).

یکی از مهمترین معیارهای اندازه‌گیری قابلیت یک آنـزیم تعیـین ویژگـی‌هـای کینتیـک آن اسـت بطوریکه کینتیک یک مسیر سیستماتیک برای آنالیز و سنجش کمی اثر عـواملی ماننـد غلظـت آنـزیم، غلظت سوبسترا، شرایط محیطی مانند دما، pH بر فعالیت آنزیم اسـت. معادلـه حاصـل از روش لایـن ویور و برک (۱۹۳٤) که فرم مرتب شده خطی معادله میکائیلیس– منتن (۱۹۱۹) است که روش مناسبی

برای برآورد پارامترهای کینتیکی از جمله سرعت بیشینه (V_{max}) و ثابت میکائیلیس- منتن (K_m) است. در این پژوهش سعی شده است تا پارامترهای کینتیک آنزیم تریپسین تخلیص شده از ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی را از طریق سوبستراهای BAPNA و TAME که به ترتیب بیانگر فعالیت آمیدازی و استرازی آنزیم تریپسین هستند جهت تعیین سوبسترای با میل ترکیبی بالا با آنزیم مورد نظر تعیین نمود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه ماهی: ماهی کیلکای معمولی بعد از صید با تور قیفی در داخل یک ظرف یونولیتی با نسبت ۱ به ۲ با یخ مخلوط گردیده و سپس به آزمایشگاه منتقل شد (خانتافانت و بنجاکول، ۲۰۱۰). بعد از انتقال ماهیان به آزمایشگاه، آنها را چندین مرتبه با آب سرد شسته تا آلودگی‌های روی بدن برطرف شود. سپس ۳۰ گرم ضمائم پیلوریک از ۲۵۰ عدد ماهی کیلکای معمولی در حضور یخ جدا شده و در پلاستیک درب دار قرار گرفته و بلافاصله در فریزر۸۰- نگهداری شدند (خانتافانت و بنجاکول، ۲۰۱۰). میانگین وزن و طول کل ماهیان به‌ترتیب ۱/۷۵±۹/۵ گرم و ۰/٦۷±۱۱/٦٤ سانتی‌متر بودند.

چربی‌زدایی و آماده‌سازی نمونه‌ها: نمونه ضمائم پیلوریک برای مدت ۲ ساعت در دمای یخچال (٤°C) قرار گرفتند تا از حالت انجماد خارج شوند. سپس نمونه‌ها را تعیین حجم کرده و با استون سرد (۲۰°C-) با نسبت ۱ به ۳ مخلوط نموده و برای مدت ۱ دقیقه عمل همگن‌سازی با هموژنایزر با دور ۱۱۰۰۰ rpm در حضور یخ انجام شد. سپس نمونه بوسیله کاغذ صافی فیلتر شده و مواد باقیمانده روی فیلتر چندین مرتبه با استون سرد شسته شدند تا عمل چربی‌زدایی به خوبی انجام شود. سپس مواد روی فیلتر برای مدت یک شبانه‌روز در دمای اتاق (٢٤ °C) قرار گرفتند تا خشک شوند (ال بلتاگی و همکاران، ۲۰۰۵) پودر خشک شده حاصل از نمونه ضمائم پیلوریک و روده با بافر استخراج (A) شامل۵۰ میلی‌مولار تریس- HCl، pH ۷/۵ حاوی۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ و ۰/۵ مولار NaCl با نسبت ۱ به۵۰ ترکیب شده و برای مدت ۳ ساعت در دمای یخچال (٤°C) بر روی همزن مغناطیسی به آرامی مخلوط شدند. سپس مخلوط حاصله برای مدت ٤٥ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در ١٤٠٠٠g سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی بعنوان عصاره خام آنزیمی برای ادامه آزمایشات انتخاب گردید (خانتافانت و بنجاکول، ۲۰۱۰).

تخلیص آنزیم تریپسین: عصاره خام آنزیمی با آمونیوم سولفات با اشباعیت ۳۰ تا ٦۰ درصد جهت رسوب دادن آنزیم تریپسین مخلوط گردید. سپس قسمت رسوب یافته جمع‌آوری شده و در بافر B (۵۰ میلی‌مولار تریس- HCl، pH ۷/۵ ، ۰/۵ مولار NaCl) حل شده و درکیسه دیالیز ریخته و برای یک شبانه‌روز در حضور بافر B (با نسبت حجمی (V/V) ۱ به ۲۰۰) با ۳ بار تعویض بافر، عمل دیالیز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد جهت حذف یون‌های آمونیوم سولفات انجام شد (خانتافانت و بنجاکول،۲۰۱۰). برای تخلیص آنزیم تریپسین از ستون‌های کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون نوع سفادکس جی ۷۵ (۸۰×۱/۷cm) و تعویض یونی دی اتیل آمینو اتیل- سلولز (۲۰×۱/۲ cm) استفاده گردید و جذب پروتئین فراکسیون‌های جمع‌آوری شده با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید (کاستیلویانز و همکاران، ۲۰۰۵). برای بررسی میزان خلوص و تعیین وزن مولکولی آنزیم تریپسین تخلیص شده از SDS-PAGE بر اساس روش لاملی (۱۹۷۰) استفاده گردید. در این روش از سدیم دودسیل سولفات به‌عنوان یک ماده احیایی و از پلی‌اکریل آمید و بیس اکریل آمید بعنوان ژل در الکتروفورز استفاده شد بطوریکه غلظت ژل ردیف‌کننده[1] ٤ درصد و غلظت ژل تفکیک کننده[2] ۱۲درصد بود. بافر نمونه شامل بافر تریس- HCl ۰/۰٦۲۵ مولار، pH ٦/۸ ، SDS ۲٪، گلیسرول ۱۰٪، بتامرکپتواتانول ۵٪ و برومومفنول بلو بود. نمونه آنزیمی با بافر نمونه با نسبت ۳ به ۱ مخلوط شده و برای مدت ۱۰ در آب جوش قرار گرفت. بعد از خنک کردن نمونه در دمای اتاق به هر چاهک حدود ۲۰ میکرولیتر نمونه تزریق گردید. بعد از اتمام مرحله الکتروفورزیز، وزن مولکولی آنزیم تخلیص شده با استفاده از روش Rf[3] جهت محاسبه پارامترهای کینتیک مورد استفاده قرار گرفت که میزان وزن آنزیم تخلیص شده ۲۳/۲ کیلودالتون بود.

مطالعه کینتیک آنزیم تریپسین تخلیص شده: برای تعیین کینتیک آنزیم تریپسین تخلیص شده از روش لاین ویور و برک (۱۹۳٤) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا دو سوبسترای BAPNA و TAME که به ترتیب بیانگر فعالیت آمیدازی و استرازی آنزیم هستند با غلظت‌هایی از mM ۲-۰/۰۱ (شامل ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰٤، ۰/۰۸، ۰/۱٦، ۰/۳۲، ۰/٦٤، ۱/۲۸، ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار) تهیه گردیدند. سپس نمونه آنزیمی با هر یک از غلظت‌های تهیه شده از سوبستراهای BAPNA و TAME مخلوط شده و فعالیت آمیدازی آنزیم تریپسین از روش ارلانگر و همکاران (۱۹٦۱) و فعالیت استرازی آن از روش هومل (۱۹۵۹)

1- Stacking
2- Resolving
3- Relative mobility

اندازه‌گیری گردید و حداکثر فعالیت آنزیم (V_{max})، ثابت میکائیلیس– منتن (K_m)، ثابت کاتالیزوری یا عدد تبدیل (k_{cat}) وکارایی کاتالیزوری (k_{cat}/k_m) محاسبه گردیدند. برای محاسبه مقدار [E]، غلظت مولی آنزیم تخلیص شده بر اساس وزن مولکولی تعیین شده از الکتروفورز و غلظت آنزیم تخلیص شده از کروماتوگرافی محاسبه گردید (کاستیلویانز و همکاران، ۲۰۰۵؛ خانتافانت و بنجاکول، ۲۰۱۰).

سنجش فعالیت آنزیم تریپسین: برای تعیین فعالیت آمیدازی آنزیم تریپسین از روش ارلانگر و همکاران (۱۹٦۱) استفاده گردید. در این روش نمونه آنزیمی برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گزاری گردید و سپس جذب نمونه در ٤۱۰nm قرائت گردید. هر واحد از فعالیت آنزیمی برابر با تولید ۱ µmol از ماده ρ-nitroaniline در مدت زمان ۱ دقیقه از سوبسترا BAPNA بود.

برای تعیین فعالیت استرازی آنزیم تریپسین از روش هومل (۱۹۵۹) استفاده گردید. در این روش نمونه آنزیمی برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در فواصل ۱ دقیقه‌ای در ۲٤۷ نانومتر قرائت شد. هر واحد از فعالیت آنزیمی برابر با تولید ۱ میلی‌مول از ماده ρ-tosyl-argenine در مدت زمان ۱ دقیقه از سوبسترا TAME بود.

سنجش میزان پروتئین محلول: برای سنجش میزان پروتئین محلول از روش لوری و همکاران (۱۹۵۱) استفاده گردید. در این روش از آلبومین سرم گاوی با غلظت ۱ mg/ml به‌عنوان استاندارد استفاده گردید و قرائت نوری نمونه‌ها در ۷۵۰ نانومتر انجام شد.

آنالیز آماری: در این پژوهش، برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف – اسمیرنوف استفاده گردید. برای مقایسه پارامترهای کینتیک آنزیم تریپسین بین دو سوبسترای BAPNA و TAME، میانگین‌ها با آزمون غیرجفتی T در سطح ۵ درصد تحت نرم‌افزار SPSS17 مقایسه گردیدند و تمام ارزیابی‌ها نیز در ۳ تکرار انجام گرفت.

نتایج

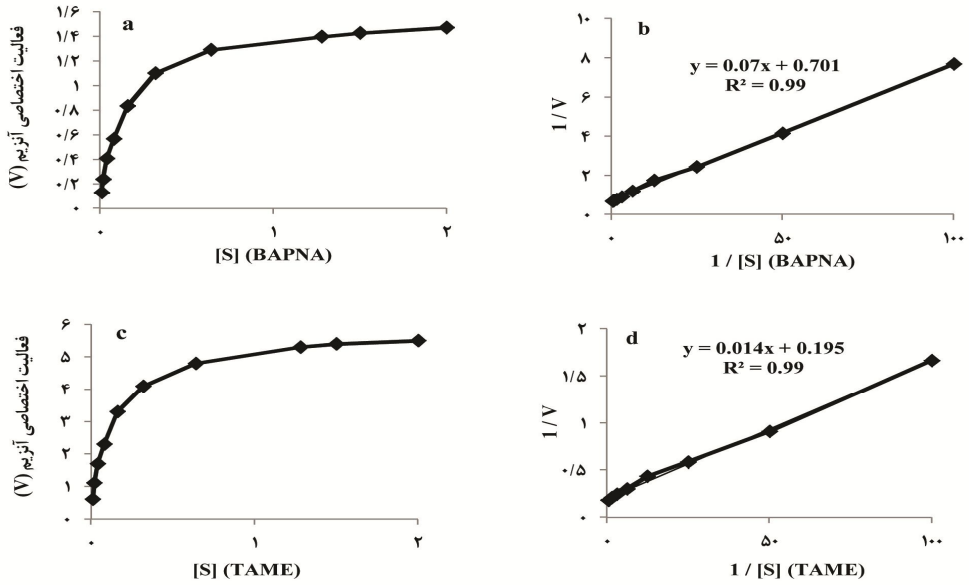
رفتارکینتیکی آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی در ۲ سوبسترای BAPNA و TAME در شکل‌های a تا d نشان داده شده است. براساس این اشکال و معادلات بدست آمده، مقدار فعالیت بیشینه (V_{max})، ثابت کاتالیزوری (k_{cat}) و کارایی کاتالیزوری (k_{cat}/K_m) برای آنزیم تریپسین کیلکای معمولی در سوبسترای TAME نسبت به BAPNA بالاتر بود و مقدار ثابت میکائیلیس– منتن (K_m) در TAME کمتر از BAPNA بود. نتایج حاصل از مقایسه کینتیک آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی

بین سوبسترای BAPNA و TAME در جدول ۱ آمده است. فعالیت بیشینه (V_{max}) آنزیم در سوبسترای TAME بطور معنی‌داری بالاتر از نوع BAPNA بود (P<۰/۰۵). ثابت میکائیلیس- منتن (K_m) در سوبسترای TAME کمتر از نوع BAPNA بود ولی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). ثابت کاتالیزوری (k_{cat}) و کارایی کاتالیزوری (k_{cat}/K_m) در سوبسترای TAME بطور معنی‌داری بالاتر از نوع BAPNA بود (P<۰/۰۵).

جدول ۱ – مقایسه پارامترهای کینتیک آنزیم ترپسین تخلیص شده از ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی با استفاده از سوبسترای BAPNA و TAME

سوبسترا	فعالیت بیشینه V_{max} (µmol/mg.s)	ثابت میخائلیس- منتن K_m (mM)	ثابت کاتالیزوری k_{cat} (s^{-1})	کارایی کاتالیزوری k_{cat}/K_m (s^{-1} mM^{-1})
BAPNA	۱/٤۲ ±۰/۰۳۰[a]	۰/۱ ±۰/۰۰۲[a]	۷/۹۳ ±۰/۰۳ [a]	۷۹/۳ ±۱/۲۱[a]
TAME	۵/۱۳±۰/۳[b]	۰/۰۷ ±۰/۰۰۱ [a]	۲۸/۵ ±۰/۵٤ [b]	٤۰۷/۱ ± ۲/۹۱[b]

حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α = ۰/۰۵، n = ۳، Mn ± SD)



رفتارکینتیکی آنزیم ترپسین ماهی کیلکای معمولی در سوبسترای‌های BAPNA و TAME

a: نمودار میخائلیس – منتن برای سوبسترای BAPNA. b: نمودار لاین ویور – برک برای سوبسترای BAPNA

c: نمودار میخائلیس – منتن برای سوبسترای TAME. d: نمودار لاین ویور – برک برای سوبسترای TAME

بحث

خصوصیات سوبسترایی آنزیم تریپسین به گونه‌ای است که به سمت گروه کربوکسیل اسید آمینه لیزین و آرژنین در سوبستراهای طبیعی و سنتتیک تمایل دارد به‌طوری‌که این آنزیم دارای یک بخش با شارژ منفی می‌باشد که می‌تواند گروه‌های با شارژ مثبت در سوبسترا مانند لایزین و آرژنین را شناسایی کند (شی و همکاران، ۲۰۰۷). بیشترین فعالیت این واکنش در pH بین ۷ تا ۹ رخ می‌دهد زیرا در این محدوده بخش دارای شارژ منفی می‌تواند تشکیل شود. طول زنجیره حاوی این شارژ مثبت می‌تواند بعنوان یک عامل تعیین‌کننده در بیان این خصوصیت مطرح باشد. به همین دلیل مشتقات آرژنین معمولاً بعنوان سوبسترا در تعیین فعالیت تریپسین استفاده می‌شوند که می‌توان به سوبسترا BAPNA و TAME اشاره نمود (شی و همکاران، ۲۰۰۷).

مطالعه کینتیک آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی نشان داد که در سوبسترای TAME نسبت به BAPNA از کارایی بالاتری برخوردار است. زیرا هرچه k_m یک آنزیم کمتر باشد میل ترکیبی بیشتری در اتصال با سوبسترا خواهد داشت و سریع‌تر می‌تواند به حداکثر فعالیت (V_{max}) خود برسد. چنین نتایجی توسط خانتافانت و بنجاکول (۲۰۱۰) در گونه *Lutjanus vitta* و سکیزاکی و همکاران (۲۰۰۰) در گونه *Oncorhynchus keta* گزارش شده است. بطوریکه مقدار k_m برای سوبسترای TAME و BAPNA در گونه *L.vitta* به ترتیب ۰/۳۲ و ۰/۵۰ و برای گونه *O. keta* ۰/۰۰۳ و ۰/۰۲۹ بودند.

مقدار ثابت کاتالیزوری (k_{cat}) برای آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی در سوبسترای TAME بالاتر از BAPNA بود. چنین نتایجی در گونه *L.vitta* (خانتافانت و بنجاکول، ۲۰۱۰)، *Macruronus novaezealandlae* (شی و همکاران، ۲۰۰۷) و *O. keta* (سکیزاکی و همکاران، ۲۰۰۰) گزارش شده است. بطوریکه مقدار k_{cat} در گونه *L.vitta* برای سوبسترای BAPNA معادل ٤/۷۱ و برای TAME معادل۱۱۲، در گونه *M.novaezealandlae* برای سوبسترای BAPNA معادل ۰/۳۳ و TAME معادل ۱۹ و در گونه *O. keta* برای سوبسترای BAPNA معادل ۲/۲۹ و برای TAME ۷۲/۳۵ بود.

ثابت کاتالیزوری یا عدد تبدیل یک آنزیم به ماکزیمم تعداد مولکول‌های سوبسترا گفته می‌شود که می‌تواند به ازای هر مولکول آنزیم در واحد زمان به محصول تبدیل شود. مقدار کارایی کاتالیزوری

(k_{cat}/K_m) برای آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی در سوبسترای TAME بالاتر از BAPNA بـود. چنین نتایجی در گونه *L.vita* (خانتافانت و بنجاکول، ۲۰۱۰)، *M. novaezealandlae* (شی و همکـاران، ۲۰۰۷) و *O. keta* (سکیزاکی و همکاران، ۲۰۰۰) گزارش شده است. به‌طوری‌که مقـدار آن در گونـه *L.vita* بـرای سوبسـترای BAPNA ۹/۲۷ و بـرای TAME ۳٤۱، در گونـه *M.novaezealandlae* بـرای سوبسـترای BAPNA ۵/۵ و TAME ۹/۱ و در گونـه *O. keta* بـرای سوبسـترای BAPNA ۷۹/۰۳ و برای TAME ۲٤۱۱۷ بود.

الیویرا و همکاران (۲۰۰۵) پروتئازهای شبه تریپسین را از روده میانی کرم ابریشم (*Anticarsia gemmatalis*) تخلیص نموده و مشخص نمودند که مقدار K_m و V_{max} برای سوبسترای BAPNA به ترتیب شامل ۰/۳۲ mM و ۰/٤۸ μM/s و برای سوبسترای TAME نیز شامل ۵۲/۵ μM و ۰/٦۱ μM/s بود. مطالعات نشان می‌دهند احتمالاً دلیل کارایی بالاتر آنزیم نسبت به سوبسترای استری اتصال بهتر آنزیم و سوبسترا می‌باشد به‌طوری‌که کارایی کاتالیزوری بالاتر برای سوبسترای TAME می‌تواند با مکانیسم واکنش کاتالیز شده توسط پروتئازهای سرین مرتبط باشد. این دسته از پروتئازها در فرایند فعالیت آمیدی خود نسبت به سوبسترای مورد نظر یک مرحله اسیل‌دار شدن[4] آهسته را دارا هستند که منجر به تشکیل کمپلکس اسیل – آنزیم می‌شود و بدنبال آن یک مرحله اسیل‌زدایی سریع را نشان می‌دهند که منجر به تشکیل فرآورده می‌شود. در حالی که در مورد فعالیت استری فرایند عکس مشاهده می‌شود. بنابراین مرحله تعیین کننده سرعت هیدرولیز آمیدی توسط آنزیم‌های شبه تریپسین اسیل‌دار شدن است. در حالیکه در هیدرولیز استری مرحله اصلی اسیل‌زدایی شدن می‌باشد (فسترز و فرشت، ۱۹۷۳؛ ایناگامی، ۱۹۷۲).

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که میل ترکیبی آنزیم تریپسین تخلیص شده از ضمایم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی نسبت به سوبسـترای TAME بـالاتر از BAPNA اسـت و مـی‌تـوان از سوبسـترای TAME برای سنجش فعالیت آنزیمی در این گونه استفاده نمود تا نتایج بهتری را بدست آورد.

1- Acylation

منابع

1. Bougatef, A., Souissi, N., Fakhfakh, N., Ellouz-Triki, Y. and Nasri, M. 2007. Purification and characterisation of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). Food Chemistry. 102: 343-350.
2. Castillo-Yanez, F., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreno, F. and Toro, M. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine, *Sardinops sagax caerulea*. Comparative Biochemistry and physiology, B, 140: 91-98.
3. El-Beltagy, A.E., El-Adawy, T.A., Rahma, E.H. and El-Bedawey, A.A. 2005. Purification and characterization of an alkaline protease from the viscera of bolti fish (*Tilapia nilotica*). Journal of Food Biochemistry. 29: 445-458.
4. Erlanger, B., Kokowsky, N. and Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch Biochem Biophys. 95: 271-278.
5. Fastrez, J. and Fersht, A.R. 1973. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. Biochemistry, 12: 2025-2034.
6. Hummel, B.C.W. 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 1393-1399.
7. Inagami, T. 1972. Trypsin. In: Funatsu, M., Hiromi, K., Imahori, K., Murachi, T., Narita, K. (Eds.), Proteins - Structure and Function. Kodanskap, Tokyo, Pp: 1-83.
8. Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Balti, R., Barkia, A. and Nasri, M. 2009. New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capticus*) with high activity at low temperature: Purification and characterization. Food Chemistry. 116: 644-650.
9. Karimzadeh, G., Gabrielyan, B. and Fazli, H. 2010. Population dynamics and biological characteristics of kilka species (Pisces: Clupeidae) in the southeastern coast of the Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 9(3): 422-433.
10. Kazanchev, A. 1963. Caspian Sea fishes. Fisheries Research Center of Guilan Province and Bandar Anzali. Translated to Persian by: Adeli, A. 1994.
11. Khantaphan, S. and Benjakul, S. 2008. Comparative study on the protease from fish pyloric caeca and the use for production of gelatine hydrolasste with antioxidative activity, Comp Physiol Biochem., 151B, 410-419.
12. Khantaphant, S. and Benjakul S. 2010. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). Food Chemistry. 120: 658-664.
13. Kishimura, H., Hayashi, K., Myashita, Y. and Nonami, Y. 2005. Characterization of two trypsin isozymes from the viscera of Japanase Anchovy (*Engraulis japonica*). Journal of Food Biochemistry. 29: 459-469.
14. Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2006. Effects of the addition of spleen of Skipjack tuna (*Katsuwonus*

pelamis) on the liquefaction and characteristics of fish sauce made from sardine (*Sardinella gibbosa*). Food Chemistry, 98: 440-452.
15. Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson B. 2007. Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Food Chemistry. 100: 1580-1589.
16. Klomklao, S., Kishimura, H., Benjakul, S., Simpson, B.K. and Visessanguan, W. 2010. Cationic trypsin: A predominant protease in Pacific saury (*Cololabias saira*) pyloric caeca. J. Food Biochemistry. 34: 1105-1123.
17. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
18. Lineweaver, H. and Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. J. Ameri. Chem. Soci. 56: 658-666.
19. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chemistry. 193: 265-275.
20. Michaelis,L. and Menten, M.L. 1913. Kinetik der invertinwirkung Biochem. Z., 49, 333-369. English translation Accessed 6 April 2007.
21. Oliveira, M.G.A., De Simone, S.G., Xavier, L.P. and Guedes, R.N.C. 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 140: 369-380.
22. Samal, B.B., Kara, B. and Stabinsky, Y. 1990. Stability of two novel serine proteineses in commercial laundry detergent formulations. Biotech Bioengine, 35: 650-652.
23. Sekizaki, H., Itoh, K., Murakami, M., Toyota, E. and Tanizawa, K. 2000. Anionic trypsin from chum salmon: Activity with p-amidinophenyl ester and comparison with bovine and *Streptomyces griseus* trypsins. Comparative Biochemistry and Physiology, 127B: 337-346.
24. Simpson, B.K. 2000. Digestive proteinases from marine animals. In Seafood enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality. Haard, N.F., and Simpson, B.K. (Ed). New York, Marcel Dekker. Pp: 531-540.
25. Shahidi, F. and Kamil, Y.V.A. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. Trends in Food Sci Tech, 12: 435-464.
26. Shi, C., Marshell, S.N. and Simpson, B.K. 2007. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of the New Zealand hoki fish (*Macruronus Novaezealandlae*). Journal of Food Biochemistry. 31: 772-796.
27. Shilat. 2010. Iranian Fisheries Organization. Annual Report. 60p (In Persian).
28. Tucker, G.A. and Woods, L.F.G. 1996. Enzymes in Food Processing. Ferdowsi University of Mashhad Press. 2nd edition. 365p. (Translated in Persian)