بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد چهارم، شماره اول، بهار ۱۳۹٤
http://japu.gau.ac.ir

مطالعه تأثیر برخی عوامل شیمیایی بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در محیط *in vitro*

مریم خواجوی[۱]، *عباس زمانی[۲] و امین اوجی‌فرد[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه تربیت مدرس، نور،
[۲]استادیار گروه شیلات، دانشگاه ملایر، [۳]استادیار گروه شیلات، دانشگاه خلیج فارس بوشهر
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۲/۱۲

چکیده

در این پژوهش، اثر عوامل شیمیایی شامل یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها، عوامل اکسید کننده و مهارکننده‌های آنزیمی بر فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد یون‌های K^+ و Na^+ نسبت به نمونه شاهد اثر کاهشی معنی‌داری بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین نداشتند (P>۰/۰۵). یون‌های Ca^{2+} و Mg^{2+} سبب افزایش معنی‌دار و یون‌های Mn^{2+}، Cu^{2+}، Ba^{2+}، Co^{2+}، Zn^{2+}، Fe^{2+} و Al^{3+} باعث کاهش معنی‌دار در فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین گردیدند (P<۰/۰۵). سورفاکتانت‌های ساپونین و اسید تاروکولیک باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین و سدیم کولات باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم کیموتریپسین نسبت به نمونه شاهد شدند (P<۰/۰۵) ولی سدیم کولات افزایش معنی‌داری را بر فعالیت آنزیم تریپسین نشان نداد (P>۰/۰۵) عامل اکسیدکننده پراکسیدهیدروژن باعث کاهش معنی‌دار در فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین گردید (P<۰/۰۵) ولی در رابطه با سدیم پربورات اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین نسبت به نمونه شاهد در حضور مهارکننده‌های SBTI، PMSF

*مسئول مکاتبه: a.zamani@malayeru.ac.ir

و پاراآمینوبنزآمیدین کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). مهارکننده‌های TPCK، پپاستاتین A، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول بر روی فعالیت آنزیم تریپسین در مقایسه با نمونه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان ندادند (P>۰/۰۵). فعالیت آنزیم کیموتریپسین در حضور مهارکننده‌های TPCK، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). فعالیت آنزیم تریپسین در حضور مهارکننده TLCK کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). اثر مهارکننده‌های TLCK و پپاستاتین A بر روی فعالیت آنزیم کیموتریپسین در مقایسه با نمونه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان ندادند (P>۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی: بچه ماهی نورس، قزل‌آلای رنگین‌کمان، عوامل شیمیایی، تریپسین

مقدمه

امروزه یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های زیست‌محیطی به‌خصوص محیط‌های آبی مسئله افزایش مواد آلاینده می‌باشد که به‌صورت فاضلاب، نشت نفت، پساب‌های مواد آلی و معدنی کارخانجات، مواد شیمیایی گوناگون اعم از فلزات و شبه فلزات بوده که موجب آلودگی آب‌های جهان به اشکال مختلف می‌شوند. این آلودگی‌ها می‌توانند اثرات مستقیم یا غیرمستقیم بر حیات موجودات زنده از جمله آبزیان داشته باشند (ناجی و همکاران، ۲۰۰۹). فعالیت‌های فیزیولوژیک بدن ماهیان تابع عوامل شیمیایی و همچنین مواد غذایی موجود در محیط‌زیست آن‌ها می‌باشد و می‌تواند بر عملکرد رشد و تولیدمثل آن‌ها تأثیرگذار باشد (شاهسونی و همکاران، ۲۰۰۳؛ قوتی و همکاران، ۲۰۱۲). امروزه با توجه به آلودگی آب‌ها به انواع ترکیبات شیمیایی و نقش آن‌ها در آبزی پروری، بررسی تأثیر این ترکیبات بر شاخص‌های فیزیولوژیک از جمله آنزیم‌های گوارشی مهم ارزیابی می‌شود. از مهمترین این ترکیبات می‌توان به یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها[1]، عوامل اکسید کننده و همچنین مهارکننده‌های آنزیمی اشاره نمود. سورفاکتانت‌ها معمولاً ترکیباتی آلی و آمفیفیلیک[2] هستند که می‌توانند ویژگی‌های ذاتی آنزیم‌ها مانند ساختار دوم و سوم را با اتصال به آنزیم تحت تأثیر قرار داده و در نتیجه بر توانایی کاتالیزوری آن‌ها تأثیرگذار باشند (روزن و کانجاپو، ۲۰۱۲). عوامل اکسیدکننده ترکیباتی هستند که می‌توانند با

1- Surfactant
2- Amphiphilic

گروه‌های تیول در آنزیم‌ها واکنش داده و با جذب الکترون باعث اکسیدشدن آن‌ها شوند. بسیاری از عوامل اکسید کننده قوی با تشکیل رادیکال‌های آزاد باعث اکسیدشدن آنزیم‌ها می‌شوند که این واکنش ابتدا با جذب اتم هیدروژن موجود در کربن آلفا صورت گرفته و منجربه دناتوره شدن پروتئین می‌شود (روبینگ، ۱۹۹٦؛ فینگان و همکاران، ۲۰۱۰).

یون‌های فلزی می‌توانند به‌عنوان الکتروفیل یا نوکلئوفیل و از طریق پیوندهای کئوردینانس، آنزیم و سوبسترا را به یکدیگر نزدیک نمایند ولی ویژگی یون‌ها به‌طور عمده بستگی به توانایی آن‌ها در اصلاح ساختار آبی آنزیم‌ها داشته و می‌تواند محیط هیدراتاسیون آنزیم و فعالیت کاتالیزوری آن را تحت تأثیر قرار دهد (گلاسکر و همکاران، ۱۹۹۹).

مهارکننده‌ها آنزیمی نیز مولکول‌هایی هستند که با آنزیم واکنش داده و مانع عملکرد طبیعی آن می‌شوند و در محیط‌های آبی و در برخی مواد غذایی وجود دارند. در بین آنزیم‌های گوارشی بدن ماهیان، سرینوپروتئینازهای[1] روده به‌ویژه تریپسین و کیموتریپسین از نقش مؤثرتری در گوارش ترکیبات پروتئینی و هضم آن‌ها برخوردارند. در جایگاه فعال این آنزیم‌ها اسید آمینه سرین به‌همراه اسیدآمینه هیستیدین و آسپارتیک نقش اصلی فعالیت کاتالیزوری را بر عهده دارد (گارسیا کارنو، ۱۹۹۲). میزان فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند تحت تأثیر عوامل شیمیایی قرار گرفته و بر میزان گوارش پروتئین‌ها تأثیرگذار باشد.

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O.mykiss*) مهمترین گونه پرورشی سردابی در ایران محسوب می‌شود و میزان تولید آن در سال ۱۳۹۲ بالغ بر ۱٤۳۹۱۷ تن بوده است (سازمان شیلات ایران، ۲۰۱۳). با توجه به افزایش میزان ترکیبات شیمیایی در محیط‌های آبی و استفاده از این منابع آبی در پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌تواند بر میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین و قابلیت گوارش مواد پروتئینی به‌ویژه در مراحل آغازین رشد تأثیرگذار باشد. هدف از این مطالعه، بررسی نقش یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها، عوامل اکسید کننده و مهارکننده‌های آنزیمی بر فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در بچه ماهیان نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان بوده که حساسیت بیشتری به این ترکیبات داشته می‌باشد.

1- Serinoproteinases

مواد و روش‌ها

نمونه ماهی: در این تحقیق تعداد ٤٠ عدد بچه ماهی نورس سالم قزل‌آلای رنگین‌کمان که کیسه زرده آن‌ها کاملاً جذب شده و از نظر فیزیولوژیک قادر به دریافت غذا و هضم آن بودند برای تهیه عصاره آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه عصاره آنزیمی: برای تهیه عصاره آنزیمی، نمونه بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان در بافر ٥٠ میلی‌مولار تریس- HCl، pH ٧/٥ حاوی ١٠ میلی‌مولار $CaCl_2$ و ٠/٥ مولار NaCl با نسبت ١ به ٥٠ به‌مدت ١ دقیقه در حضور یخ با دستگاه هموژنایزر، همگن گردید و سوسپانسیون حاصله برای مدت ٤٥ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در ١٤٠٠٠ گرم سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی به‌عنوان عصاره خام آنزیمی برای ادامه آزمایشات انتخاب گردید (خانتافات و بنجاکول، ٢٠١٠).

سنجش فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین: برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین از روش ارلانگر و همکاران (١٩٦١) استفاده گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین از سوبسترای BAPNA (Nα–benzoyl-DL-argenine-ρ-nitroanilide-HCL) و برای سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین از سوبسترای SAAPNA (N-Succinyl-AlaAla-Pro-phe-ρ-nitroanilide-HCL) استفاده گردید. جذب ρ-nitroanilide رها شده در طول موج ٤١٠ نانومتر قرائت گردید.

سنجش میزان پروتئین محلول: برای سنجش میزان پروتئین محلول از روش بردفورد (١٩٧٦) استفاده گردید. در این روش از آلبومین سرم گاوی با غلظت ١ mg/ ml به‌عنوان استاندارد استفاده گردید.

اثر یون‌های فلزی: اثر یون‌های فلزی کلرید سدیم (NaCl)، کلرید پتاسیم (KCl)، کلرید کلسیم ($CaCl_2$)، کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، کلرید مس ($CuCl_2$)، استات روی ($Zn(CH3COOH)_2$)، کلرید منگنز ($MnCl_2$)، کلرید باریم ($BaCl_2$)، کلرید کبالت ($CoCl_2$)، سولفات آهن ($FeSO_4$) و سولفات آلومینیوم ($Al_2(SO_4)_3$) در غلظت ٢mM بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین تعیین شد (لو و همکاران، ٢٠٠٨؛ جلولی و همکاران، ٢٠٠٩). برای این منظور، ابتدا نمونه آنزیمی با یون‌های فلزی با غلظت مذکور برای مدت ٣٠ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس مخلوط حاصل از انکوباسیون با محلول سوبسترا- بافر (١ میلی‌مولار BAPNA در بافر ٥٠ میلی‌مولار تریس- HCl، pH ٨ ٢٠ میلی‌مولار $CaCl_2$ برای تریپسین و ٠/١ میلی‌مولار SAAPNA در بافر ٥٠ میلی‌مولار تریس- HCl، pH ٨ ٢٠ میلی‌مولار $CaCl_2$ برای کیموتریپسین) مخلوط شده و برای مدت ٢٠ دقیقه در دمای ٣٧ درجه

سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ٤١٠nm انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد یون فلزی بود. سپس فعالیت نسبی آنزیم تریپسین و کیموتریسپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمول زیر به‌صورت درصد گزارش گردید:

$$\text{فعالیت نسبی (درصد)} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در حضور یون‌های فلزی}}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در نمونه شاهد}} \times ۱۰۰$$

اثر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده: برای بررسی اثر این ترکیبات، ۲۰ میکرولیتر از نمونه آنزیمی با ۲۰ میکرولیتر از سورفاکتانت‌های ساپونین[1]، اسید تاروکولیک[2] و سدیم کولات[3] تا حصول غلظت نهایی ۱ درصد ترکیب شد. همچنین عوامل اکسیدکننده شامل سدیم پربورات[4] با غلظت نهایی ۱ درصد و پراکسید هیدروژن[5] با غلظت نهایی ۱۵ درصد نیز با نمونه آنزیمی ترکیب شدند. سپس عمل انکوباسیون برای مدت ۱ ساعت در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از این ترکیب انکوبه شده را برداشته و با محلول سوبسترا – بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس– HCl، ۸ pH ۲۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ برای تریپسین و ۰/۱ میلی‌مولار SAAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس– HCl، ۸ pH ۲۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ برای کیموتریپسین) مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ٤١٠ نانومتر انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد این ترکیبات بود و از آب مقطر استفاده گردید (جلولی و همکاران، ۲۰۰۹؛ ارلانگر و همکاران، ۱۹٦۱). سپس فعالیت نسبی آنزیم تریپسین و کیموتریسپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمول زیر به‌صورت درصد گزارش گردید:

$$\text{فعالیت نسبی (درصد)} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در حضور سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده}}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در نمونه شاهد}} \times ۱۰۰$$

1- Saponin
2- Taurocholic Acid
3- Sodium Cholate
4- Sodium Perborate
5- Hydrogen Peroxide

اثر مهارکننده‌های آنزیمی: اثـر مهارکننـده‌هـای SBTI[6] (٠/٠٥ mM) و TLCK[7] (٥mM) بـه‌عنـوان بازدارنـدهای اختصاصـی تریپسـین، PMSF[8] (١٠mM) و پاراآمینوبنزآمیـدین[9] (٥mM) بـه‌عنـوان مهارکننده‌های پروتئازهای سرین، TPCK[10] (٥mM) به‌عنـوان مهارکننـده اختصاصـی کیموتریپسـین، پپاستاتین A[11] (٠/٠١mM) به‌عنوان مهارکننده اختصاصی پروتئازهای آسـپارتیک، یدواسـتیک اسـید[12] (١mM) به‌عنوان مهارکننده پروتئازهای سیستئین، EDTA[13] (٢mM) به‌عنوان مهارکننده متالوپروتئازها و بتامرکپتواتانول[14] (٥ mM) به‌عنوان یک عامل احیاکننده پیوند دی‌سـولفید (S-S) بـر فعالیـت آنـزیم تریپسین و کیموتریپسین مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، ابتدا نمونه آنزیمی با مهارکننده‌هـا برای ١٥ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس مخلوط حاصله از انکوباسیون با محلول سوبسـترا – بافر (١ میلی‌مولار BAPNA در بافر ٥٠ میلی‌مولار تریس- HCl، ٨ pH ٢٠ میلی‌مولار $CaCl_2$ بـرای تریپسـین و ٠/١ میلـی‌مـولار SAAPNA در بـافر ٥٠ میلـی‌مـولار تـریس- HCl، ٨ pH ٢٠ میلی‌مولار $CaCl_2$ برای کیموتریپسین) مخلـوط شـده و بـرای مـدت ٢٠ دقیقـه در دمـای ٣٧ درجـه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول مـوج ٤١٠nm انجـام شـد. روش سـنجش نمونـه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد مهارکننده بود (خانتافات و بنجـاکول، ٢٠١٠؛ ارلانگر و همکاران، ١٩٦١). سپس فعالیت نسبی آنـزیم تریپسـین و کیموتریسپسـین از طریـق نسـبت فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمـول زیـر بـه‌صـورت درصـد گـزارش گردید:

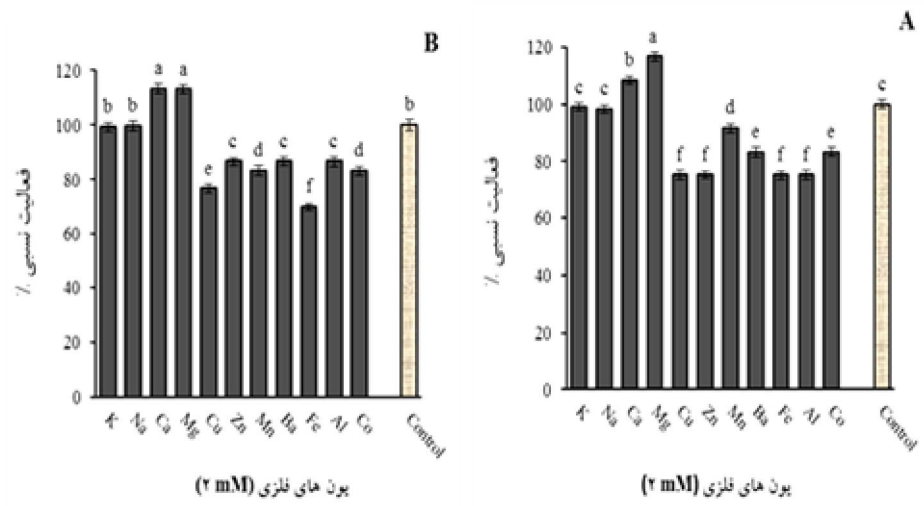
$$\text{فعالیت نسبی (درصد)} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در نمونه‌های حاوی مهارکننده}}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در نمونه شاهد}} \times ١٠٠$$

1- Soybean trypsin inhibitor
2- N-tosyl-L-Lysine Chloromethyl Keton
3- Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride
4- ρ-Aminobenzamidine
5- N-tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone
6- Pepstatin A
7- Iodoacetic acid
8- Ethylenediaminetetraacetic acid
14- ß, mercaptoethanol

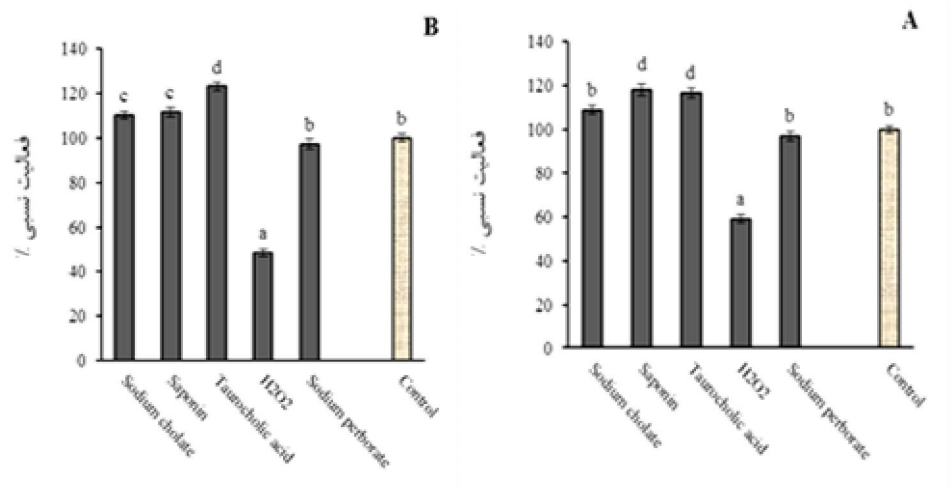
آنالیز آماری: در این تحقیق، برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف – اسمیرنوف استفاده گردید و برای بررسی اثر یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها، عوامل اکسید کننده و مهارکننده‌های آنزیمی بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) تحت نرم‌افزار SPSS 17 استفاده گردید و برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها بین نمونه شاهد با یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها، عوامل اکسیدکننده و مهارکننده‌های آنزیمی از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام ارزیابی‌ها نیز در ۳ تکرار انجام گرفت.

نتایج

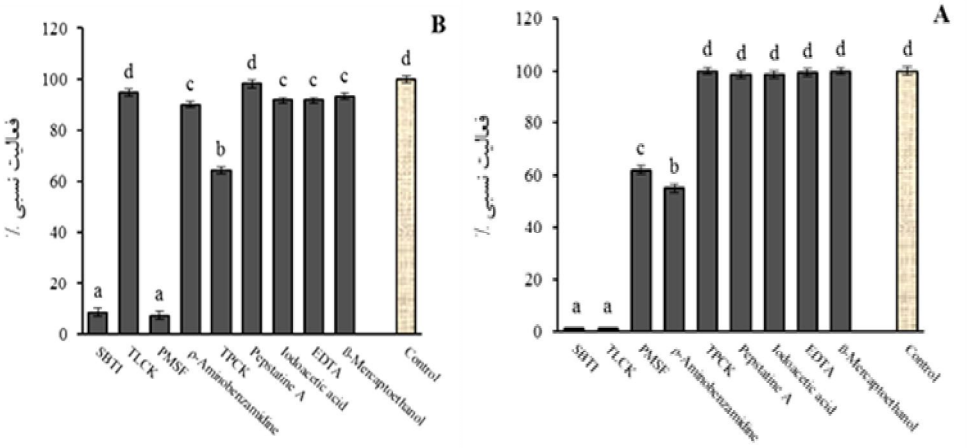
نتایج حاصل از بررسی اثر یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها، عوامل اکسیدکننده و مهارکننده‌های آنزیمی بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان در شکل‌های ۱ تا ۳ آمده است.



شکل ۱- اثر یون‌های فلزی با غلظت ۲ mM بر فعالیت آنزیم تریپسین (A) و کیموتریپسین (B) بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O.mykiss*). حروف کوچک غیرمشترک بیانگر اختلاف معنی‌دار در فعالیت نسبی آنزیم می‌باشد ($Mn \pm SD$ ،$n = ۳$ ،$\alpha = ۰/۰۵$)



شکل ٢- اثر سورفاکتانت‌ها (سدیم کولات، ساپونین و اسید تاروکولیک با غلظت ١ درصد) و عوامل اکسید کننده (پراکسید هیدروژن با غلظت ١٥ درصد و سدیم پربورات با غلظت ١ درصد) بر فعالیت آنزیم تریپسین (A) و کیموتریپسین (B) بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O.mykiss*). حروف کوچک غیرمشترک بیانگر اختلاف معنی‌دار در فعالیت نسبی آنزیم می‌باشد (α = ٠/٠٥، n = ٣، Mn ± SD)



شکل ٣- اثر مهارکننده‌های آنزیمی بر فعالیت آنزیم تریپسین (A) و کیموتریپسین (B) بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O.mykiss*). حروف کوچک غیرمشترک بیانگر اختلاف معنی‌دار در فعالیت نسبی آنزیم می‌باشد (α = ٠/٠٥، n = ٣، Mn ± SD)

اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان در شکل ۱ (A و B) نشان داده شده است. اثر یون‌های K^+ و Na^+ بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین اختلاف معنی‌داری را با نمونه شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵). یون‌های Ca^{2+} و Mg^{2+} باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین نسبت به نمونه شاهد گردیدند (P<۰/۰۵). فعالیت آنزیم تریپسین در حضور Mg^{2+} به‌طور معنی‌داری بیشتر از Ca^{2+} بود (P<۰/۰۵). در حالی‌که فعالیت آنزیم کیموتریپسین اختلاف معنی‌داری را بین یون‌های Ca^{2+} و Mg^{2+} نشان نداد (P<۰/۰۵). یون‌های Mn^{2+}، Cu^{2+}، Ba^{2+}، Co^{2+}، Fe^{2+}، Zn^{2+} و Al^{3+} باعث کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین نسبت به نمونه شاهد گردیدند (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که بین یون‌های Cu^{2+}، Zn^{2+}، Fe^{2+}، Al^{3+} و بین یون‌های Co^{2+} و Ba^{2+} اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم تریپسین مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). فعالیت آنزیم کیموتریپسین در حضور یون‌های Zn^{2+}، Ba^{2+}، Al^{2+} و در بین یون‌های Mn^{2+} و Co^{2+} کاهش معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

در شکل ۲ اثر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده بر فعالیت آنزیم تریپسین (A) و کیموتریپسین (B) نشان داده شده است. سورفاکتانت‌های ساپونین و اسید تاروکولیک باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم تریپسین نسبت به نمونه شاهد گردیدند (P<۰/۰۵) ولی بین ساپونین و اسید تاروکولیک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). سدیم کولات باعث افزایش فعالیت آنزیم تریپسین در مقایسه با نمونه شاهد گردید ولی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). عوامل اکسیدکننده شامل پراکسید هیدروژن و سدیم پربورات باعث کاهش فعالیت آنزیم تریپسین نسبت به نمونه شاهد گردیدند به‌طوری که پراکسید هیدروژن در مقایسه با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵) در حالی‌که بین سدیم پربورات و نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

سورفاکتانت‌های سدیم کولات، ساپونین و اسید تاروکولیک باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم کیموتریپسین نسبت به نمونه شاهد گردیدند (P<۰/۰۵) به طوری‌که اسید تاروکولیک نسبت به سدیم کولات و ساپونین افزایش معنی‌داری بر روی فعالیت آنزیم کیموتریپسین نشان داد (P<۰/۰۵). ولی بین سدیم کولات و ساپونین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). سدیم پربورات اثر کاهشی معنی‌داری بر روی فعالیت آنزیم کیموتریپسین نسبت به نمونه شاهد نشان نداد (P>۰/۰۵) ولی پراکسید هیدروژن نسبت به نمونه شاهد بر روی فعالیت آنزیم کیموتریپسین کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین در شکل ٣ (A و B) نشان داده شده است. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم تریپسین نسبت به نمونه شاهد در حضور مهارکننده‌های SBTI، TLCK، PMSF و پارا آمینوبنزآمیدین کاهش معنی‌داری دارد (P<٠/٠٥). به‌طوری که بین SBTI و TLCK اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ولی این مهارکننده‌ها نسبت به PMSF و پارا آمینوبنزآمیدین کاهش معنی‌داری را نشان دادند (P>٠/٠٥). مهارکننده‌های TPCK، پپاستاتین A، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول بر روی فعالیت آنزیم تریپسین در مقایسه با نمونه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان ندادند (P>٠/٠٥).

فعالیت آنزیم کیموتریپسین در مقایسه با نمونه شاهد در حضور مهارکننده‌های SBTI، PMSF، پارا آمینوبنزآمیدین، TPCK، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<٠/٠٥). به‌طوری‌که بین SBTI و PMSF و بین پارا آمینوبنزآمیدین، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P>٠/٠٥). مهارکننده‌های TLCK و پپاستاتین A بر روی فعالیت آنزیم کیموتریپسین در مقایسه با نمونه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان ندادند (P>٠/٠٥).

بحث

مهارکننده‌های آنزیمی ترکیباتی شبه سوبسترا بوده که می‌توانند با جایگاه فعال آنزیم واکنش داده و از اتصال سوبسترای حقیقی با آن جلوگیری نمایند و باعث غیرفعال شدن آنزیم شوند (گارسیا کارنو، ١٩٩٢). مهارکننده‌ها در گونه‌های مختلف ماهیان اثرات بازدارندگی متفاوتی دارند که می‌تواند با محیط زندگی و مسایل ژنتیکی ماهیان در ارتباط باشد (لو و همکاران، ٢٠٠٨). مهارکننده‌های اختصاصی آنزیم تریپسین شامل SBTI و TLCK و مهارکننده اختصاصی آنزیم کیموتریپسین شامل TPCK و همچنین مهارکننده‌های پروتئاز سرین شامل PMSF و پاراآمینوبنزآمیدین و سایر مهارکننده‌ها شامل پپاستاتین A، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول دارای اثر مهارکنندگی روی آنزیم تریپسین و کیموتریپسین در بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان بودند. نتیجه این مطالعه با مطالعات انجام شده در ماهیان ساردین مونتری (کاستیلو یانز و همکاران، ٢٠٠٥)، آزاد چینوک (کورتوویچ و همکاران، ٢٠٠٦)، ساردین (بوگاتف و همکاران، ٢٠٠٧)، سرخو (خانتافات و بنجاکول، ٢٠١٠)، تامباکویی (مارکوشی

و همکاران، ۲۰۱۰)، موجارا نقره‌ای (سیلوا و همکاران، ۲۰۱۱)، زبرا بلنی (کتاری و همکاران، ۲۰۱۲)، ماهی مرکب (بالتی و همکاران، ۲۰۱۲) و کیلکای معمولی (زمانی و همکاران، ۲۰۱٤) همخوانی داشت.

یون‌های فلزی شامل کلسیم و منیزیم باعث افـزایش فعالیـت آنـزیم تریپسـین و کیموتریپسـین در بچه‌ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان گردیدند. یافته‌های مربوط به اثر کلسیم و منیزیم بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین با مطالعات انجام شده در ماهیان تن (کلاومکلاو و همکاران، ۲۰۰٤)، ساردین (*S. melanostictus*) و گرینلینـگ (*P.azonus*) (کیشـیمورا و همکـاران، ۲۰۰٦)، مانـدارین (لـو و همکارانش، ۲۰۰۸)، زبرا بلنی (کتاری و همکاران، ۲۰۱۲)، ماهی مرکب (بـالتی و همکـاران، ۲۰۱۲) و کیلکای معمولی (زمانی و همکاران، ۲۰۱٤) همخوانی دارد. در ارتباط با اثر یون‌های فلزی بر فعالیـت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین باید اشاره نمود که آن‌ها می‌توانند به‌عنوان کوفاکتور در افزایش فعالیـت آنزیمی ایفای نقش کرده و یا در برخی موارد باعـث کـاهش فعالیـت آنـزیم شـوند کـه در ایـن بـین، کاتیون‌های دو ظرفیتی نقش مؤثرتری بر فعالیت آنزیم تریپسین دارند به‌طوری که یـون‌هـای کلسـیم و منیزیم باعث افزایش فعالیت آن می‌شوند در حالی‌که برخی مانند جیوه، مس، نقـره و روی از فعالیـت آنزیم جلوگیری می‌نمایند (گرین و نوراث، ۱۹۵۳). فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین تحـت تأثیر یون‌های مس، روی، منگنز، باریم، کبالت، آهن و آلومینیوم کاهش یافت. چنین نتایجی توسط لو و همکاران (۲۰۰۸) در ماهی ماندارین، علی و همکاران (۲۰۰۹) در شـانک مخطـط، بـالتی و همکـاران (۲۰۱۲) در ماهی مرکب، کتـاری و همکـاران (۲۰۱۲) در زبـرا بلنـی، زمـانی و همکـاران (۲۰۱٤) در کیلکای معمولی نیز گزارش گردید.

یون‌های فلزی می‌توانند جریان الکترون در یک سوبسترا یا آنزیم را تغییر دهند، به‌طوری که به‌طور مؤثری واکنش کاتالیز شده توسط آنزیم را کنترل نمایند. یون‌های فلزی ممکـن اسـت بـه گـروه‌هـای کربونیل و آمین زنجیره اصلی متصل شـوند، امـا اتصـال ویـژه از طریـق زنجیـره جـانبی اسـید آمینـه مخصوصاً گروه کربوکسیلات اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک و حلقه اتم نیتروژن هیسـتیدین انجـام می‌شود. از دیگر زنجیره‌های جانبی برای اتصال یون‌های فلزی می‌توان به تریپتوفان (حلقـه نیتـروژن)، سیستئین (تیول)، متیونین (thioether)، سرین، ترئونین، تیـروزین (گـروه هیدروکسـیل)، آسـپاراژین و گلوتامین (گروه کربونیل، و در برخی موارد گروه آمین) اشاره نمود. محیط الکترواسـتاتیک در جایگـاه فعال آنزیم یک عامل عمده برای هدایت سوبسترا به جایگاه اتصال در جهت صحیح خـود اسـت کـه

یون‌های فلزی می‌توانند در این روند شرکت نموده و در نتیجه به کنترل عمل آنزیم کمک نمایند (گلاسکر و همکاران، ١٩٩٩).

تأثیر سورفاکتانت‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین در بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان با نتایج به‌دست آمده در ماهیان تریگر خاکستری (جلولی و همکاران، ٢٠٠٩)، تامباکویی (اسپوزیتو و همکاران، ٢٠٠٩)، زبرا بلنی (کتاری و همکاران، ٢٠١٢) و کیلکای معمولی (زمانی و همکاران، ٢٠١٤) همخوانی دارد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که سورفاکتانت‌ها در غلظت‌های بالا باعث دناتوره شدن آنزیم‌ها می‌شوند ولی در غلظت‌های پایین تغییری در ساختار آنزیم ایجاد نکرده و حتی می‌توانند باعث افزایش جزیی در فعالیت آنزیم نیز شوند. احتمالا این امر می‌تواند به‌دلیل تجمع این ترکیبات در مکان‌هایی از آنزیم که حاوی انرژی بالایی هستند رخ دهد. ولی در غلظت‌های بالای سورفاکتانت، به‌دلیل دناتوره شدن ساختار آنزیم افت قابل توجهی در فعالیت آنزیم مشاهده می‌شود (روبینگ، ١٩٩٦). نتایج این مطالعه نشان داد که آنزیم تریپسین و کیموتریسپین در حضور عوامل اکسیدکننده (سدیم پربورات و پراکسید هیدروژن) ناپایدار بوده و از فعالیت آن کاسته شد. چنین نتایجی در ماهیان تریگر خاکستری (جلولی و همکاران، ٢٠٠٩)، تامباکویی (اسپوزیتو و همکاران، ٢٠٠٩)، زبرا بلنی (کتری و همکاران،٢٠١٢) و کیلکای معمولی (زمانی و همکاران، ٢٠١٤) نیز گزارش گردید. تحقیقات نشان داده‌اند که بسیاری از پروتئازها در حضور عوامل اکسیدکننده مانند پراکسید هیدروژن (جلولی و همکاران، ٢٠٠٩) ناپایدار هستند. عوامل اکسیدکننده، ترکیباتی هستند که می‌توانند با گروه‌های تیول در آنزیم‌ها و پروتئین‌ها واکنش بسیار قوی داشته باشند. بسیاری از عوامل اکسیدکننده می‌توانند با تشکیل رادیکال‌های آزاد باعث اکسیدشدن پروتئین شوند که این امر در ابتدا با جذب اتم هیدروژن موجود در کربن آلفا پروتئین صورت می‌گیرد و سرانجام منجربه دناتوره شدن آن می‌شود (فینگان و همکاران، ٢٠١٠).

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان کرد که فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین بچه‌ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها، عوامل اکسیدکننده و مهارکننده‌های آنزیمی در حداقل غلظت شان بوده و بنابراین توجه به مسائل زیست‌محیطی و کنترل آلودگی می‌تواند در رشد بهینه بچه ماهیان مؤثر باشد.

منابع

1. Ali, N.E.H., Hmidet, N., Bougatef, A., Nasri, R. and Nasri, M. 2009. A Laundry Detergent-Stable Alkaline Trypsin from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: Purification and Characterization. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 57: 10943-10950.
2. Balti, R., Bougherra, F., Bougatef, A., Hayet, B.K., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Guillochon, D. and Nasri, M. 2012. Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates: Purification and biochemical characterization. Food Chemistry. 130: 475-484.
3. Bougatef, A., Souissi, N., Fakhfakh, N., Ellouz-Triki, Y. and Nasri, M. 2007. Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). Food Chemistry. 102: 343-350.
4. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
5. 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 and Biochemistry physiology B. 140: 91-98.
6. Erlanger, B., Kokowsky, N. and Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics. 95: 271-278.
7. Esposito, T.S., Amaral, I.P.G., Buarque, D.S., Oliveira, G.B., Carvalho, L.B. and Bezerra, R.S. 2009. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry*. 112: 125-130.
8. Finnegan, M., Linley, E., Denyer, S.P., McDonnell, G., Simons, C. and Maillard, J.Y. 2010. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. Journal of Antimicrobial Chemother. 65: 2108-2115.
9. Garcia-Carenno F.L. 1992. Protease inhibition in theoty and practice. Biotechnology Education. 3(4): 145-150.
10. Ghovati, N., Mohammadi, S. and Mohammadi, V. 2012. Assessment of hardness and alkalinity changes in comparison to toxicity of zinc in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Talab, Islamic Azad University, Ahvaz Branch, 8:21-28.
11. Glusker, J.P., Katz, A.K. and Bock, C.W. 1999. Metal ions in biological systems. The Rigaku Journal. 16(2): 8-17.
12. Green, N.M. and Neurath, H. 1953. The effects of divalent cations on trypsin. The Journal of Biological Chemistry. 204: 379-390.
13. Iranian fisheries organization statistical yearbook. 2013. 64p.

14. 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.
15. 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.
16. Kishimura, H., Hayashi, K., Miyashita, Y. and Nonami, Y. 2006. Characterization of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric caeca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). Food Chemistry. 97: 65-70.
17. Klomklao, S., Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2004. Comparative studies on proteolytic activities of splenic extract from three tuna species commonly used in Thailand. Journal of Food Biochemistry. 28: 355-372.
18. Ktari, N., Ben Khaled, H., Nasri, R., Jellouli, K., Ghorbel, S. and Nasri, M. 2012. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. Food Chemistry. 130: 467-474.
19. Kurtovic, I., Marshall, S.N. and Simpson, B.K. 2006. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Comparative Biochemistry and Physiology B. 143: 432-440.
20. Lu, B.J., Zhou, L.G., Cai, Q.F., Hara, K., Maeda, A., Su, W.J. and Cao, M.J. 2008. Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). Food Chemistry. 110: 352-360.
21. Marcuschi, M., Espósito, T.S., Machado, M.F.M., Hirata, I.Y., Machado, M.F.M., Silva, M.V., Carvalho, L.B., Oliveira, V. and Bezerra, R.S. 2010. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). Biochemical and Biophysical Research Communications. 396: 667-673.
22. Naji, T., Khara, H., Rostami, M. and Nasiri Parman, E. 2009. Effect of ammonia toxicity on the liver of common carp (*Cyprinus carpio*). Environmental Sciences and Technology. 11: 131-148.
23. Rosen, M.J. and Kunjappu, J.T. 2012. Surfactants and Interfacial Phenomena (4th ed.). Hoboken, New Jersey, John Wiley and Sons. 576p.
24. Rubingh, D.N. 1996. The influence of surfactants on enzyme activity. Current Opinion in Colloids and Interface Science. 1(5): 598-603.
25. Shahsavani, D., Mehri, M. and Nazari, K. 2003. Assessment of anionic detergent (shampoo) effect on hematological parameters of Carassius auratus. *Journal of Pajoohesh and Sazandegi* - Animal and Aquaculture. 61: 99-103.

26. Silva, J.F., Esposito, T.S., Marcuschi, M., Ribeiro, K., Cavalli, R.O., Oliveira, V. and Bezerra, R.S. 2011. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). Food Chemistry. 129: 777-782.
27. Zamani, A., Rezaei, M., Madani, R. and Habibi Rezaie, M. 2014. Trypsin Enzyme from Viscera of Common Kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*): Purification, Characterization, and Its Compatibility with Oxidants and Surfactants. Journal of Aquatic Food Product Technology. 23: 237-252.