

Extraction and purification of lipase (EC 3.1.1.3) from the Skipjack intestine (*Katsuwonus pelamis*)

Zabihollah Bahmani^{*1}, Bahram Kazemi Demeneh²

1. Corresponding Author, Persian Gulf and Sea of Oman Ecology Research Center, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Bandar Abbas, Iran. E-mail: zabihbahmani@gmail.com
2. Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. E-mail: bahram_14@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 08.27.2023
Revised: 09.05.2023
Accepted: 09.23.2023

Keywords:
Filtration,
Intestinal Lipase Enzyme (ILE),
Ion exchange,
Katsuwonus pelamis,
Molecular weight

ABSTRACT

About 7 to 8% of the body weight of tuna fish is the digestive tract and it is an economic source for lipase enzyme extraction. Enzyme extraction was done using Tris hydrochloride buffer (25 mM with pH; 7.8). Then the crude extract was precipitated and dialyzed in the range of saturation between 30, 45 and 60% ammonium sulfate. For further purification, ion exchange chromatography using a DEAE-CMC column with dimensions (2.5 × 30 cm) and gel filtration chromatography using a Sephadex G-100 column (1.8 × 80 cm) were used. Purified lipase enzymes obtained by precipitation with ammonium sulfate 30, 45 and 60%, respectively, have molecular weight (68.3, 38.41, and ND kDa), pH (7.1, 6.9, and 7.4), The optimal temperature (55, 42 and 38 °C) and specific enzyme activity (3.42, 2.8 and 1.4 U/mg) were using paranitrophenyl palmitate (pNPP) as a substrate. The results indicate the possibility of extracting and purifying lipase enzyme from the digestive system of aquatic animals with suitable biochemical characteristics for use in chemical and food industries.

Cite this article: Bahmani, Zabihollah, Kazemi Demeneh, Bahram. 2024. Extraction and purification of lipase (EC 3.1.1.3) from the Skipjack intestine (*Katsuwonus pelamis*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (3), 115-128.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/japu.2023.21688.1812

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

استخراج و تخلیص آنزیم لیپاز (EC 3.1.1.3) از روده ماهی هوور مسقطی (*Katsuwenus pelamis*)

ذبیح‌اله بهمنی^{۱*}، بهرام کاظمی دمنه^۲

۱. نویسنده مسئول، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران. رایانامه: zabihbahmani@gmail.com

۲. مرکز تحقیقات زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. رایانامه: bahram_14@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	حدود ۷ تا ۸ درصد وزن بدن تون ماهیان را مجاری گوارشی تشکیل می‌دهد و به‌عنوان یک منبع اقتصادی برای استخراج آنزیم لیپاز می‌باشد. استخراج آنزیم با استفاده از بافر تریس هیدروکلرید (۲۵ میلی‌مولار با pH: ۷/۸)، انجام شد. سپس عصاره خام در محدوده اشباع بین ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درصد سولفات آمونیوم رسوب کرده و دیالیز گردید. برای خالص‌سازی بیش‌تر از کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از ستون DEAE-Cellulose با ابعاد (۳۰ × ۲/۵ سانتی‌متر) و کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل توسط ستون Sephadex G-100 (۱/۸ × ۸۰ سانتی‌متر) استفاده شد. آنزیم‌های لیپاز خالص شده حاصل از ترسیب با سولفات آمونیوم ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درصد به‌ترتیب دارای وزن مولکولی (۶۸/۳، ۳۸/۴۱ و ND کیلودالتون)، pH (۷/۱، ۶/۹ و ۷/۴)، دمای بهینه (۵۵، ۴۲ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد) و فعالیت ویژه آنزیمی (۳/۴۲، ۲/۸ و ۴/۱ U/mg) با استفاده از پارانیتروفنیل پالمیتات (pNPP) به‌عنوان سوبسترا بود. نتایج بیانگر امکان استخراج و تخلیص آنزیم لیپاز از دستگاه گوارش آبزیان با ویژگی‌های بیوشیمیایی مناسب جهت استفاده در صنایع شیمیایی و غذایی می‌باشد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۵	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۴	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱	
واژه‌های کلیدی:	
آنزیم لیپاز روده، تبادل یونی، فیلتراسیون، وزن مولکولی، هوور مسقطی	

استناد: بهمنی، ذبیح‌اله، کاظمی دمنه، بهرام (۱۴۰۳). استخراج و تخلیص آنزیم لیپاز (EC 3.1.1.3) از روده ماهی هوور مسقطی (*Katsuwenus pelamis*). نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۳ (۳)، ۱۱۵-۱۲۸.

DOI: 10.22069/japu.2023.21688.1812



© نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

آمیلاز، پروتئاز و لیپاز از انواع آنزیم‌ها به‌ویژه آنزیم‌ها تجاری مانند کپور معمولی (۵ و ۶)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (۷)، ساردین و کیلکای معمولی (۸ و ۹)، زرده، تون باله آبی و گیدر (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴)، کفال خاکستری (۱۵ و ۱۶)، تیلاپیا (۱۷ و ۱۸) و سپر ماهی دم‌گزنده (۱۹)، به‌دلیل تمرکز محل جمع‌آوری ضایعات حاصل از عمل‌آوری و فرآوری آن‌ها، به‌عنوان منابع اولیه تولید آنزیم صورت گرفت. مطالعات انجام شده بر روی لیپاز ماهی نشان می‌دهد که آن‌ها ممکن است واکنش‌های متفاوتی نسبت به اسیدهای چرب موجود در پستانداران، گیاهان و میکروب‌ها داشته باشند، زیرا لیپاز ماهی به‌طور فعال در تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع با زنجیره بلند و هم‌چنین مزیت ویژه این نوع از آنزیم‌ها این است که در طیف وسیعی از pH و دما عمل می‌کند و نیازی به مواد کمکی ندارد. محصولات جانبی بافت‌های ماهی مانند سر و ستون فقرات، امعاء و احشاء، پوست و به‌ویژه غدد گوارشی منبع غنی انواع آنزیم‌هایی پتیدی مانند لیپاز هستند. با این‌حال، مطالعات متمرکز بر خالص‌سازی لیپازهای آنزیم بسیار محدودتر به‌نظر می‌رسد (۲۰). با توجه به اهمیت اقتصادی لیپاز این مطالعه با هدف شناسایی شرایط بهینه استخراج و خالص‌سازی آنزیم از روده هورور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) و تعیین برخی از خصوصیات بیوشیمیایی آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

استخراج آنزیم: مجرای گوارشی ماهی هورور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) به مقدار (20 ± 325) g از کارخانه تون ماهی ساحل بندرعباس تهیه و همراه با یخ به آزمایشگاه فرآوری آنزیم پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان منتقل شد.

آنزیم‌ها، کاتالیزورهای زیستی هستند که در شرایط مناسب دمایی، pH و سوبسترا، واکنش‌هایی را که در آن شرکت می‌کنند به‌صورت تخصصی تسریع می‌کنند. علاوه بر این، آنزیم‌ها برای افزایش کیفیت محصولات، کاهش هزینه‌های تولید و تأثیر کم‌تر بر محیط‌زیست کار می‌کنند و در نتیجه استفاده از آنزیم‌ها در زمینه‌های کاربردی افزایش می‌یابد. آنزیم‌های لیپاز اولین بار در سال ۱۹۵۶ توسط کلود برنارد زمانی که نقش پانکراس را در هضم چربی مطالعه کرد، کشف شد (۱). آنزیم‌های لیپاز بر روی هیدرولیز چربی‌ها و روغن‌ها به اجزای آن‌ها گلیسرول و اسیدهای چرب کار می‌کنند. لیپاز (تری‌آسیل گلیسرول آسید هیدرولاز، EC 3.1.1.3) هیدرولیز پیوندهای کربوکسیل استری در تری گلیسرول‌ها را کاتالیز می‌کند تا دی‌آسیل گلیسرول، اسیدهای چرب مونوآسیل گلیسرول و گلیسرول در شرایط آبی و سنتز استرها (۲) در حلال‌های آلی تولید کند. با توانایی آن در تحریک هیدرولیز پیوندهای آبی در سطح مشترک ماده نامحلول و فاز آبی که در آن آنزیم حل می‌شود مشخص می‌شود، هم‌چنین توانایی معکوس کردن واکنش‌ها با حضور حلال‌های آلی را دارد، به‌طوری‌که باعث تبادل استرها یا گروه‌های استیل بین استیل گلیسرول، الکل‌ها، استرها و آمین‌های مختلف می‌شود (۳). آنزیم‌های لیپاز در صنایع غذایی و کاتالیزورهای بیولوژیکی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. لیپاز در صنایع غذایی، نقش اصلی را به‌عنوان کاتالیزور فرآیندهای بیولوژیکی ایفا می‌کنند و ایمن‌تر و سازگارتر با محیط زیست هستند. در چند دهه گذشته به‌دلیل عملکرد مفید آن در فرآوری و بهبود کیفیت محصولات، به‌طور فزاینده‌ای در تولید مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است (۴). در دو دهه اخیر، مطالعات زیادی بر استخراج و تخلیص آنزیم‌های



شکل ۱- روده جمع‌آوری و شسته شده جهت استخراج آنزیم لیپاز.

فرآیند استخراج طبق روش مورسی و اوکادا (۲۱) انجام شد. در ابتدا با استون سرد شده برای حذف چربی و هرگونه مواد ناخواسته دیگر استفاده شد. مجرای گوارش تازه توسط بافر استخراج با pH: ۷/۸ (۲۵ میلی‌مولار تریس هیدروکلراید (Tris-HCl)، بنزآمیدین، گلیسرول و اتیلین دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)) با نسبت (۳:۱) مخلوط شد، به مدت ۱ ساعت همگن شد، قطعات بزرگ توسط کاغذ فیلتر (Wathman, No 2, Merck, Germany) شدند و در ۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا حذف شوند. قطعات درشت مایع رویی به‌عنوان عصاره خام تعیین شد.

تخلیص آنزیمی: برای رسوب آنزیم خام از سولفات آمونیوم ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درصد اشباعیت استفاده شد. این فرآیند در دمای ۲ تا ۴ درجه سانتی‌گراد توسط همزن مغناطیسی (M.J54, Pars Azma, Iran) به مدت ۱ ساعت ادامه داشت. پس از آن، مخلوط در ۱۰۰۰۰ گرم به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (Centrifuge 5010 R, eppendorf, Germany) شد، با دقت مایع رویی دور ریخته شد آنزیم رسوب سولفات آمونیوم در برابر بافر فسفات پتاسیم (۰/۲ مولار و pH: ۷) به مدت ۲۴ ساعت در شرایط سرد (2 ± 4 سانتی‌گراد) دیالیز (D۱۲۴۰۰, Sigma Alderich, USA) شد. ستون تهیه شد. سوسپانسیون با بافر فسفات پتاسیم ۰/۲

DEAE - Cellulose-A50، با ابعاد (۲/۵ × ۳۰)، مطابق دستورالعمل شرکت GE Healthcare تهیه شد، که در آن ۴ گرم پودر خشک (DEAE - Cellulose) در بافر فسفات پتاسیم (۰/۲ مولار با pH: ۷) معلق شد (۲۱). پس از تعادل ستون، آنزیم غلیظ به آرامی بر روی سطح دانه‌های سلولزی اعمال شد. ستون توسط بافر فسفات پتاسیم شسته شد تا پروتئین‌های غیرقابل اتصال از آن عبور کنند. کلکتور فراکشن برای جمع‌آوری ۳ میلی‌لیتر برای هر بخش با سرعت جریان ۴۰ میلی‌لیتر در ساعت تنظیم شد. شستشو با استفاده از گرادیان نمکی (۰/۱ تا ۱ مولار حل شده در محلول بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار با pH: ۷) در حال افزایش پیوسته برای آزادسازی سایر پروتئین‌های محدود شده به ستون به دست می‌آید، سنجش فعالیت لیپاز با استفاده سنجش میزان جذب و فعالیت آنزیمی هر فراکسیون در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (CECIL Elegant Technology, England) اندازه‌گیری شد. فراکسیون‌های دارای فعالیت آنزیمی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای مرحله بعدی تصفیه نگهداری شدند. از Sephadex G-100 برای تهیه ستون فیلتراسیون ژل (با ابعاد ۱/۸ × ۸۰ سانتی‌متر) استفاده شد که طبق دستورالعمل GE Healthcare تهیه شد. سوسپانسیون با بافر فسفات پتاسیم ۰/۲

فرآیند استخراج طبق روش مورسی و اوکادا (۲۱) انجام شد. در ابتدا با استون سرد شده برای حذف چربی و هرگونه مواد ناخواسته دیگر استفاده شد. مجرای گوارش تازه توسط بافر استخراج با pH: ۷/۸ (۲۵ میلی‌مولار تریس هیدروکلراید (Tris-HCl)، بنزآمیدین، گلیسرول و اتیلین دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)) با نسبت (۳:۱) مخلوط شد، به مدت ۱ ساعت همگن شد، قطعات بزرگ توسط کاغذ فیلتر (Wathman, No 2, Merck, Germany) شدند و در ۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا حذف شوند. قطعات درشت مایع رویی به‌عنوان عصاره خام تعیین شد.

تخلیص آنزیمی: برای رسوب آنزیم خام از سولفات آمونیوم ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درصد اشباعیت استفاده شد. این فرآیند در دمای ۲ تا ۴ درجه سانتی‌گراد توسط همزن مغناطیسی (M.J54, Pars Azma, Iran) به مدت ۱ ساعت ادامه داشت. پس از آن، مخلوط در ۱۰۰۰۰ گرم به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (Centrifuge 5010 R, eppendorf, Germany) شد، با دقت مایع رویی دور ریخته شد آنزیم رسوب سولفات آمونیوم در برابر بافر فسفات پتاسیم (۰/۲ مولار و pH: ۷) به مدت ۲۴ ساعت در شرایط سرد (2 ± 4 سانتی‌گراد) دیالیز (D۱۲۴۰۰, Sigma Alderich, USA) شد. ستون

(Thermoblock B-516 H, ASTEK, England) جوشانده شد. نمونه بر روی ژل‌های ۴ درصد انباشته و ۱۲ درصد جداکننده بارگذاری شد و تحت الکتروفورز قرار گرفت. ژل‌ها متعاقباً رنگ‌آمیزی و نگهداری شدند (۲۳).

سنجش فعالیت آنزیمی: برای سنجش فعالیت آنزیم لیپاز، ۱ میلی‌لیتر محلول سوپسترا (۱/۶۵ mM) پارانیتروفنیل پالمیتات (Sigma, USA) در ایزوپروپانول، ۹ میلی‌لیتر بافر (۵۰ mM) تریس-هیدروکلرید با pH ۸، ۱۰ درصد تریتون X-100 و ۲۰ mM (pNPP) و ۲۰ μL نمونه آنزیمی مخلوط شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر (CECIL Elegant Technology, England) در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت انجام گرفت (۲۴).

مولار در ۷ pH؛ رقیق شد و با یک میله شیشه‌ای همزده شد تا یک سوسپانسیون همگن ساخته شود. ستون با استفاده از همان بافر با سرعت جریان ۴۰ میلی‌لیتر در ساعت به مدت ۵ ساعت متعادل شد. پس از آماده‌سازی ستون، ۳ میلی‌لیتر از محلول آنزیم به آرامی به سطح ستون اضافه شد و با استفاده از بافر ۰/۲ مولار فسفات پتاسیم ۷ pH؛ با سرعت جریان ۴۰ میلی‌لیتر در ساعت شسته شد. چگالی نوری (در طول موج ۲۸۰ نانومتر)، و فعالیت آنزیم برای هر بخش تعیین شد. فراکسیون‌های نشان‌دهنده فعالیت جمع شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین وزن مولکولی لیپاز: SDS-PAGE بر اساس روش لاملی (۲۲) انجام شد. محلول آنزیم با بافر نمونه ۰/۱۲۵ مولار تریس هیدروکلرید (Tris-HCl)، ۶/۸ pH؛ ۴ درصد SDS؛ ۲۰ درصد گلیسرول؛ ۱۰ درصد βME مخلوط و به مدت ۳ دقیقه توسط

$$(1) \quad \text{فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز (U/mg)} = \frac{\text{حجم مخلوط واکنش (ml)} \times 1000 \times \text{میزان جذب}}{17500 \times (\text{min}) \times \text{زمان واکنش (mg/ml)}} \times \text{میزان پروتئین}$$

درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید و در پایان دوره انکوباسیون نمونه آنزیمی به سرعت سرد شد و با مخلوط سوپسترا- بافر ترکیب و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد سپس در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد (۲۴).

فعالیت نسبی آنزیم در دماهای مختلف به روش زیر محاسبه می‌شود:

تعیین دمای بهینه و پایداری برای فعالیت لیپاز: محلول سوپسترا و بافر را با نمونه آنزیمی ترکیب کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دماهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد و برای تعیین دمای پایداری ابتدا نمونه آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در دماهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰

$$(2) \quad \text{فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در نمونه حرارت داده (\%)} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در نمونه شاهد}}{\text{فعالیت نسبی (\%)}}$$

کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در pHهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲، در گرمخانه نگهداری شد سپس قرائت نوری توسط اسپکتروفتومتر (CECIL Elegant Technology,)

تعیین pH بهینه و پایداری برای فعالیت لیپاز: برای تعیین pH بهینه ابتدا، محلول سوپسترا (pNPP) و بافر (Tris-HCl, Triton 100) را با نمونه آنزیمی ترکیب

شد سپس در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد (۲۴).
فعالیت نسبی آنزیم در دماهای مختلف به روش زیر
محاسبه می‌شود.

فعالیت نسبی آنزیم در pHهای مختلف به روش
زیر محاسبه می‌شود:

(England) در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد.
هم‌چنین جهت تعیین pH پایداری ابتدا نمونه آنزیم
به مدت ۳۰ دقیقه در pHهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲،
انکوباسیون گردید و در پایان دوره انکوباسیون نمونه
آنزیمی با مخلوط سوبسترا- بافر ترکیب و به مدت
۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون

$$(۳) \quad \text{فعالیت اختصاصی آنزیم لپاز در pH های مختلف} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم لپاز در نمونه شاهد}}{\text{فعالیت نسبی (\%)}}$$

عصاره خام (۱۵/۶، ۰/۴۵، ۱ و ۱)، ILE30 (۶/۳)،
۳/۴۲، ۰/۲۴۷ و ۷/۶، ILE45 (۱/۵، ۲/۸، ۰/۰۵۶ و
۶/۲) و ILE60 (۴/۴۵، ۴/۱، ۰/۲۷۱ و ۹/۱۱) گزارش
شد. میزان بازده و تخلیص در مورد آنزیم‌های لپاز
روده داری روند افزایشی بوده و تفاوت بین سه تیمار
معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشد. شکل ۲، افزایش حجم
عصاره آنزیمی استخراج و تخلیص شده، هم‌چنین
افزایش فعالیت ویژه لپاز روده هوور مسقطی با
افزایش درصد سولفات آمونیوم در سه تیمار ILE30،
ILE45 و ILE60 را نشان می‌دهد به نحوی که
بیش‌ترین حجم استخراج و بالاترین فعالیت آنزیمی،
در تیمار ILE60 مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها
با استفاده از نرم‌افزار SPSS V22 و آزمون‌های
One Way Anova و Duncan انجام شد و داده‌ها
به صورت ($M \pm SD, n=3$) گزارش شد.

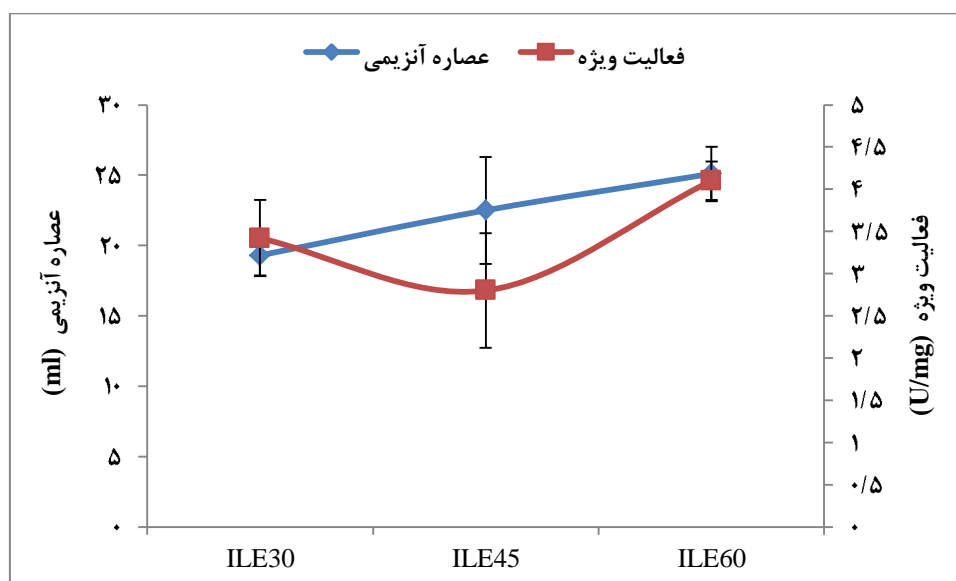
نتایج

استخراج، تغلیظ و خالص‌سازی آنزیم: میزان پروتئین،
فعالیت اختصاصی، بازده استخراج و تخلیص آنزیم
لپاز تولیدشده از روده هوور مسقطی با سولفات
آمونیم ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درصد در جدول ۱، گزارش
شد. میزان پروتئین (mg/ml)، فعالیت اختصاصی
(U/mg)، بازده (درصد) و مقدار تخلیص به ترتیب در

جدول ۱- ویژگی‌های شیمیایی، درصد بازده استخراج و تخلیص لپاز روده (ILE) هوور مسقطی.

مراحل تخلیص	حجم (ml)	پروتئین (mg/ml)	فعالیت اختصاصی (U/mg)	بازده درصد	تخلیص (Fold)
عصاره خام	۲۴۰±۲۴/۶ ^{a*}	۱۵/۶±۱/۳۵ ^a	۰/۴۵±۰/۰۷ ^d	۱ ^a	۱ ^d
آنزیم ۳۰ درصد	۱۹/۳±۰/۶۵ ^c	۶/۳±۰/۲۸ ^a	۳/۴۲±۰/۳۵ ^b	۰/۲۴۷ ^b	۷/۶ ^b
آنزیم ۴۵ درصد	۲۲/۵±۱/۵ ^{bc}	۱/۵±۰/۰۶ ^c	۲/۸±۰/۲۳ ^c	۰/۰۵۶ ^c	۶/۲ ^c
آنزیم ۶۰ درصد	۲۵/۱±۱/۷ ^b	۴/۴۵±۰/۶۱ ^b	۴/۱±۰/۱۷ ^{ab}	۰/۲۷۱ ^{ab}	۹/۱۱ ^a

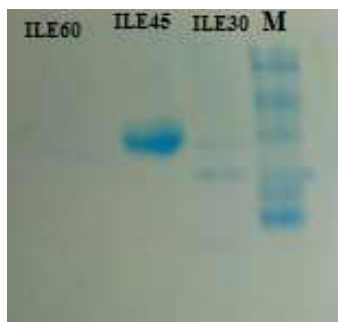
* حروف کوچک بیانگر وجود و یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار ($P < 0/05$) بین عصاره خام، آنزیم لپاز استخراج شده با ۳۰ (ILE30)،
۴۵ (ILE45) و ۶۰ درصد سولفات آمونیوم (ILE60) می‌باشد



شکل ۲- میزان عصاره آنزیمی و فعالیت ویژه آنزیم لیپاز روده با ۳۰ درصد (ILE30)، ۴۵ درصد (ILE45) و ۶۰ درصد سولفات آمونیوم (ILE60).

گزارش شد. وزن مولکولی آنزیم لیپاز روده در ژل ۱۲/۵ درصد، در تیمار ILE30، ۶۸/۳ KDa و ILE45، ۳۸/۴۱ KDa گزارش شد و در مورد لیپاز ILE60 هیچ بانندی در SDS-PAGE مشاهده نشد.

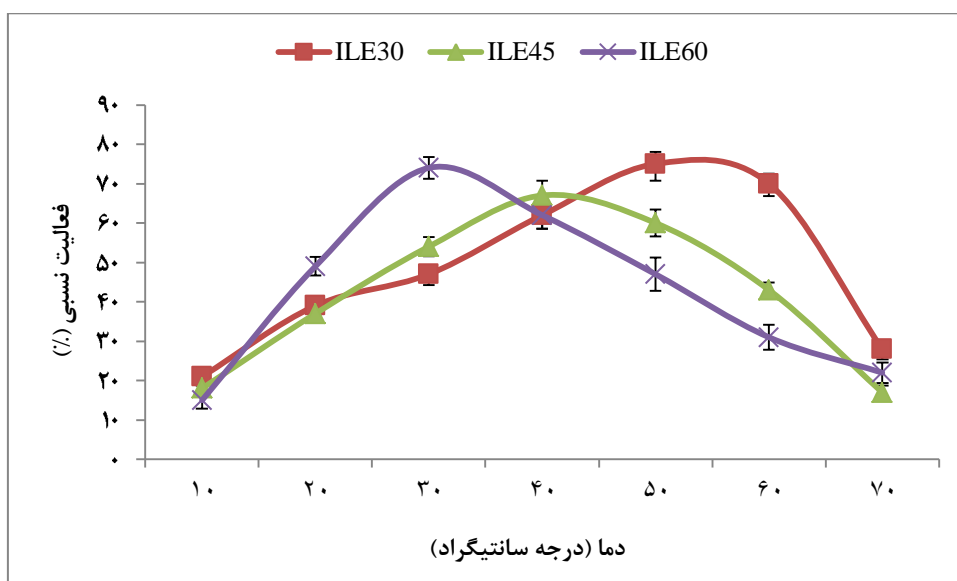
وزن مولکولی لیپاز روده: نتایج وزن مولکولی آنزیم‌های لیپاز (شکل ۳) استخراج شده از روده هورر مسقطی با غلظت‌های ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درصد سولفات آمونیوم با استفاده از SDS-PAGE در شکل ۲،



شکل ۳- وزن مولکولی لیپاز روده (ILE60 و ILE45، ILE30) استخراج و تخلیص شده در ژل پلی اکریل آمید ۱۲/۵ درصد.

دمای بهینه و پایداری لیپاز روده: گزارش شد. آنزیم‌ها در دمای بهینه بیش‌ترین فعالیت از خود نشان می‌دهند. بالاترین دمای بهینه برای آنزیم ILE30 و کم‌ترین دما بهینه متعلق ILE60 بود. یکی از ویژگی‌های بارز این نوع آنزیم‌ها تحمل دمایی در بازه ۳۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که بهترین دما برای فعالیت آنزیم‌ها می‌باشد.

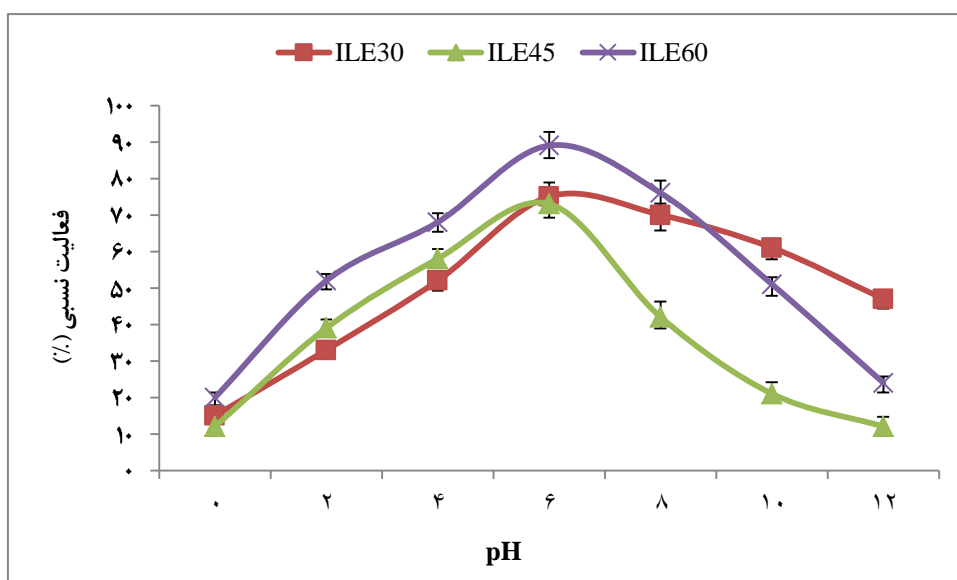
دمای بهینه و پایداری لیپاز روده: نتایج بررسی دمای بهینه و پایداری، آنزیم‌های لیپاز استخراج شده از روده هورر مسقطی در شکل ۴ نشان داده شد. دمای بهینه ILE30، ILE45 و ILE60 به ترتیب ۵۵، ۴۲ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و بازه دمای پایداری ILE30، ILE45 و ILE60 به ترتیب (۵۰-۷۰ °C)، (۳۰-۵۵ °C) و



شکل ۴- فعالیت نسبی لیپاز روده با ۳۰ درصد (ILE30)، ۴۵ درصد (ILE45) و ۶۰ درصد سولفات آمونیوم (ILE60) در دماهای مختلف.

فعالیت آنزیمی در pH کم‌تر از ۳/۵ و بیش‌تر از ۹ به شدت کاهش یافت. با توجه به نتایج، بازه pH بهینه و پایداری برای آنزیم‌های لیپاز روده هوور مسقطی به ترتیب ۶/۹-۷/۴ و ۶-۸/۵ بود.

pH بهینه و پایداری لیپاز روده: شکل ۵ مقادیر pH بهینه و پایداری فعالیت لیپاز روده هوور مسقطی را نشان می‌دهد. میزان pH بهینه و پایداری برای لیپاز روده ILE30، ILE45 و ILE60 به ترتیب (۷/۱)، (۷-۸/۵)، (۶/۹، ۶/۵-۸) و (۶-۸، ۷/۴) گزارش شد.



شکل ۵- فعالیت نسبی لیپاز روده با ۳۰ درصد (ILE30)، ۴۵ درصد (ILE45) و ۶۰ درصد سولفات آمونیوم (ILE60) در pHهای مختلف.

بحث

و تخلیص آنزیم لیپاز تولید شده از روده با سولفات آمونیوم با درصدهای ۳۰، ۴۵ و ۶۰ در جدول ۱، آورده شد. میزان بازده استخراج و تخلیص در مورد آنزیم‌های لیپاز روده با درصد ترسیب ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درصد سولفات آمونیوم به ترتیب برای روده (۰/۲۴۷، ۰/۰۵۶ و ۰/۲۷۱ درصد) دارای روند افزایشی بوده است. بازده استخراج به دلیل افزایش میزان درصد سولفات آمونیوم و در مراحل انتهایی به دلیل افزایش فعالیت آنزیمی دارای روند افزایشی بود. اما در مورد تخلیص، همان‌طور که می‌دانید عمل دیالیز باید قبل از انتقال نمونه به ستون کروماتوگرافی انجام گیرد، زیرا با این عمل از تشکیل باندها بین پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم‌تر از ۱۰ کیلو دالتون با آنزیم مورد نظر جلوگیری می‌گردد (۳۳). با توجه به این‌که، عصاره آنزیمی به دفعات تحت فیلتراسیون، اولترافیلتراسیون با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲ درجه سانتی‌گراد، دیالیز و ستون کروماتوگرافی قرار گرفته است بنابراین شاهد افزایش میزان تخلیص بوده و چنین نتایجی را در پژوهش‌های استخراج آنزیم لیپاز از زوائد پیلوریک ماهی قزل‌آلا (۷)، پروتئاز و لیپاز از امعاء و احشاء تون زرده (*Euthynnus affinis*) (۱۴)، دیده شد. در پژوهش‌های ترسیب آنزیم تریپسین از ضمام پیلوریک ساردین مونتری (*Sardinops sagax* C.) میزان ۳۰ تا ۷۰ درصد سولفات آمونیوم استفاده شد که در نتیجه آن میزان تخلیص و بازده به ترتیب ۱/۳ و ۷۳ درصد گزارش شد (۳۴). کروماتوگرافی ستونی با ژل فیلتراسیون بر مبنای قابلیت ورود مولکول‌ها به درون منافذ ژل بستر استوار است و ترکیبات با وزن مولکولی زیاد نمی‌توانند وارد حفره‌های شوند در نتیجه به سرعت همراه فاز متحرک از ستون خارج می‌گردند، ولی مولکول‌های کوچک‌تر در درون حفره‌ها گیر می‌افتند و به ترتیب وزن مولکولی و به صورت نسبتاً خالص از ستون خارج می‌شوند. نتایج

آنزیم‌ها نقش محوری در صنایع غذایی، شیمیایی و زیست‌فناوری دارند که توسعه صنعت سبز، پایدار و مدرن را تسهیل می‌کنند (۲۵). بازار جهانی آنزیم در سال ۲۰۱۷ به ۶ میلیارد دلار بود (۲۶) که در سال ۲۰۱۹، به ۹/۰۰۸ میلیارد دلار رسید، پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۷ به ارزش ۱۳/۸۱۵ میلیارد دلار برسد (۱۴ و ۲۷). از ۶۰ درصد آنزیم‌های عرضه شده در سراسر جهان در سال ۲۰۱۸، آنزیم‌های لیپاز ۲۰ درصد را به خود اختصاص دادند (۲۸) آنزیم لیپاز، پس از آمیلاز و پروتئاز در بازار جهانی آنزیم در رتبه سوم قرار گرفتند (۲۹). یکی از کاربردهای ضروری و سودآور آنزیم‌های فنی (لیپاز، آمیلاز و پروتئاز) در تولید مواد شوینده است که در آن اندازه کل بازار جهانی در سال ۲۰۱۶ ۱/۱۱ میلیارد دلار بود و در سال ۲۰۲۱ به ۱/۳۳ میلیارد دلار افزایش یافت (۲۷) و نرخ رشد سالانه ترکیبی (CAGR) تقریباً ۱۱/۵ درصد در طول ۲۰۱۵-۲۰۲۰ بود (۳۰). ترسیب با سولفات آمونیوم یکی از مراحل ابتدایی برای تخلیص پروتئین‌ها و جداسازی برخی از پروتئین‌های مزاحم می‌باشد (۳۱). چون سولفات آمونیوم پس از انحلال در آب، یون‌هایی تولید می‌کند که با پروتئین بر سر اتصال با آب رقابت می‌کند و در غلظت‌های بالاتر می‌تواند آب را از دسترس پروتئین خارج نماید. که در نتیجه پروتئین بیش‌تری رسوب می‌کند در این پروژه سولفات آمونیوم با سه غلظت ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درصد استفاده شد که در مرحله اول پروتئین‌هایی که دارای خاصیت آبگریزی می‌باشند رسوب می‌کنند و در غلظت ۴۵ درصد پروتئین‌های بیش‌تری رسوب می‌کنند و در غلظت ۶۰ درصد بر میزان پروتئین‌های رسوب کرده افزوده می‌شود (۳۲). با توجه به تیمارها میزان پروتئین رسوب کرده در تیمار ۶۰ درصد نسبت دو تیمار دیگر بیش‌تر می‌باشد. بازده استخراج

زیاد نقش مهمی در تفاوت‌های ساختاری مشاهده شده در لپازها و سایر آنزیم‌های گوارشی در ماهی باله‌دار ایفا می‌کند (۱۲ و ۳۷). نتایج وزن مولکولی آنزیم‌های لپاز استخراج شده با استفاده از الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) ۱۲/۵ درصد از روده در غلظت‌های ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درصد سولفات آمونیوم در شکل ۲ آورده شد. وزن مولکولی در تیمار ILE30، ۶۸/۳ KDa و ILE45، ۳۸/۴۱ KDa گزارش شد و در مورد لپاز ILE60 هیچ باندهایی در SDS-PAGE مشاهده نشد. به‌طور کلی وزن مولکولی آنزیم لپاز متفاوت است که می‌تواند ناشی از منبع و منشاء (حیوان، باکتری، قارچ و مخمر) استخراج باشد (۱). در ماهیان بسته به بخشی از بدن که آنزیم از آن جدا می‌شود عملکرد، وزن مولکولی آنزیم نیز متفاوت است (۱). ایسلام و همکاران (۱۵)، دو نوع آنزیم لپاز با وزن مولکولی ۴۶/۵ و ۴۱/۲ کیلودالتون را از عضله پشته ماهی کفال (*Liza persica*) با استفاده از سولفات آمونیوم و ستون‌های کروماتوگرافی DEAE-cellulose، Sephadex G-50 و CM-cellulose تخلیص کردند. در پژوهشی دیگر از همین پژوهش‌گر، آنزیم لپاز را از عضلات پشته ماهی کپور آینه‌ای (*Cirrhinus reba*) با استفاده از سولفات آمونیوم ترسیب و با ستون‌های کروماتوگرافی DAEA-cellulose و Sephadex G-50 تخلیص کردند. براساس نتایج، وزن مولکولی آنزیم لپاز استخراج شده ۸۷ KDa بود. لپاز لوزالمعده از ماهی stingray دارای وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون بود (۱۹). این تغییرات در وزن مولکولی لپاز می‌تواند ناشی از منبع آنزیم و روش‌های تعیین آن باشد (۳۸).

نتایج بررسی دمای بهینه و پایداری، آنزیم‌های لپاز استخراج شده از روده هور مسقطی در شکل ۳ نشان داده شد. دمای بهینه ILE30، ILE45 و ILE60 به ترتیب ۵۵، ۴۲ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و

حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون توسط سایر پژوهش‌گران به شرح زیر است: در گربه‌ماهی (*Pterygoplichthys disjunctivus*) میزان تخلیص و بازده این مرحله را ۴/۸۴ و ۲۸/۰۶ درصد گزارش کردند (۳۵). میزان پروتئین آنزیم لپاز ILE30، ۱/۵ و ILE45 به ترتیب ۶/۲، ۱/۵ و ILE60 ۴/۴۵ گزارش شد (جدول ۱). در صورتی که میزان پروتئین محلول در پژوهش‌های انوشه و همکاران (۷) در استخراج آنزیم لپاز از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۰/۵۳ mg/ml) و در پژوهش‌های زمانی و همکاران (۸) در استخراج آنزیم تریپسین از کیلکای معمولی (۵/۲۸ mg/ml) گزارش شد. نتایج فعالیت ویژه آنزیمی (جدول ۱)، فعالیت ویژه آنزیم (میزان فعالیت ویژه هر آنزیم از تقسیم میزان فعالیت آنزیمی کل بر میزان پروتئین حاصل می‌گردد) لپاز ILE30، ILE45 و ILE60 به ترتیب ۳/۴۲، ۲/۸ و ۴/۱ U/mg گزارش شد. فعالیت لپاز کبد بیش‌تر از لپاز استخراج شده از عضله قلب، عضله اسکلتی و بافت چربی چهار گونه ماهی قطب جنوب بود. هنگامی که لپازها از اندام‌های داخلی روهو، ساردین روغنی، کفال و ماهی ماکرل هندی استخراج شد، بیش‌ترین فعالیت این آنزیم در روده و معده/ زوائد پیلوریک مشاهده شد (۳۶). این نتایج در پژوهش‌های ایسلام و همکاران (۱۵)، میزان فعالیت کل و فعالیت ویژه لپاز از عضلات پشته ماهی کفال به ترتیب ۳۱۰/۲ U/ml و ۱/۳ U/mg و پژوهش کالاهان و همکاران (۱۸) روی ویژگی‌ها و فعالیت آنزیم‌های گوارشی اندازه‌های متفاوت تیلاپیا مشاهده شد.

وزن مولکولی آنزیم لپاز در آبزیان، بسته به گونه متفاوت است. تفاوت در ساختارهای سه‌بعدی ممکن است به تفاوت در توالی اسیدهای آمینه که ساختار پروتئین اولیه را در نتیجه تنوع ژنتیکی تشکیل می‌دهند، نسبت داده شود. عادات غذایی نیز به احتمال

هم‌چنین پروتئاز و لیپاز استخراج شده از احشاء ماهی زرده (*Euthynnus affinis*)، به ترتیب در pHهای ۷ و ۸ دارای فعالیت بهینه بودند (۱۴). پراسرتان و همکاران (۴۳) حداکثر فعالیت لیپازهای گوارشی را در pH ۱۰ در ماهیان *T. albacares* و *K. pelamis* و در pH ۹ در *T. tonggol* گزارش کرد، که نشان می‌دهد pH بهینه لیپاز می‌تواند در گونه‌ها مختلف بین ۶/۵ تا ۹ متفاوت باشد (۴۳).

نتیجه‌گیری

مجرای گوارشی ماهی هورر مسقطی (*K. Pelamis*) به‌عنوان یک منبع مناسب و پایدار برای استخراج آنزیم‌های پپتیدی به‌ویژه لیپاز است. بافر مخلوط تریس هیدروکلراید، بنزآمیدین، EDTA و گلیسرول با pH ۷/۸، محلول مناسبی برای استخراج لیپاز و سولفات آمونیوم در ۳۰ تا ۶۰ درصد اشباع بهترین انتخاب برای راسب‌سازی و تغلیظ عصاره خام بود. استفاده از روش‌های تبادل یونی، دیالیز، اولترافیلتراسیون و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون در تصفیه لیپاز نقش بسیار مهمی داشت که منجر به تولید آنزیم‌های لیپاز با کیفیت صنعتی شد.

تضاد منافع

داده‌های این مقاله از پروژه استخراج و تخلیص آنزیم لیپاز از ضایعات تون ماهیان استخراج شده است.

تقدیر و تشکر

از مسئولین، کارشناسان و همکاران محترم در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان و مرکز تحقیقات زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که در انجام این پروژه همکاری نموده‌اند، صمیمانه سپاسگزارم.

بازه دمای پایداری ILE30، ILE45 و ILE60 به ترتیب (۵۰-۷۰ °C)، (۳۰-۵۵ °C) و (۳۰-۶۵ °C) گزارش شد. کاهش فعالیت آنزیمی می‌تواند به دلیل دناتورده شدن و تغییر ساختار آنزیم‌ها در دمای بالا و کمبود انرژی فعال‌سازی (Ea) لازم در دمای پایین نسبت داد. لیپاز استخراج شده از مجرای گوارشی کپور معمولی (*Cyprinus carpio* L.) با دمای بهینه ۴۵ درجه سانتی‌گراد (۵)، احشای ماهی زرده (*Euthynnus affinis*) با دمای پایداری و بهینه به ترتیب ۳۵-۷۵ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد (۱۴)، احشاء کفال خاکستری با دمای بهینه ۶۰ درجه سانتی‌گراد (۱۶) و لیپاز استخراج شده از زوائد پیلوریک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با دمای پایداری و بهینه به ترتیب ۳۵ تا ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (۳۳). شکل ۵ مقادیر pH بهینه و پایداری فعالیت لیپاز روده هورر مسقطی را نشان می‌دهد. میزان pH بهینه و پایداری برای لیپاز روده ILE30، ILE45 و ILE60 به ترتیب (۷/۱، ۷-۸/۵، ۶/۹، ۶/۵-۸، ۷/۴، ۶-۸) گزارش شد. فعالیت آنزیمی در pH کم‌تر از ۳/۵ و بیش‌تر از ۹ به شدت کاهش یافت. کاهش فعالیت آنزیم‌های لیپاز استخراج شده در pHهای کم‌تر از ۳/۵ و بیش‌تر از ۹، احتمالاً در نتیجه تغییرات ساختاری ناشی از تغییرات در بار الکتریکی زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه، که به نوبه خود برهمکنش‌های الکترواستاتیکی را تغییر می‌دهد که ساختار سوم پروتئین‌ها را تثبیت می‌کند (۳۹) یا باعث دناتورده شدن پروتئین در شرایط اسیدی آنتاگونیست یا قلبایی محلول‌های آبی شود که متعاقب آن قابلیت قرار گرفتن در جایگاه فعال سوبسترا را از دست می‌دهد و فعالیت آنزیم کم‌تر یا متوقف می‌گردد (۴۰، ۴۱ و ۴۲). در پژوهش‌های علی و همکاران (۵)، pH بهینه ۶/۵ برای لیپاز مجرای گوارشی کپور معمولی *Cyprinus carpio* L. تعیین گردید.

منابع

1. Kurtovic, I., Marshall, S. N., Zhao, X., & Simpson, B. K. (2009). Lipases from mammals and fishes. *Reviews in Fisheries Science*, 17, 18-40.
2. Gupta, R., Kumari, A., Syal, P., & Singh, Y. (2015). Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research*, 57, 40-54.
3. Verma, N., Thakur, S., & Bhatt, A. K. (2012). Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A review). *International Research Journal of Biological Sciences*, 1 (8), 88-92.
4. Colakoglu, A. S., & Özkaya, H. (2012). Potential use of exogenous lipases for DATEM replacement to modify the rheological and thermal properties of wheat flour dough. *Journal of Cereal Science*, 55, 397-404.
5. Ali, H. K., Nasser, J. M., & Shaker, K. A. (2022). Extraction, purification and characterization of lipase from the digestive duct of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 53 (5), 1011-20.
6. Gorgun, S., & Akpinar, M. A. (2012). Purification and characterization of lipase from the liver of Carp (*Cyprinus carpio*, 1758) living in Lake Todurge (Sivas, Turkiye). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 207-215.
7. Anoushe, N., Madani, R., Hosseini, S., Zamani, A., & Emami, T. (2013). Purification of lipase enzyme from the anterior intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Journal*, 67 (3), 319-328. (In Persian)
8. Zamani, A., Rezaei, M., & Madani, R. (2011). Evaluation of the biochemical characteristics of trypsin enzyme purified from the intestine of Common kilka fish (*Clupeonella cultriventris caspia*). *Journal of aquaculture exploitation and breeding*, 11 (3), 41-56.
9. Ben Khaled, H., Bougatef, A., Balti, R., Triki-Ellouz, Y., Souissi, N., & Nasri, M. (2008). Isolation and characterisation of trypsin from sardinelle (*Sardinella aurita*) viscera. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (15), 2654-2662.
10. De la Parra, A. M., Rosas, A., Lazo, J. P., & Viana, M. T. (2007). Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) under culture conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33, 223-231.
11. Rueda-López, S., Martínez-Montaño, E., & Viana, M. T. (2017). Biochemical characterization and comparison of pancreatic lipases from the Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*; totoaba, *Totoaba macdonaldi*; and striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48 (1), 156-165.
12. Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Simpson, B. K. (2007). Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chem.* 100, 1580-1589.
13. Mardina, V., Harmawan, T., Hidayani, G. M., & Yusof, F. (2018). Screening of protease and lipase sources from visceral organs of *Euthynnus affinis*. In IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering*. IOP Publishing, 420 (1), 1-7.
14. Mardina, V., Harmawan, T., Fitriani, F., Sufriadi, E., Febriani, F., & Yusof, F. (2020). *Euthynnus affinis* viscera-an alternative source for protease and lipase enzymes: Characteristic and potential application as destainer agent: *Euthynnus affinis* viscera as source for protease and lipase enzyme. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21 (12), 5858-5864.
15. Islam, M. A., Absar, N., & Bhuiyan, A. S. (2008). Isolation, purification and characterization of lipase from Grey mullet (*Liza parsia* Hamilton, 1822). *Asian Journal of Biochemistry*, 3 (4), 243-255.
16. Aryee, A., Simpson, B., & Villalonnga, R. (2007). Lipase fraction from the viscera of Grey mullet (*Mugil cephalus*) isolation, partial purification and some biochemical characteristics. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 394-402.

17. Bezerra, R. S., Lins, E. J. F., Alencar, R. B., Paiva, P. M. G., Chaves, M. E. C., Coelho, L. C., & Carvalho, Jr. L. B. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, 40, 1829-1834.
18. Klahan, R., Areechon, N., Yoonpundh, R., & Engkagul, A. (2009). Characterization and activity of digestive enzymes in different sizes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Agriculture and Natural Resources*, 43 (1), 143-53.
19. Bouchaâla, E., BouAli, M., Ali, Y. B., Miled, N., Gargouri, Y., & Fendri, A. (2015). Biochemical characterization and molecular modeling of pancreatic lipase from a cartilaginous fish, the common stingray (*Dasyatis pastinaca*). *Applied biochemistry and biotechnology*, 176 (1), 151-169.
20. Macedo, G. A., Lozano M. M. S., & Pastore, G. M. (2003). Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6 (1), 72-75.
21. Morrissey, M. T., & Okada, T. (2007). Marine enzymes from seafood by-products. In *maximising the value of marine by-products*, Woodhead Publishing, 374-396.
22. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
23. Senphan, T., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2015). Purification and characterization of trypsin from hepatopancreas of Pacific white shrimp. *Journal of Food Biochemistry*, 39 (4), 388-397.
24. Borkar, P., Bodade, S. R. G., Rao, S. R., & Khobragade, C. N. (2009). Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT9. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40 (2), 358-366.
25. Adhikari, S. (2019). Application of immobilized enzymes in the food industry. *Enzymes in food biotechnology*, 711-721.
26. Arnau, J., Yaver, D., & Hjort, C. M. (2020). Strategies and challenges for the development of industrial enzymes using fungal cell factories. *Grand challenges in fungal biotechnology*, 179-210.
27. Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8 (6), 238.
28. Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110.
29. Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2 (3), e201209017.
30. Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *Biotechnology*, 6: 1-5.
31. Khantaphant, S., & Benjakul, S. (2010). Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 120 (3), 658-664.
32. Burgess, R. R. (2009). Protein precipitation techniques. *Methods in enzymology*, 463, 331-42.
33. Kurtovic, I., Marshall, S. N., Zhao, X., & Simpson, B. K. (2010). Purification and properties of digestive lipases from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and New Zealand hoki (*Macruronus novaezelandiae*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36 (4), 1041-1060.
34. Castillo-Yáñez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F. L., & de los Ángeles Navarrete-Del, M. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140 (1), 91-98.
35. Villalba-Villalba, A. G., Ramírez-Suárez, J. C., Valenzuela-Soto, E. M., Sánchez,

- G. G., Ruiz, G. C., & Pacheco-Aguilar, R. (2013). Trypsin from viscera of vermiculated sailfin catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991: Its purification and characterization. *Food Chemistry*, 141 (2), 940-5.
36. Nayak, J., Nair, P. G. V., Mathew, S., & Ammu, K. (2004). A study on the intestinal lipase of India major carp (*Labeo rohita*). *Asian Fisheries Science*, 17, 333-340.
37. Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Balti, R., Barkia, A., & Nasri, M. (2009). New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: Purification and characterization. *Food Chemistry*, 116, 644-50.
38. Al-Aithy, M. (2012). Extraction of β -Glucan from barley bran and assessment of some functional properties and molecular weight. *The Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 43 (2), 100-108.
39. Rodwell, V. W., & Kenelly, P. J. (2003). Enzyme kinetics. In: Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., editors. *Harper's Biochemistry*. 26th Ed. New York, USA: McGraw-Hill. 60-71.
40. Klomklo, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2010). Proteinases in hybrid catfish viscera: Characterization and effect of extraction media. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 711-729.
41. Price, N. C., & Stevens, L. (1988). *Fundamentals of Enzymology*. Oxford University Press. 133-157.
42. Segel, I. H. (1976). *Biochemical Calculations*. 2nd Ed. John Wiley and Sons. Inc. New York.
43. Prasertsan, P., & Prachumratana, T. (2008). Comparison and selection of protease and lipase sources from visceral organs of three tuna species. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 30, 73-76.