

Evaluation of biochemical properties of the purified trypsin from common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) intestine

Abbas Zamani^{*1}, Masoud Rezaei², Rasool Madani³

1. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Fisheries Sciences and Engineering, Faculty of Natural Resources and Environmental, Malayer University, Hamedan, Iran. E-mail: zamanibouzandan@yahoo.com
2. Professor, Dept. of Fisheries Sciences and Engineering, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran. E-mail: rezai_ma@modares.ac.ir
3. Professor, Dept. of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran. E-mail: mr_madani@yahoo.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 04.22.2022

Revised: 05.08.2022

Accepted: 05.12.2022

Keywords:

Biochemical properties,
Common kilka,
Intestine,
Trypsin

ABSTRACT

In this work, the biochemical properties of the purified trypsin from common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) intestine including optimum temperature and pH, thermal and pH stability, effect of inhibitors, metal ions, oxidizing agents and surfactants were assayed. According to the obtained results, optimum temperature and pH of the trypsin were recorded at 60 °C and 8 respectively. The stability of the trypsin was well preserved at temperatures of up to 50 °C and pH from 7.0 to 10.0. SBTI and TLCK, two specific trypsin inhibitors, had a completely inhibition effect on the enzymatic activity ($P < 0.05$). The enzyme activity was significantly increased in the presence of Ca^{+2} and Mg^{+2} and decreased by Cu^{+2} , Ba^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} and Al^{+3} ($P < 0.05$). Na^{+} and K^{+} did not show any significant effect on the activity of trypsin ($P > 0.05$). The enzymatic activity was significantly increased in presence of surfactants including saponin and sodium cholate and showed a significant decrease in presence of SDS and oxidizing agents like sodium perborate and hydrogen peroxide ($P < 0.05$). Therefore, the results of our study can contribute to the clear understanding of the purified trypsin from common kilka intestine for application in different industries in future.

Cite this article: Zamani, Abbas, Rezaei, Masoud, Madani, Rasool. 2022. Evaluation of biochemical properties of the purified trypsin from common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) intestine. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11 (3), 41-56.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/japu.2022.20141.1649

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ارزیابی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*)

عباس زمانی^{۱*}، مسعود رضایی^۲، رسول مدنی^۳

۱. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، همدان، ایران.

رایانامه: zamanibouzandan@yahoo.com

۲. استاد گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران، ایران. رایانامه: rezai_ma@modares.ac.ir

۳. استاد گروه بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، البرز، ایران. رایانامه: mr_madani@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	در این پژوهش، ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی (<i>Clupeonella cultriventris caspia</i>) شامل دما و pH بهینه، دما و pH پایداری، اثر بازدارنده‌های آنزیمی، یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد دما و pH بهینه آنزیم تریپسین به ترتیب ۶۰°C و ۸ و پایداری دمایی و pH آن به ترتیب تا ۵۰°C و ۱۰-۷ تعیین گردید. بازدارنده‌های SBTI و TLCK، به عنوان دو بازدارنده اختصاصی آنزیم تریپسین، اثر مهارکنندگی کاملی بر فعالیت آنزیم تریپسین داشتند ($P < 0/05$). یون‌های Ca^{2+} و Mg^{2+} سبب افزایش معنی‌دار و یون‌های Cu^{2+} ، Ba^{2+} ، Co^{2+} ، Zn^{2+} و Fe^{2+} باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم تریپسین گردیدند ($P < 0/05$). یون‌های K^+ و Na^+ اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم تریپسین نشان ندادند ($P > 0/05$). فعالیت آنزیم تریپسین در حضور سورفاکتانت‌های ساپونین و سدیم کولات افزایش معنی‌دار ($P < 0/05$) و در حضور سدیم دودسیل سولفات و عوامل اکسیدکننده (سدیم پربورات و پراکسید هیدروژن) کاهش معنی‌داری ($P < 0/05$) را نشان داد. ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم تریپسین نشان داد که این آنزیم می‌تواند در آینده برای استفاده در صنایع مختلف مدنظر قرار گیرد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۲	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۸	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۲	
واژه‌های کلیدی: تریپسین، روده، کیلکای معمولی، ویژگی‌های بیوشیمیایی	

استناد: زمانی، عباس، رضایی، مسعود، مدنی، رسول (۱۴۰۱). ارزیابی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*). نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۱ (۳)، ۵۶-۴۱.

DOI: 10.22069/japu.2022.20141.1649



© نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

آنزیم‌ها، ماکرومولکول‌های پروتئینی هستند که به‌عنوان کاتالیزور در واکنش‌های شیمیایی شرکت نموده و نقش مهمی در کاهش انرژی مورد نیاز برای انجام واکنش دارند (۱، ۲ و ۳). امروزه استفاده از آنزیم‌ها در صنایع مختلف گسترش یافته است که می‌توان به کاربرد آن‌ها در صنایع غذایی، چرم و ابریشم، شوینده‌ها و داروسازی اشاره نمود. آنزیم‌ها را می‌توان از منابع جانوری، گیاهی و میکروبی تهیه کرد؛ به طوری که تعدادی از آنزیم‌ها مانند لیپاز و تریپسین از منابع جانوری، برخی مانند فیسین، بروملین و پاپائین به ترتیب از گیاهان انجیر، آناناس و پاپایا و برخی دیگر مانند آلکالاز و نئوتراز از منابع میکروبی مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها تهیه می‌شوند (۴). یکی از منابع جانوری تامین‌کننده آنزیم‌ها که امروزه مورد توجه قرار گرفته است جانوران آبی هستند. محیط‌های آبی به دلیل دارا بودن گونه‌های متنوع آبی اعم از ماهیان و بی‌مهرگان ظرفیت بالایی برای کشف و تولید آنزیم‌های مختلف دارند. اکثر آنزیم‌های موجود در ماهیان و بی‌مهرگان آبی در موجودات خشک‌زی نیز دیده می‌شود ولی تفاوت‌هایی در وزن مولکولی، pH و دمای بهینه، پایداری دمایی و pH و خواص بازدارندگی آن‌ها مشاهده می‌شود (۵).

در بین آنزیم‌ها، پروتئازها مهم‌ترین گروه از آنزیم‌های صنعتی را تشکیل می‌دهند که حدود ۶۰ درصد بازار جهانی آنزیم را به خود اختصاص داده‌اند (۶ و ۷). پروتئازها نقش بسیار مهمی در شکست پیوندهای پپتیدی در مولکول پروتئین دارند و براساس نوع اسید آمینه موجود در جایگاه فعال خود به ۴ دسته پروتئازهای سرین، سیستئین، اسیدی و متالوپروتئازها تقسیم‌بندی می‌شوند (۸). یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های پروتئازی، آنزیم تریپسین است که به دسته پروتئازهای سرین تعلق داشته و به صورت یک پیش‌آنزیم توسط

سلول‌های پانکراس تولید می‌شود. این آنزیم فعالیت آندوپیتیدازی دارد و پیوند پپتیدی در زنجیره پروتئینی را از سمت گروه کربوکسیل جاییکه اسید آمینه آرژینین و لایزین قرار دارد را شکسته و نقش مهمی در فرآیندهای زیستی مانند گوارش دارد (۷ و ۹). از مهم‌ترین کاربردهای آنزیم تریپسین می‌توان به استفاده برای تولید پنیر، تولید سس سویا، ترد کردن و خوش طعم نمودن گوشت، کشت سلول، تولید پروتئین‌های نوترکیب، تشخیص دیابت و درمان آن، صنایع شوینده، صنایع چرم‌سازی، تولید پروتئین هیدرولیز شده مانند هیدرولیز کازئین موجود در شیر خشک مصرفی نوزادان به‌عنوان کمک هضم اشاره کرد (۱، ۷، ۱۰ و ۱۱). آنزیم تریپسین از ضمامم پیلوریک (۳، ۱۲، ۱۳ و ۱۴)، روده (۷، ۱۰، ۱۵، ۱۶ و ۱۷)، کبد (۲) و طحال (۱۸) ماهیان مختلفی تخلیص و کاربرد آن مطالعه شده است.

بررسی‌ها نشان می‌دهد آنزیم تریپسین تخلیص شده از آبزیان از فعالیت کاتالیزوری بالاتری نسبت به تریپسین پستانداران برخوردار بوده و در شرایطی مانند دمای بالا (۶۰-۵۰°C)، pH بالا و حضور عوامل اکسیدکننده مانند پراکسید هیدروژن پایدارتر هستند (۱۹ و ۲۰). این آنزیم همانند سایر آنزیم‌ها تحت تأثیر برخی عوامل فیزیکی شیمیایی قرار دارد که می‌توان به دما، pH، یون‌های فلزی، بازدارنده‌ها، سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده اشاره نمود.

کیلکا ماهیان از مهم‌ترین ماهیان سطح‌زی دریای خزر بوده که متعلق به خانواده شگ‌ماهیان (Clupeidae) و جنس *Clupeonella* هستند و شامل سه گونه کیلکای معمولی (*C. cultriventris*) و *C. caspia*، کیلکای آنچوی (*C. engrauliformis*) و کیلکای چشم درشت (*C. grimmii*) می‌باشند که گونه کیلکای معمولی بیش از ۹۰ درصد صید را به خود اختصاص داده است (۲۱). امروزه بیش‌تر پژوهش‌ها

استون سرد (20°C) مخلوط شد و برای مدت ۱ دقیقه عمل همگن‌سازی با هموژنایزر در حضور یخ انجام شد. سپس نمونه همگن شده به وسیله کاغذ صافی واتمن (شماره ۲) فیلتر شده و مواد باقی‌مانده روی فیلتر چندین مرتبه با استون سرد شستشو شدند تا عمل چربی‌زدایی به‌خوبی انجام شود. سپس مواد باقی‌مانده روی فیلتر برای مدت یک شبانه‌روز در دمای اتاق قرار گرفت تا کاملاً خشک شود (۲۲). پودر خشک شده با بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس - HCl و $\text{pH } 7.5$ (حاوی ۱۰ میلی‌مولار CaCl_2 و ۰/۵ مولار NaCl) با نسبت ۱ به ۵۰ ترکیب شده و برای مدت ۳ ساعت در دمای 4°C بر روی همزن مغناطیسی به آرامی مخلوط شدند. سپس مخلوط حاصله برای مدت ۴۵ دقیقه در دمای 4°C در 14000g سانتریفیوژ گردید و محلول رویی به‌عنوان عصاره خام آنزیمی در نظر گرفته شد (۱۲ و ۱۷).

سنجش فعالیت آنزیم تریپسین: برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین از روش ارلانگر و همکاران (۱۹۶۱) و از سوبسترای BAPNA (α -benzoyl-DL-) استفاده گردید (argenine-p-nitroanilide-HCL) استفاده گردید (۲۳). در این روش، $25\ \mu\text{l}$ عصاره آنزیمی با $1\ \mu\text{l}$ BAPNA (۱ میلی‌مولار) بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس-HCl، $\text{pH } 8$ حاوی $10\ \mu\text{l}$ میلی‌مولار CaCl_2 مخلوط گردید و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای 60°C انکوباسیون گردید. سپس $250\ \mu\text{l}$ اسید استیک ۳۰ درصد به مخلوط فوق اضافه شده و قرائت نوری در 410nm توسط اسپکتروفوتومتر انجام شد. نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی تهیه گردید با این تفاوت که به‌جای نمونه آنزیمی از آب مقطر استفاده شد. برای محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین از رابطه ۱ استفاده گردید:

به سمت استفاده بهتر از ماهیان کوچک سطح‌زی و تولید فرآورده‌هایی با ارزش افزوده بالا مانند آنزیم‌ها (به‌جای تولید پودر ماهی) و یا استفاده از امعاء و احشاء حاصله به‌عنوان منبع آنزیمی که حین تولید کنسرو به‌جای می‌ماند در حال انجام است (۵). در مطالعه قبلی (۱۷) آنزیم تریپسین از روده ماهی کیلکای معمولی با وزن مولکولی $23/2$ کیلودالتون تخلیص گردید و توانایی آن در هیدرولیز پروتئین عضله این گونه جهت تولید پپتیدهای با قابلیت فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش گردید. هدف از مطالعه حاضر، بررسی دما و pH بهینه، دما و pH پایداری، اثر یون‌های فلزی، بازدارنده‌های آنزیمی، سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده بر فعالیت آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده کیلکای معمولی می‌باشد تا با شناسایی ویژگی‌های بیوشیمیایی این آنزیم کاربرد احتمالی آن‌را در صنایع مختلف مانند شوینده‌ها و صنایع غذایی (مانند هیدرولیز پروتئین و تولید پپتیدهای زیست‌فعال) بررسی نمود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه ماهی: کیلکای معمولی مورد نیاز در این مطالعه از صیدگاه شهرستان بابلسر تهیه گردیده بود. ماهیان صید شده در داخل یک ظرف یونولیتی با نسبت یک به دو با یخ مخلوط گردیده و به آزمایشگاه شیلات دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس (واقع در شهرستان نور، استان مازندران) منتقل شدند. سپس روده از امعاء و احشاء ماهی در حضور یخ جدا شده و بلافاصله در فریزر 80°C - نگهداری شدند (۱۷). **آماده‌سازی عصاره آنزیمی:** نمونه روده پس از خروج از فریزر برای مدت ۲ ساعت در دمای یخچال (4°C) قرار گرفت تا از حالت انجماد خارج شود. سپس جهت چربی‌زدایی، نمونه با نسبت ۱ به ۳ با

(۱)

$$\text{حجم مخلوط واکنش (ml)} \times 1000 \times \text{میزان جذب در 410 nm} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین (Unit/mg protein)}}{\text{میزان پروتئین (mg/ml)} \times \text{مدت زمان واکنش (min)}} \times 8800$$

سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس فعالیت آنزیم تریپسین در طول موج ۴۱۰nm اندازه‌گیری شد. برای تعیین دمای پایداری، ابتدا نمونه آنزیمی در دماهای مختلف شامل ۱۰، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ دقیقه در حالت انکوباسیون قرار گرفت. سپس ۲۵μl از این نمونه با ۱۲۵۰μl از محلول سوستر- بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس- HCl، pH ۸، ۱۰ میلی‌مولار CaCl₂) مخلوط شد و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ °C درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و قرائت نوری در طول موج ۴۱۰nm انجام شد (۱۲). فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه کنترل (بدون حرارت‌دهی) براساس رابطه ۲ به‌صورت درصد محاسبه گردید:

در این رابطه ۸۸۰۰ بیانگر ضریب تاریکی برای پارا - نیتروآنیلین می‌باشد که محصول هیدرولیز سوسترای BAPNA توسط آنزیم تریپسین است.

سنجش پروتئین محلول: برای سنجش میزان پروتئین محلول از روش لوری و همکاران (۱۹۵۱) استفاده گردید (۲۴). در این روش از آلبومین سرم گاوی با غلظت ۱ mg/ml به‌عنوان استاندارد استفاده شد و قرائت نوری نمونه‌ها در ۷۵۰ nm توسط اسپکتروفوتومتر انجام شد.

دمای بهینه و دمای پایداری: برای تعیین دمای بهینه، ابتدا ۲۵μl نمونه آنزیمی با ۱۲۵۰μl از محلول سوستر- بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس- HCl، pH ۸، ۱۰ میلی‌مولار CaCl₂) ترکیب شد و برای مدت ۲۰ دقیقه در دماهای مختلف شامل ۱۰، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵ و ۷۰ درجه

(۲)

$$\text{فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین در نمونه حرارت داده شده} \times 100 = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین در نمونه کنترل}}{\text{فعالیت نسبی}} (\%)$$

اندازه‌گیری شد. برای تعیین پایداری pH، ابتدا نمونه آنزیمی با نسبت ۱ به ۱ با هر یک از بافرهای فوق ترکیب شده و سپس برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۲۵μl از نمونه انکوبه شده با ۱۲۵۰μl از محلول سوستر- بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس- HCl، pH ۸، حاوی ۱۰ میلی‌مولار CaCl₂) مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ °C قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰nm انجام شد (۱۲).

pH بهینه و پایداری pH: برای تعیین pH بهینه، ابتدا ۲۵μl نمونه آنزیمی بعد از مخلوط شدن با ۱۲۵۰μl از محلول سوستر- بافر با pH های مختلف (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار استات سدیم با ۶-۴ pH، بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس با ۷-۹ pH و بافر ۵۰ میلی‌مولار گلیسین با ۱۱-۱۰ pH؛ تمام بافرها حاوی ۱۰ میلی‌مولار CaCl₂ بودند) برای ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ °C انکوبه گردید. سپس فعالیت آنزیم تریپسین در طول موج ۴۱۰nm

فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه کنترل (بدون انکوباسیون در بافر با pHهای مختلف) بر اساس رابطه ۳ محاسبه و به صورت درصد گزارش گردید:

$$(۳)$$

$$\text{فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین در نمونه انکوبه شده در بافر های با pH مختلف} \times 100 = \frac{\text{فعالیت نسبی (\%)}}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین در نمونه کنترل}}$$

تریس - HCl، pH ۸، ۱۰ میلی مولار CaCl_2 ترکیب شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای 60°C قرار گرفت. سپس ۲۵۰ μl اسید استیک ۳۰ درصد به مخلوط فوق اضافه شده و قرائت نوری در طول موج ۴۱۰nm انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد یون فلزی بود. سپس فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم به فعالیت نمونه شاهد بر اساس رابطه ۴ به صورت درصد گزارش گردید:

یون‌های فلزی: اثر یون‌های فلزی شامل یون‌های تک‌ظرفیتی (Na^+ و K^+)، دو ظرفیتی (Ca^{+2} ، Mg^{+2} و Mn^{+2} ، Ba^{+2} ، Cu^{+2} ، Co^{+2} ، Fe^{+2} ، Zn^{+2}) و سه ظرفیتی (Al^{+3}) در غلظت ۵mM بر فعالیت آنزیم تریپسین بررسی شد (۱۰). برای این منظور، ابتدا نمونه آنزیمی با یون‌های فلزی با نسبت ۱ به ۱ برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۲۵۰ μl از مخلوط فوق با ۱۲۵۰ μl از محلول سوبسترا - بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار

$$(۴)$$

$$\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در حضور یون های فلزی} \times 100 = \frac{\text{فعالیت نسبی (\%)}}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در نمونه کنترل}}$$

۱۰ میلی مولار CaCl_2) ترکیب شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای 60°C قرار گرفت. سپس ۲۵۰ μl اسید استیک ۳۰ درصد به مخلوط فوق اضافه شده و قرائت نوری در طول موج ۴۱۰nm انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد این ترکیبات بود و از آب مقطر استفاده گردید (۱۰). سپس فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم به فعالیت نمونه شاهد بر اساس رابطه ۵ به صورت درصد گزارش گردید:

سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده: ابتدا نمونه آنزیمی با نسبت ۱ به ۱ با سورفاکتانت‌ها (شامل ساپونین، سدیم دودسیل سولفات و سدیم کولات تا حصول غلظت نهایی ۱ درصد) و عوامل اکسیدکننده (شامل سدیم پربورات با غلظت نهایی ۱ درصد و پراکسید هیدروژن با غلظت نهایی ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) ترکیب شد و برای مدت ۱ ساعت در دمای 40°C انکوبه شدند. سپس ۲۵ μl از مخلوط آنزیمی فوق با ۱۲۵۰ μl محلول سوبسترا - بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس - HCl، pH ۸

$$(۵)$$

$$\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در حضور سورفاکتانت ها و عوامل اکسیدکننده} \times 100 = \frac{\text{فعالیت نسبی (\%)}}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در نمونه شاهد}}$$

سوستر - بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس - HCl، pH ۸، ۱۰ میلی‌مولار CaCl₂) ترکیب شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ °C قرار گرفت. سپس ۲۵۰ μl اسید استیک ۳۰ درصد به مخلوط فوق اضافه شده و قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ nm انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد بازدارنده بود (۱۲). سپس فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم به فعالیت نمونه شاهد بر اساس رابطه ۶ به صورت درصد گزارش گردید:

بازدارنده‌های آنزیمی: ابتدا نمونه آنزیمی با نسبت ۱ به ۱ با بازدارنده‌ها (SBTI) (۰/۰۵ mM) و (TLCK) (۵ mM) به عنوان بازدارنده‌های اختصاصی تریپسین، (PMSF) (۱۰ mM) و پارآمینوبنزامیدین^۴ (۵ mM) به عنوان بازدارنده‌های پروتئازهای سرین، (TPCK) (۵ mM) به عنوان بازدارنده اختصاصی کیموتریپسین، پیپستاتین^۶ (۰/۰۱ mM) به عنوان بازدارنده اختصاصی پروتئازهای آسپارتیک، یدواستیک اسید^۷ (۱ mM) به عنوان بازدارنده پروتئازهای سیستئین، EDTA^۸ (۲ mM) به عنوان بازدارنده متالوپروتئازها) ترکیب شد و برای ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۲۵۰ μl از مخلوط آنزیمی فوق با ۱۲۵۰ μl محلول

(۶)

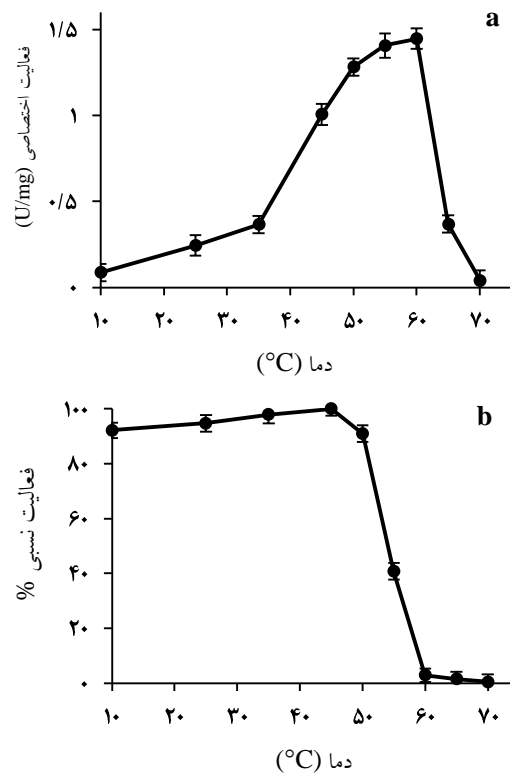
$$\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در نمونه حاوی بازدارنده} \\ (\%) = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در نمونه شاهد}}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در نمونه حاوی بازدارنده}} \times 100$$

نتایج

دما بهینه و پایداری دمایی: نتایج حاصل از بررسی دمای بهینه و پایداری دمایی آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد دمای بهینه آنزیم برابر با ۶۰ °C بود به طوری که با افزایش دما از ۱۰ تا ۶۰ °C فعالیت آنزیم افزایش یافت و در ۶۰ °C حداکثر خود رسید ولی از ۶۰ تا ۷۰ °C یک کاهش ناگهانی در فعالیت آنزیم مشاهده گردید. پایداری دمایی آنزیم تریپسین نیز نشان داد که با افزایش دما از ۱۰ تا ۵۰ °C حدود ۹۰ درصد فعالیت آنزیم حفظ شد در حالی که از ۵۵ تا ۷۰ °C کاهش معنی داری در فعالیت آنزیم مشاهده گردید به طوری که در دمای بالای ۶۰ °C فعالیت آنزیمی به طور کامل متوقف گردید (P < ۰/۰۵).

آنالیز آماری: در این پژوهش، برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف استفاده گردید و برای بررسی اثر یون‌های فلزی، بازدارنده‌ها، سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده بر فعالیت آنزیم تریپسین از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) تحت نرم افزار SPSS20 استفاده گردید و برای تعیین معنی دار بودن اختلاف میانگین‌ها بین نمونه شاهد با یون‌های فلزی، بازدارنده‌ها، سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام ارزیابی‌ها نیز در ۳ تکرار انجام گرفت.

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



شکل ۱- تأثیر دما بر فعالیت آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده کیلکای معمولی. a: دمای بهینه فعالیت آنزیم، b: پایداری دمایی آنزیم.

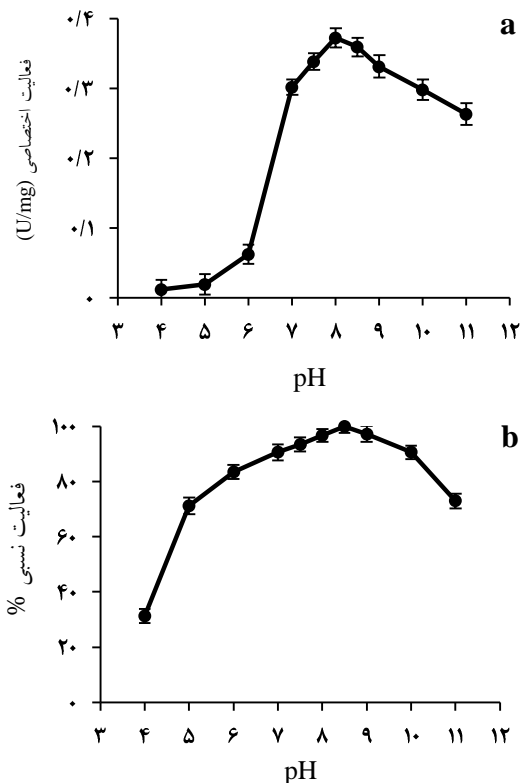
باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه کنترل گردیدند ($P < 0.05$)؛ در حالی‌که در حضور یون‌های Fe^{2+} ، Co^{2+} ، Ba^{2+} ، Cu^{2+} ، Mn^{2+} و Zn^{2+} کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه کنترل مشاهده شد ($P < 0.05$).

اثر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده: در جدول ۲ اثر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی نشان داده شده است. در حضور سورفاکتانت‌های ساپونین و سدیم کولات افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه کنترل مشاهده گردید ($P < 0.05$) در حالی‌که فعالیت آنزیم در حضور سدیم دودسیل سولفات کاهش معنی‌داری را نسبت به نمونه کنترل نشان داد ($P < 0.05$). عوامل اکسیدکننده سدیم پرورات و پراکسید هیدروژن باعث کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم تریپسین

pH بهینه و پایداری pH: pH بهینه و پایداری pH آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی در شکل ۲ نشان داده شده است. pH بهینه برای فعالیت آنزیم ۸ بود و با افزایش pH از ۴ تا ۸ فعالیت آن افزایش و از pH ۸ تا ۱۱ فعالیت کاهش یافت. پایداری pH نیز نشان داد که آنزیم تریپسین در pH ۷ تا ۱۰ پایدار بوده و تا ۸۰ درصد فعالیت آن حفظ شد در حالی‌که در pH به‌شدت اسیدی و قلیایی (pH ۴ و ۱۱) تقریباً ناپایدار بود و عمده فعالیت خود را از دست داد.

اثر یون‌های فلزی: نتایج حاصل از بررسی اثر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی در جدول ۱ نشان داده شده است. یون‌های K^+ و Na^+ تأثیر معنی‌داری را بر میزان فعالیت آنزیم نسبت به نمونه کنترل نشان ندادند ($P > 0.05$). یون‌های Ca^{2+} و Mg^{2+}

نسبت به نمونه کنترل گردیدند ($P < 0/05$); به طوری که با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن از ۵ تا ۱۵ درصد کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم نسبت به نمونه کنترل ثبت گردید ($P < 0/05$).



شکل ۲- تأثیر pH بر فعالیت آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده کیلکای معمولی. a: pH بهینه فعالیت آنزیم، b: پایداری pH آنزیم.

جدول ۱- تأثیر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از روده ماهی کیلکای معمولی (*C. cultrivertris caspia*).

فعالیت نسبی (%)	غلظت (mM)	یون فلزی
100 ± 0/00 ^b	-	نمونه کنترل
100 ± 1/76 ^b	5	K ⁺
100 ± 1/12 ^b	5	Na ⁺
112 ± 1/47 ^a	5	Ca ⁺²
110 ± 1/29 ^a	5	Mg ⁺²
62/6 ± 1/58 ^d	5	Cu ⁺²
57 ± 1/27 ^e	5	Zn ⁺²
77/6 ± 1/13 ^c	5	Mn ⁺²
52/2 ± 1/76 ^f	5	Ba ⁺²
29/8 ± 1/50 ^h	5	Co ⁺²
16/4 ± 1/26 ⁱ	5	Fe ⁺²
37/3 ± 1/49 ^g	5	Al ⁺³

حروف کوچک غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/05$).

PMSF و پارا آمینوبنزامیدین بازدارندگی معنی‌داری را بر فعالیت آنزیم نشان دادند ($P < 0/05$). فعالیت آنزیم در حضور بازدارنده های TPCK، پیاستاتین A، یدواستیک اسید و EDTA در مقایسه با نمونه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0/05$). هر چند کاهش جزئی در میزان فعالیت آنزیم در حضور بازدارنده یدواستیک اسید مشاهده گردید.

اثر بازدارنده‌ها: نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارنده‌ها بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از روده ماهی کیلکای معمولی در جدول ۳ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم تریپسین نسبت به نمونه کنترل در حضور بازدارنده‌های TLCK، SBTI، PMSF و پارا آمینوبنزامیدین کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). به طوری که بین TLCK و SBTI اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید و این بازدارنده‌ها نسبت به

جدول ۲- اثر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از روده ماهی کیلکای معمولی (*C. cultriventris caspia*)

فعالیت نسبی (%)	غلظت (mM)	سورفاکتنت و عوامل اکسیدکننده	
$100 \pm 0/00^c$	-	کنترل	
$37/88 \pm 0/87^h$	۱	سدیم دودسیل سولفات	سورفاکتانت
$148/50 \pm 0/91^b$	۱	سدیم کولات	
$152/40 \pm 0/46^a$	۱	ساپونین	
$95/01 \pm 0/73^d$	۱	سدیم پرپورات	عوامل اکسیدکننده
$68/91 \pm 0/64^e$	۵		
$59/22 \pm 0/56^f$	۱۰	پراکسید هیدروژن	
$45/60 \pm 0/47^g$	۱۵		

حروف کوچک غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/05$).

جدول ۳- تأثیر انواع مختلف بازدارنده‌ها بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از روده ماهی کیلکای معمولی (*C. cultriventris caspia*)

بازدارندگی (%)	غلظت (mM)	انواع بازدارنده
$0 \pm 0/00^d$	-	کنترل
$36/9 \pm 0/28^c$	۱۰	PMSF
$100 \pm 0/31^a$	۰/۰۵	SBTI
$100 \pm 0/30^a$	۵	TLCK
$48/9 \pm 0/35^b$	۵	پارا- آمینو بنزامیدین
$0 \pm 0/00^d$	۵	TPCK
$0 \pm 0/00^d$	۰/۰۱	پیاستاتین A
$0/5 \pm 0/029^d$	۱	یدواستیک اسید
$0 \pm 0/00^d$	۲	EDTA

حروف کوچک غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/05$).

بحث

دمایی این آنزیم با پایداری دمایی آنزیم تریپسین در ماهی ماندارین (*Siniperca chuatsi*)، ماهی تریگر خاکستری (*Balistes capticus*)، ماهی کپور هندی (*C. mrigala*)، گربه‌ماهی (*L. alexandri*)، ماهی تون باله دراز (*T. alalunga*) و ماهی گالیت (*C. hippurus*) مشابهت داشت (۲، ۷، ۹، ۱۰، ۱۴ و ۱۶). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد پایداری دمایی آنزیم تریپسین در ماهیان مناطق سردسیری تا 40°C و در ماهیان مناطق گرمسیری و معتدله تا 50°C می‌باشد. غیرفعال شدن آنزیم (inactivation) در دماهای بالا احتمالاً می‌تواند به دلیل از هم گسیختگی ساختاری (Unfolding) آنزیم باشد. پایداری دمایی آنزیم تریپسین در ماهیان ارتباط مستقیمی با دمای زیستگاه ماهی دارد و می‌تواند نشان‌دهنده این واقعیت باشد که ماهیان جانورانی خونسرد هستند؛ البته دمای بهینه و پایداری آنزیم می‌تواند نسبت به دمای زیستگاه ماهی بالاتر باشد (۲۷ و ۲۸).

مقدار pH بهینه برای فعالیت آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی ۸ بود. چنین نتایجی توسط کیشیمورا و همکاران (۲۰۰۵) در ماهی آنچوی ژاپنی (*E. japonicas*)، خانتافانت و بنجاکول (۲۰۱۰) در ماهی سرخو (*L. vitta*)، خانگمبام و چاکرابارتی (۲۰۱۵) در ماهی کپور هندی (*C. mrigala*) و دوس سانتوس و همکاران (۲۰۲۰) در ماهی گالیت (*C. hippurus*) گزارش گردید (۷، ۱۲، ۱۶ و ۲۵). pH بهینه فعالیت آنزیم تریپسین در گربه‌ماهی (*L. alexandri*) برابر ۹ (۱۴)، سرخو (*L. vitta*) (۱۲) برابر ۸/۵، ماهی تامباکویی (*Colossoma macropomum*) (۶) ۹، ماهی پیراروکو (*Arapaima gigas*) (۳) ۹/۲۵، ماهی تون باله دراز (*T. alalunga*) (۲) گزارش گردیده بود. براساس مطالعه سیمپسون (۲۰۰۰) تریپسین در ماهیان معمولاً در pH قلبایی به‌ویژه pH بین ۷/۵ تا ۱۰/۵

آنزیم‌ها ماکرومولکول‌هایی هستند که فعالیت کاتالیزوری آنها وابسته به دماست و در نتیجه دارای دمای بهینه برای فعالیت خود هستند. در این مطالعه دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی 60°C تعیین گردید که با نتایج ارائه شده توسط کیشیمورا و همکاران (۲۰۰۵) در آنچوی ژاپنی (*Engraulis japonicas*)، خانتافانت و بنجاکول (۲۰۱۰) در ماهی سرخو (*Lutjanus vitta*)، کتاری و همکاران (۲۰۱۲) در ماهی زیرا بلنی (*Salaria basilisca*) و کلومکلاو و بنجاکول (۲۰۱۸) در ماهی تون باله دراز (*Thunnus alalunga*) مطابقت داشت (۲، ۱۲، ۱۹ و ۲۵). بررسی‌ها نشان می‌دهد دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین در محدوده $30-60^{\circ}\text{C}$ قرار دارد به طوری که در ماهی کپور هندی (*Cirrhinus mrigala*) دمای $30-40^{\circ}\text{C}$ (۱۶)، گربه‌ماهی (*Lupiosilurus alexandri*) دمای 50°C (۱۴)، ماهی گالیت (*Coryphaena hippurus*) دمای 40°C (۷) و ماهی پیراروکو (*Arapaima gigas*) دمای 45°C (۳) گزارش گردیده است. کیشیمورا و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین در ماهیان ساکن مناطق معتدله 60°C ، ماهیان مناطق گرمسیری $55-65^{\circ}\text{C}$ و ماهیان مناطق سردسیری $45-50^{\circ}\text{C}$ می‌باشد (۲۶). از آنجائی که ماهی کیلکای معمولی ساکن آب‌های مناطق معتدله (دریای خزر) می‌باشد بنابراین دمای بهینه آن با دمای بهینه ماهیان مناطق معتدله مطابقت دارد. البته تفاوت در دمای فعالیت آنزیم می‌تواند ناشی از دمای زیستگاه ماهی، سوبسترای مورد استفاده جهت سنجش فعالیت آنزیم و همچنین شرایط آزمایشی باشد (۲).

دمای پایداری آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی تا 50°C بود. پایداری

(C. mrigala)، تون باله دراز (*T. alalunga*) و ماهی گالیت (*C. hippurus*) مطابقت داشت (۲، ۷، ۱۲، ۱۶، ۱۹ و ۳۰). بازدارنده SBTI پلی‌پپتیدی تک‌زنجیره و نوعی بازدارنده رقابتی و برگشت‌پذیر برای آنزیم تریپسین می‌باشد که کمپلکسی پایدار با آنزیم ایجاد کرده و منجر به کاهش دسترسی آنزیم به سوبسترای واقعی می‌گردد (۳۱). بازدارنده TLCK یک بازدارنده برگشت‌ناپذیر برای آنزیم تریپسین بوده که از طریق تشکیل پیوند کووالانسی با اسید آمینه هیستیدین در جایگاه فعال آنزیم باعث مسدود شدن این جایگاه جهت اتصال به سوبسترا می‌شود (۳۲). بازدارنده PMSF دارای اثر مهارکنندگی بر فعالیت آنزیم تریپسین بود که نشان داد این پروتئاز می‌تواند از دسته پروتئازهای سرین باشد. پروتئازهای سرین دسته‌ای از آنزیم‌های پروتئازی هستند که در جایگاه فعال آن‌ها اسید آمینه سرین در مرکز فعالیت کاتالیزوری قرار دارد (۸).

نتایج حاصل از بررسی یون‌های فلزی نشان داد یون‌های کلسیم و منیزیم باعث افزایش فعالیت آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی گردیدند در حالی‌که سایر یون‌های فلزی اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم داشتند و یا مانند سدیم و پتاسیم تأثیری بر فعالیت آنزیم نشان ندادند. این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعه لو و همکاران (۲۰۰۸) در ماهی ماندارین (*S. chuatsi*)، کتاری و همکاران (۲۰۱۲) در ماهی زبرا بلنی (*S. basilisca*) و دوس‌سانتوس و همکاران (۲۰۲۰) در ماهی گالیت (*C. hippurus*) همخوانی دارد (۷، ۹ و ۱۹). در ارتباط با اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم تریپسین باید اشاره نمود آن‌ها می‌توانند به‌عنوان کوفاکتور باعث افزایش فعالیت آنزیم شده و یا در برخی موارد فعالیت آنزیم را کاهش دهند؛ به‌طوری‌که یون‌های کلسیم و منیزیم باعث افزایش فعالیت آن می‌شوند در

دارای فعالیت بهینه می‌باشد (۲۹). آنزیم تریپسین متعلق به گروه پروتئازهای قلیایی است و تحت شرایط اسیدی ساختار و توزیع بار الکتریکی آن تغییر کرده و آنزیم نمی‌تواند به‌طور صحیح به سوبسترا متصل شود.

پایداری pH آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی در محدوده ۷-۱۰ بود که با نتایج حاصل از مطالعه جلولی و همکاران (۲۰۰۹) در ماهی تریگر خاکستری (*B. capriscus*)، کتاری و همکاران (۲۰۱۲) در زبرا بلنی (*S. basilisca*)، دوس‌سانتوس و همکاران، (۲۰۱۶) در گربه‌ماهی (*L. alexandri*)، کلومکلاو و بنجاکول (۲۰۱۸) در ماهی تون باله دراز (*T. alalunga*) و دوس‌سانتوس و همکاران (۲۰۲۰) در ماهی گالیت (*C. hippurus*) مطابقت داشت (۲، ۷، ۱۰، ۱۴ و ۱۹). پایداری آنزیم در pH به‌خصوص می‌تواند با بار الکتریکی آنزیم در آن pH مرتبط باشد. در pHهای به‌شدت اسیدی و قلیایی، دفع الکترواستاتیک بین مولکولی قوی از طریق القاء بار الکتریکی سبب تورم و از هم گسیختگی ساختار آنزیم می‌شود (۱۶). در ماهیان نسبت اسید آمینه‌های اسیدی به قلیایی در آنزیم تریپسین بالاتر از آنزیم تریپسین پستانداران است و بهمین دلیل تریپسین ماهیان در pHهای اسیدی ناپایدار بوده و در pHهای قلیایی دارای پایداری مناسبی می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی نشان داد بازدارنده‌های اختصاصی SBTI و TLCK تأثیر مهارکنندگی کاملی بر فعالیت این آنزیم داشتند ولی سایر بازدارنده‌ها تا حدی از فعالیت آنزیم جلوگیری کرده و یا اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم نداشتند. نتایج این مطالعه با مطالعات انجام شده در ماهی سرخو (*L. vitta*)، موجارا نقره‌ای (*Diapterus rhombeus*)، زبرا بلنی (*S. basilisca*)، کپور هندی

ساختار آنزیم ایجاد نکرده و حتی سبب افزایش جزئی در فعالیت آنزیم می‌شوند که احتمالاً این امر می‌تواند به دلیل تجمع این ترکیبات در مکان‌هایی از آنزیم که حاوی انرژی بالایی هستند رخ دهد (۳۷). SDS از طریق تخریب پیوند غیرکوالانس موجود در آنزیم سبب ایجاد یک شارژ منفی جدید می‌شود که به طور معنی‌داری نسبت به شارژ اولیه آنزیم بالاتر است. نتایج این مطالعه نشان داد که آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی در حضور عوامل اکسیدکننده (سدیم پرورات و پراکسید هیدروژن) ناپایدار بوده و از فعالیت آن کاسته شد. چنین نتایجی در ماهیان تریگر خاکستری (*B. capriscus*) (۱۰)، تامباکویی (*C. macropomum*) (۶) و زبرا بلنی (*S. basilisca*) (۱۹) نیز گزارش گردید. بسیاری از پروتئازها در حضور عوامل اکسیدکننده مانند پراکسید هیدروژن ناپایدار هستند؛ به طوری که پایداری نسبی یک آنزیم در حضور عوامل اکسیدکننده می‌تواند به عنوان یک ویژگی بسیار مهم برای استفاده احتمالی از آن در مواد شوینده باشد (۱۰). عوامل اکسیدکننده می‌توانند با گروه‌های تیول در آنزیم‌ها واکنش قوی داشته باشند و با تشکیل رادیکال‌های آزاد باعث اکسیدشدن آنزیم‌ها شوند که این امر با جذب اتم هیدروژن موجود در کربن آلفا منجر به دناتوره شدن آن می‌شود (۳۸).

نتایج به دست آمده از مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی نشان داد که این آنزیم می‌تواند در آینده برای استفاده در صنایع مختلف مانند شوینده‌ها و همچنین در صنایع غذایی جهت تولید پپتیدهای زیست‌فعال با فعالیت ضد اکسیدانی مدنظر قرار گیرد.

حالی که برخی مانند جیوه و مس از فعالیت آنزیم جلوگیری می‌نمایند (۳۳). یون‌های فلزی می‌توانند به طور مؤثری از طریق تغییر جریان الکترون در یک سوبسترا یا آنزیم واکنش کاتالیز شده را کنترل نموده و با توجه به گروه‌های عامل موجود در جایگاه فعال آنزیم در اتصال آن به سوبسترا نقش داشته باشند. معمولاً توزیع بار در جایگاه فعال یک آنزیم به گونه‌ای است تا وضعیت گذار واکنش کاتالیز شده نسبت به سوبسترا را تثبیت نماید (۳۴). آیتا و همکاران (۱۹۶۹) نشان دادند یون کلسیم می‌تواند به N-terminal تریپسینوژن متصل شده و بدون تغییر در ساختار آن، باعث افزایش میل ترکیبی پیوند لایزین-ایزولوسین جهت هیدولیز با تریپسین می‌شود (۳۵). برخی یون‌ها مانند کبالت بخش سولفیدریل آنزیم را تحت تأثیر قرار داده و بازدارندگی بالایی را بر فعالیت آنزیم اعمال می‌کنند (۳۶). البته تأثیر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین در گونه‌های مختلف ماهیان ممکن است تابع گونه ماهی و همچنین سازگاری‌های غذایی و زیست محیطی آن باشد (۱۶). عوامل مختلفی در انتخاب یک آنزیم جهت استفاده در مواد شوینده دخیل هستند که می‌توان به سازگاری و پایداری آن در حضور ترکیباتی مانند سورفاکتانت و عوامل اکسیدکننده اشاره کرد. فعالیت آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی کیلکای معمولی در حضور سورفاکتانت‌ها به جز SDS افزایش یافت. این نتایج با نتایج بدست آمده در ماهیان تریگر خاکستری (*B. capriscus*) (۱۰)، تامباکویی (*C. macropomum*) (۶) و زبرا بلنی (*S. basilisca*) (۱۹) همخوانی دارد. بررسی‌ها نشان می‌دهد سورفاکتانت‌ها در غلظت‌های بالا باعث دناتوره شدن آنزیم‌ها می‌شوند ولی در غلظت‌های پایین تغییری در

منابع

1. Zamani, A., and Benjakul, S. 2016. Trypsin from unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) pyloric caeca: purification and its use for preparation of fish protein hydrolysate with antioxidative activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96: 3. 962-969.
2. Klomkiao, S., and Benjakul, S. 2018. Two trypsin isoforms from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) liver: purification and physicochemical and biochemical characterization. *International journal of biological macromolecules*. 107: 1864-1870.
3. De Freitas-Júnior, A.C.V., da Costa, H.M.S., Marcuschi, M., Icimoto, M.Y., Machado, M.F., Machado, M.F., Ferreira, J.C., de Oliveira, V.M., Buarque, D.S., and Bezerra, R.S. 2021. Substrate specificity, physicochemical and kinetic properties of a trypsin from the giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 35: 102073.
4. Illanes, A. 2008. Enzyme production. In: Illanes, A. (Ed), *Enzyme biocatalysis: Principles and Applications*, Springer. pp. 57-89.
5. Shahidi, F., and Kamil, Y.J. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 12: 12. 435-464.
6. Marcuschi, M., Espósito, T.S., Machado, M.F., Hirata, I.Y., Machado, M.F., Silva, M.V., Carvalho Jr, 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: 3. 667-673.
7. Dos Santos, D.M.R.C., dos Santos, C.W.V., de Souza, C.B., de Albuquerque, F.S., dos Santos Oliveira, J.M., and Pereira, H.J.V. 2020. Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish): Purification, characterization and application in commercial detergents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 25: 101584.
8. Garcíacarreno, F.L., Dimes, L.E., and Haard, N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical biochemistry*. 214: 1. 65-69.
9. 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: 2. 352-360.
10. Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Balti, R., Barkia, A., and Nasri, M. 2009. New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes caprisucus*) with high activity at low temperature: purification and characterisation. *Food Chemistry*. 116: 3. 644-650.
11. Klomkiao, S., Kishimura, H., Benjakul, S., Simpson, B.K., and Visessanguan, W. 2010. Cationic trypsin: A predominant proteinase in Pacific saury (*Cololabis saira*) pyloric ceca. *Journal of Food Biochemistry*. 34: 5. 1105-1123.
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. 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: 3. 237-252.
14. Dos Santos, C.W.V., da Costa Marques, M.E., de Araújo Tenório, H., de Miranda, E.C., and Pereira, H.J.V. 2016. Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum. *Biochemistry and biophysics reports*. 8: 29-33.
15. Unajak, S., Meesawat, P., Paemanee, A., Areechon, N., Engkagul, A., Kovitvadi, U., Kovitvadi, S., Rungruangsak-Torrissen, K., and Choowongkamon, K. 2012. Characterisation of thermostable

- trypsin and determination of trypsin isozymes from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Food Chemistry. 134: 1533-1541.
16. Khangembam, B.K., and Chakrabarti, R. 2015. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: Purification, characterization and its potential application. Food Chemistry. 175: 386-394.
 17. Zamani, A., Madani, R., Rezaei, M., and Benjakul, S., 2017. Antioxidative activity of protein hydrolysate from the muscle of common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) prepared using the purified trypsin from common kilka intestine. Journal of Aquatic Food Product Technology. 26: 1. 2-16.
 18. Poonsin, T., Simpson, B.K., Benjakul, S., Visessanguan, W., Yoshida, A., Osatomi, K., and Klomklao, S. 2019. Anionic trypsin from the spleen of albacore tuna (*Thunnus alalunga*): Purification, biochemical properties and its application for proteolytic degradation of fish muscle. International journal of biological macromolecules. 133: 971-979.
 19. Ktari, N., Khaled, H.B., 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: 3. 467-474.
 20. Klomklao, S., Kishimura, H., and Benjakul, S. 2014. Anionic trypsin from the pyloric ceca of Pacific Saury (*Cololabis saira*): purification and biochemical characteristics. Journal of Aquatic Food Product Technology. 23: 2. 186-200.
 21. Zamani, A., Rezaei, M., and Madani, R. 2012. In-vitro effects of biochemical factors on trypsin activity from intestine and pyloric caeca of common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) for inhibition of belly bursting. Iranian Scientific Fisheries Journal. 20: 4. 53-62. (In Persian)
 22. 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 boliti fish (*Tilapia nilotica*). Journal of food biochemistry. 29: 5. 445-458.
 23. Erlanger, B.F., Kokowsky, N., and Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of biochemistry and biophysics. 95: 2. 271-278.
 24. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.
 25. Kishimura, H., Hayashi, K., Myashita, Y., and Nonmi, Y. 2005. Characterization of two trypsin isozymes from the viscera of Japanese Anchovy (*Engraulis japonica*). Journal of Food Biochemistry. 29: 459-469.
 26. Kishimura, H., Klomklao, S., Benjakul, S., and Chun, B.S. 2008. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). Food Chemistry, 106: 194-199.
 27. Sreedharan, S.K., Verma, C., Caves, L.S., Brocklehurst, S.M., Gharbia, S.E., Shah, H.N., and Brocklehurst, K. 1996. Demonstration that 1-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) is one of the most effective low M_r inhibitors of trypsin-catalysed hydrolysis. Characterization by kinetic analysis and by energy minimization and molecular dynamics simulation of the E-64-β-trypsin complex. Biochemical Journal. 316: 3. 777-786.
 28. Rungruangsak, T.K. 2007. Digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in Atlantic (*Salmo salar* L.) fed on diets with krill meal as an alternative protein source. Journal of Food Biochemistry. 31: 509-540.
 29. 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.
 30. 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.
31. Senphan, T., Benjakul, S., and Kishimura, H. 2015. Purification and characterization of trypsin from hepatopancreas of Pacific white shrimp. Journal of Food Biochemistry. 39: 388-397.
 32. Choi, S.M., Oh, E.S., Kim, D.S., Pyeun, J.H., Cho, D.M., Ahn, C.B., and Kim, H.R. 1998. Comparative Biochemical Properties of Proteinases from the Hepatopancreas of Shrimp.-I. Purification of Protease from the Hepatopancreas of *Penaeus japonicus*. Fisheries and Aquatic Sciences. 1: 2. 201-208.
 33. Green, N.M., and Neurath, H. 1953. The effects of divalent cations on trypsin. Journal of Biological Chemistry. 204: 379-390.
 34. Glusker, J.P., Katz, A.K., and Bock, C.W. 1999. Metal ions in biological systems. Rigaku Journal. 16: 2. 8-16.
 35. Abita, J.P., Delaage, M., Lazdunski, M., and Savrda, J. 1969. The Mechanism of Activation of Trypsinogen: The Role of the Four N-Terminal Aspartyl Residues. European Journal of Biochemistry. 8: 3. 314-324.
 36. Freitas-Júnior, A.C., Costa, H.M., Icimoto, M.Y., Hirata, I.Y., Marcondes, M., Carvalho Jr, L.B., Oliveira, V., and Bezerra, R.S. 2012. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. Food chemistry. 133: 4. 1596-1602.
 37. Rubingh, D.N. 1996. The influence of surfactants on enzyme activity. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 1: 5. 598-603.
 38. 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 Chemotherapy. 65: 10. 2108-2115.