[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.1.0]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119548]

استخراج و خالص‌سازی آنزیم تریپسین از روده ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) و محاسبه پارامترهای سینتیک و نیمه عمر آن

زهره حاسبی[۱]، علی معتمدزادگان*[۱]، رسول مدنی[۲]، عباس زمانی[۳]

*amotgan@yahoo.com

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران
۲- گروه بیوتکنولوژی مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، البرز، کرج، ایران
۳- گروه شیلات دانشکدهٔ منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه ملایر، همدان، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

در دهه‌های اخیر بازیافت و شناسایی آنزیم های گوارشی از ماهیان توجه زیادی را به خود جلب کرده است و کاربردهای جدیدی نیز برای این آنزیم ها در برخی از صنایع، از قبیل صنعت غذا و صنایع شوینده تعریف شده است. یکی از این آنزیم‌های استخراجی تریپسین است که در این پژوهش با استفاده از روش سه مرحله‌ای استخراج با بافر Tris–HCl ۵۰ میلی مولار (حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$ با pH ۷/۵)، ترسیب با سولفات آمونیوم ۶۰٪ اشباع و کروماتوگرافی غربالی Sephadex G-75 از روده ماهی سفید استخراج و خالص‌سازی شد و در نتیجه آن بازده ۵۲٪ و میزان تخلیص ۲۵/۷۸ برابر (fold) بدست آمد. پارامترهای سینتیکی V_{max} و K_m با استفاده از معادله میکائیلس-منتن برای سوبسترای BAPNA بترتیب ۲/۹۹۵۸ میکرومول بر میلی‌گرم در دقیقه و ۰/۵۳۵۰ میلی‌مول محاسبه گردید و Kcat نیز $6/2568\ S^{-1}$ بدست آمد. نیمه عمر تریپسین روده ماهی سفید نیز با استفاده از تبدیل نمودار فعالیت آنزیم (دقیقه) به نمودار لگاریتم طبیعی و محاسبه شیب آن برابر با ۵۸/۷۲ دقیقه برای سوبسترای BAPNA محاسبه شد. نتایج نشان داد که تریپسین روده ماهی سفید با سهولت و هزینه کم قابل جداسازی و خالص‌سازی است و از لحاظ سینتیکی کارایی بالاتری نسبت به تریپسین تجاری (خوک) دارد و قابلیت استفاده را در صنایع غذایی، صنایع شیلات، تهیه محیط کشت میکروبی و همچنین کاربرد درتحقیقات بیوتکنولوژی دارد.

لغات کلیدی: ماهی سفید، تریپسین، نیمه عمر، BAPNA

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.1.0]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119548]

مقدمه

ماهی سفید با نام علمی *Rutilus frisii Kutum* (Nordmann,1840) با نام انگلیسی Southern Caspian Kutum از ماهیان بومی و با ارزش نواحی جنوبی دریای خزر است و طول آن ۷۱-۴۲ سانتی‌متر است (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷). اغلب ماهیان صید شده در سواحل دریای خزر در سنین ۳ و ۴ سال قرار دارند. در این سن میانگین طول ماهی ۴۳۵-۳۸۵ میلی‌متر و میانگین وزن آن ۱۱۸۶-۸۱۵ گرم است (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷؛ دریانبرد و همکاران، ۱۳۹۸). زمان تخمگذاری این ماهیان در نیمه دوم فروردین و نیمه اول اردیبهشت است که در این زمان صید آن ممنوع است (Abd & Ghaninezhad, 2007; Ghaninejad *et al.*, 2010).

موجودات دریایی با تنوع وسیع ژنتیکی، علاوه بر تامین غذای انسان‌ها، منبعی برای استخراج مواد با ارزش نظیر انواع آنزیم‌ها هستند (Shahidi & Kamil, 2001). حدود ۵٪ از وزن بدن آبزیان را اندام‌های داخلی (امعاء و احشاء) آنها تشکیل می‌دهد و با توجه به این که منبعی غنی از آنزیم‌ها بشمار می‌روند، برگرداندن آنها به دریا می‌تواند منجر به برهم خوردن تعادل آنزیمی اکوسیستم دریایی گردد، اما در صورت استفاده از این اجزاء برای استخراج آنزیم، سودی مضاعف بدست خواهد آمد (Cancre *et al.*, 1999; Castillo-Yánez *et al.*, 2005; Shahidi and Kamil, 2001). استخراج آنزیم‌های گوارشی از ضایعات صید موجودات دریایی مزیت دیگری نیز دارد و آن عدم نیاز به انجام آزمایش‌های سم شناسی (توکسیکولوژیک) است. زیرا منبع استخراج آنزیم، بافت خوراکی حیوانی است (Shahidi & Kamil, 2001).

تریپسین یک آنزیم گوارشی متعلق به خانواده سرین پروتئازهاست (E.C.3.1.21.x) که در جایگاه فعال آنها استخلاف‌های سرین، هیستیدین و آسپارتیک دارند. در pH های خنثی و قلیایی، فعال و در pH های اسیدی، غیر پایدار و غیر فعال هستند (Simpson, 2000). این آنزیم پیوند بین سمت کربوکسیل آرژنین و لیزین را می شکند. فعالیت بهینه آن در دمای ۶۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۱۰-۷/۵ است (Bougatef *et al.*, 2007). تریپسین‌های موجود در ماهیان همگی ایزوآنزیم هستند و این آنزیم‌ها فعالیت اندوپپتیدازی دارند و وزن مولکولی آنها ۳۰-۲۰ کیلو دالتون است. آنها موجب شکست سوبستراهای سنتزی نظیر BAPNA (N_α-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) و TAME (N_α-*p*-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride) می‌شوند (Whitaker *et al.*, 2003).

در دهه‌های اخیر آنزیم‌های گوارشی بسیاری (نظیر تریپسین و پپسین) از بقایای صید دریایی و ماهیان شناسایی و استخراج شده‌اند (Ben Khaled *et al.*, 2008; Bougatef *et al.*, 2007; Castillo-Yánez *et al.*, 2005; Ktari *et al.*, 2012; Nasri *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2007; Van Hau and Benjakul, 2006; Villalba-Villalba *et al.*, 2013; Zamani *et al.*, 2014) اما در مورد ماهی سفید دریای خزر هیچ مطالعه آنزیمی انجام نشده است. لذا، هدف از انجام این تحقیق در درجه اول شناسایی و خالص‌سازی آنزیم یا آنزیم‌های گوارشی تولیدی در روده ماهی سفید دریای خزر و تعیین بازده بازیافت آن است. سپس پارامترهای سینتیکی و نیمه عمر آنزیم خالص‌سازی شده، بررسی می گردد تا بتوان آن را با آنزیم‌های تجاری موجود در بازار که اغلب از پانکراس خوک یا گاو تهیه می شوند، مقایسه کرد.

مواد و روش کار

تهیه روده ماهی سفید

اندام‌های داخلی ماهی سفید از بازار ماهی‌فروشان ساری (واقع در جاده قائمشهر- ساری) تهیه شدند. ماهیان مورد استفاده همگی نر بودند و سن آنها با توجه به طول و وزن ماهی ۴-۳سال تخمین زده شد. این اندام‌ها بلافاصله روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند و بعد از جداسازی دو سوم ابتدایی روده و پس از چندین مرتبه شستشو با آب مقطر سرد، بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور و با آسیاب الکتریکی (National، ژاپن) پودر شدند. روده آسیاب شده سپس با استون سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) به مدت یک دقیقه هموژن (Heidolph Diax 900، آلمان) شده و سپس با کاغذ صافی (واتمن شماره ۴، USA)، صاف گردید تا چربی آن حذف شود. روده چربی زدایی شده به مدت یک شب در دمای اتاق خشک شده و برای مراحل بعدی در فریزر ۸۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (زمانی و همکاران، ۱۳۹۰). تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده طی استخراج، خالص سازی و بررسی پارامترهای سینتیکی آنزیم از شرکت سیگما- آلدریچ تهیه شده‌اند.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.1.0]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119548]

تهیه عصاره خام آنزیمی (Crude extract) و خالص‌سازی

برای تهیه عصاره، پودر روده خشک شده درون بافر آغازگر شامل Tris–HCl ۵۰ میلی مولار و ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$ با pH ۷/۵ به نسبت ۱ به ۵۰ (وزنی / حجمی) قرار داده شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت در همزن مغناطیسی به آرامی همزده شد و سپس به مدت ۴۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد (Thermo IEC مدل B-22M زمینی قابل تنظیم، USA) تا مایع رویی (supernatant) آن جدا گردد. عصاره خام آنزیمی حاوی سولفات آمونیوم ۶۰٪ اشباعیت (w/v) برای مدت 2 ساعت در حضور یخ به آرامی ترسیب شد و به مدت ۴۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. قسمت رسوب یافته جمع‌آوری و در حداقل مقدار بافر (۵ میلی لیتر) حل شد. این سوسپانسیون پس از یک شب دیالیز شدن (D6191، ۱۲۰۰۰ دالتون، سیگما- آلدریچ)، با ستون کروماتوگرافی غربالی (Gel filtration) نوع Sephadex G-75 (۲× ۸۵ cm) جداسازی شد. سرعت شستشوی ستون با بافر آغازگر ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه بود. فراکسیون های ۳ میلی لیتری در خروجی ستون جمع آوری شدند. ویال‌های دارای فعالیت آنزیمی جمع آوری و لیوفلیزه گردیدند. پس از اندازه گیری پروتئین محلول هر مرحله از خالص سازی (Lowry *et al.*, 1951)، برای بررسی عملکرد تخلیص در هر یک از مراحل راسب سازی با آمونیوم سولفات و کروماتوگرافی غربالی از روابط ذیل استفاده گردید (Zamani *et al.*, 2014).

الف) فعالیت کل آنزیم تریپسین

$$\text{فعالیت تریپسین (U بر میلی لیتر)} = \frac{\text{جذب نوری ۴۱۰در} \times ۱۰۰۰ \times \text{نانومتر حجم مخلوط (میلی لیتر)}}{\times ۸۸۰۰ \times \text{زمان آزمون حجم آنزیم(میلی لیتر)}} \times \text{حجم کل}$$

$(cm^{-1}\ M^{-1})$ 8800 ضریب تاریکی برای ρ-nitroaniline است

ب) فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین:

$$\text{فعالیت اختصاصی(U بر میلی گرم)} = \frac{\text{فعالیت کل (U بر میلی لیتر)}}{\text{پروتئین کل (میلی گرم بر میلی لیتر)}}$$

ج) درصد بازده:

$$\text{بازده } (\%) = \frac{\text{فعالیت کل (فعالیت بر میلی لیتر)}}{\text{فعالیت کل عصاره خام آنزیم(میلی فعالیت بر لیتر)}} \times ۱۰۰$$

د) میزان تخلیص:

$$\text{تخلیص} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی(فعالیت بر میلی گرم)}}{\text{فعالیت اختصاصی عصاره خام آنزیم(میلی فعالیت بر گرم)}}$$

محاسبه سینتیک فعالیت

برای تعیین پارامترهای سینتیک، فعالیت آنزیم خالص با روش Lineweaver و Burk (۱۹۳۴)، سنجیده شد. برای این کار آنزیم خالص با غلظت های متفاوتی از سوبسترای BAPNA (شامل ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱۶، ۰/۳۲، ۰/۶۴، ۱/۲۸، ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار) به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و سپس فعالیت آنزیم اندازه‌گیری گردید. پارامترهای سینتیک شامل ثابت میکائیلس–منتن ظاهری (K_m) و بیشینه سرعت (V_{max}) طبق منحنی Michaelis و Menten (۱۹۱۳) محاسبه شدند. بدین ترتیب، در نموداری غلظت‌های مختلف سوبسترا با فعالیت اختصاصی آنزیمی مربوطه رسم شد و سپس با انتقال آن به نمودار لاینویور-بورک، به حالت خطی تبدیل شد و V_{max} و K_m از معادله خطی حاصله محاسبه شدند. در نمودار لاینویور به جای مقادیر غلظت سوبسترا، از $\frac{1}{\text{سوبسترا}}$ و به جای مقادیر

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.1.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119548]

فعالیت اختصاصی از $\frac{1}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم}}$ برای رسم نمودار استفاده می شود. سپس معادله خط حاصل به دست آمد و مقدار این دو پارامتر از رابطه های ذیل قابل محاسبه است:

$$Y = ax + b$$

$V_{max}= 1/b$ و $K_m = a \times V_{max}$ و ثابت کاتالیزوری (K_{cat}) از رابطه $\frac{Vmax}{[E]}$ محاسبه شد. برای محاسبه مقدار [E]، غلظت مولی آنزیم تخلیص شده بر اساس وزن مولکولی آن و غلظت آنزیم بکار رفته استفاده شد.

محاسبه نیمه عمر آنزیم

برای تعیین نیمه عمر، آنزیم خالص با غلظت استاندارد سوبسترای BAPNA در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و در فواصل زمانی مختلف (۹۰-۰ دقیقه) از آن نمونه‌برداری شد و فعالیت آنزیم تریپسین با اندازه‌گیری جذب در ۴۱۰ نانومتر (به دلیل آزاد سازی p-nitroaniline) محاسبه شد. سپس در نموداری زمان‌های نمونه‌برداری در مقابل فعالیت اختصاصی آنزیمی مربوطه رسم شد. فرمول ذیل رابطه فعالیت در هر زمان را با فعالیت اولیه آنزیم نشان می‌دهد:

$$[A] = [A]_0 \ e^{-k_1 t}$$

A = مقدار فعالیت در هر زمان، A_0 = در لحظه t = 0 و منظور از t زمان و K_1 همان ثابت واکنش است. سپس برای تبدیل نمودار حاصل به حالت خطی، با استفاده از داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم ln، مجدداً در مقابل زمان رسم شد و معادله شیب خط محاسبه گردید. رابطه ذیل همان فرمول فوق به شکل خطی شده است.

$$\ln[A] = -k_1 t + \ln[A]_0$$

شیب خط حاصل همان K- خواهد بود و مقدار نیمه عمر از رابطه ذیل قابل محاسبه است:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k1} = \frac{0.693}{k}$$

نتایج

مراحل استخراج و خالص سازی آنزیم

آنزیم تریپسین از عصاره خام حاصل از روده ماهی سفید بوسیله راسب سازی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی غربالی مولکولی Sephadex G-75 خالص سازی شد که نتایج حاصل از هر مرحله خالص سازی در جدول ۱ ارائه شده است. میزان تخلیص آنزیم تریپسین نسبت به نمونه عصاره خام ۱/۹۸ برابر در نمونه حاصل از ترسیب و دیالیز افزایش یافت و میزان بازده آن ۴۰ درصد گردید . بعد از تزریق نمونه حاصل از دیالیز به ستون Sephadex G-75 و جمع آوری فراکسیون‌ها، جذب پروتئین این فراکسیون‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد که نشان داد سه نقطه اوج پروتئینی در نمونه وجود دارد (شکل ۱). بعد از سنجش فعالیت آنزیم تریپسین مشخص گردید که تنها فراکسیون‌های نقطه اوج دوم دارای فعالیت تریپسین است. نتایج الکتروفورز SDS-PAGE این بخش از خروجی ستون Sephadex G-75 یک باند پروتئینی خالص شده را نشان داد. نتایج حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون نشان داد که در این مرحله میزان تخلیص آنزیم تریپسین نسبت به نمونه عصاره خام اولیه ۲۵/۸ برابر افزایش یافت و میزان بازده آن ۵۲ درصد گردید.

محاسبه سینتیک فعالیت

رفتار سینتیک آنزیم تریپسین روده ماهی سفید و تریپسین تجاری (با منشا پانکراس خوک) در شکل۲ نشان داده شده است. با استفاده از این شکل و معادلات بدست آمده از آن ها، مقدار V_{max} برای تریپسین روده ماهی سفید و تریپسین تجاری به ترتیب ۲/۹۹۵۸ و ۰/۰۸۷۶ میکرومول بر میلی گرم در دقیقه (µmol/mg.min) و مقدار K_m برای تریپسین روده ماهی سفید و تریپسین تجاری بترتیب ۰/۵۳۵۰ و ۰/۱۷۰۱ میلی مول محاسبه شد که در جدول ۲ ارائه شده است. مقدار V_{max} در تریپسین روده ماهی سفید بسیار بالاتر از خوک بود که نشان‌دهنده فعالیت بالاتر آنزیم تریپسین روده ماهی سفید در مقایسه با آنزیم تجاری است. همچنین مقدار K_m تریپسین روده ماهی سفید اندکی بیشتر از تریپسین تجاری بود. ثابت کاتالیزوری (K_{cat}) برای تریپسین روده ماهی بسیار بالاتر از تریپسین تجاری بود و کارایی کاتالیزوری آنزیم تریپسین روده ماهی سفید بالاتر از تریپسین تجاری بود.

محاسبه نیمه عمر آنزیم

فعالیت آنزیم تریپسین روده ماهی سفید در زمان های مختلف در شکل ۳ نشان داده شده است. با استفاده از این شکل و معادلات بدست آمده از آنها مقدار k برای تریپسین روده ماهی سفید ۰/۰۱۱۸ بدست آمد و با قرار دادن این مقدار در معادله $t_{1/2}$ و تقسیم عدد ۰/۶۹۳ بر k، مقدار نیمه عمر برابر با ۵۸/۷۲ دقیقه خواهد بود.

$$T1/2 = \ln 2/k1 = \text{۰/۶۹۳/ ۰/۰۱۱۸} = \text{۵۸/۷۲ دقیقه}$$

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.1.0]

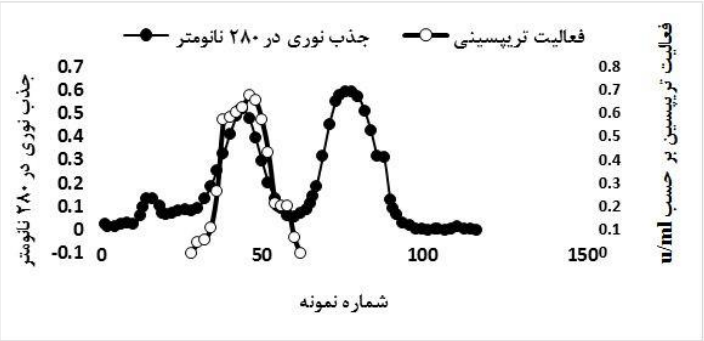
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119548]

جدول ۱: مراحل خالص سازی آنزیم تریپسین از روده ماهی سفید *Rutilus frisii* Kutum

Table 1: Purification steps of Trypsin from *Rutilus frisii* Kutum intestine

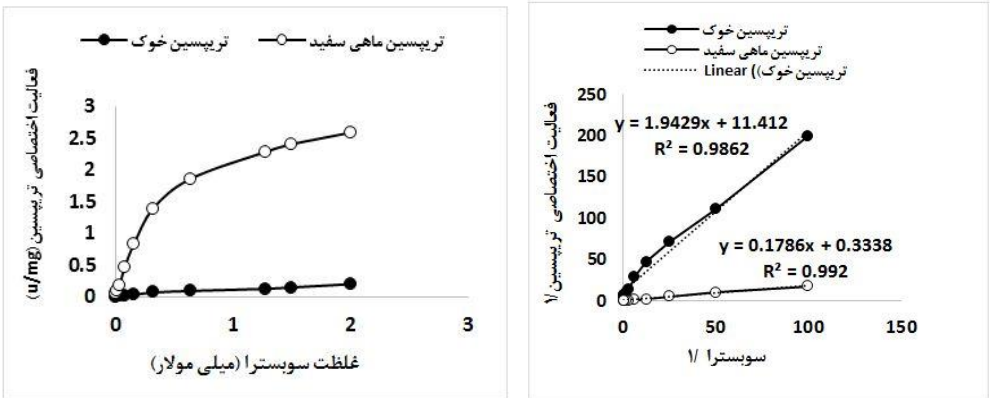
فراکسیون	حجم کل (میلی لیتر)	پروتئین کل (میلی‌گرم)	فعالیت کل (U)	فعالیت اختصاصی (U بر میلی‌گرم)	بازده (٪)	میزان تخلیص
عصاره	۲۰۰	۵۴۰	۲۴/۵۶۰	۰/۰۹۶	۱۰۰	۱
ترسیب	۲۰	۷۹/۲	۱۰/۰۴۸	۰/۱۹	۴۰	۱/۹۸
ژل	۴۸	۵/۲۸	۱۲/۸۹۰	۲/۴۷۵	۵۲	۲۵/۷۸

U = میکرومول های نیترو آنیلین آزاد شده از BAPNA (N_{α}-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) به ازاء هر دقیقه



شکل۱: کروماتوگرام تریپسین روده ماهی سفید در ستون .Sephadex G-75. سوسپانسیون حاصل از فراکسیون ۶۰٪ اشباعیت آمونیوم سولفات در ستون با ابعاد cm ۲ × ۸۵ و با سرعت جریان ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه بار گذاری شده و فراکسیون های ۳ میلی لیتری جمع‌آوری شد.

Figure 1:Chromatogram of Trypsin from Caspian kutum intestine in Sephadex G-75 column. 60% saturated ammonium sulfate fraction was loaded onto a column (80 × 2 cm) at a flow rate of 0.5 ml / min and 3 ml fractions were collected.



شکل ۲: الف) نمودار فعالیت تریپسین روده ماهی و تریپسین تجاری (خوک) در مقابل غلظت سوبسترا (میکائلس منتون)، ب) همان شکل الف تبدیل شده به شکل لاینویور – بورک

Figure2: a) Activity of kutum intestine Trypsin and commercial Trypsin (porcine) at different substrate concentrations (Michaelis- Menten), b) figure a converted to Lineweaver-Burk model

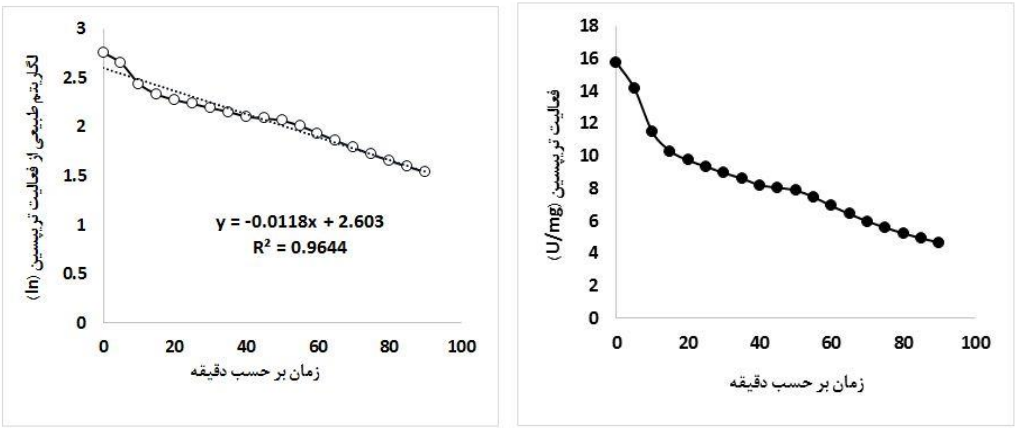
[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.1.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119548]

جدول ۲: پارامترهای سینتیک محاسبه شده برای تریپسین روده ماهی سفید و تریپسین تجاری (خوک)

Table 2: Calculated kinetic parameters of Trypsin from Caspian kutum intestine and commercial (porcine) Trypsin..

نوع تریپسین	V_{max} (میکرومول/میلی گرم دقیقه)	K_m (میلی مولار)	K_{cat} (بر ثانیه)	K_{cat}/K_m (۱/ میلی مولار. ثانیه)
ماهی سفید	۲/۹۹۵۸± ۰/۰۰۴۵^{a}	۰/۵۳۵۰± ۰/۰۰۵^{a}	۶/۲۵۶۸± ۰/۰۲۷^{a}	۱۱/۶۹۴± ۰/۸۹^{a}
تجاری (پانکراس خوک)	۰/۰۸۷۶± ۰/۰۰۳^{b}	۰/۱۷۰۱± ۰/۰۰۳^{b}	۰/۰۳۴± ۰/۰۰۰۹^{b}	۰/۱۹۹۸± ۰/۰۲^{b}

حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار می باشد ($p <$ ۰/۰۵).



شکل۳: الف) فعالیت آنزیم تریپسین ماهی سفید در مقابل زمان، ب) لگاریتم طبیعی فعالیت تریپسین در مقابل زمان که برای خطی کردن و محاسبه معادله و شیب خط به کار می رود.

Figure 3: a) Caspian kutum Trypsin activity against time, b) ln logarithm of Trypsin activity against time which is used to linearize and calculate the equation and slope of the line.

بحث

مراحل استخراج و خالص سازی آنزیم

ترسیب با آمونیوم سولفات یکی از مراحل ابتدائی برای تخلیص پروتئین‌ها و جداسازی برخی از پروتئین‌های مزاحم می‌باشد (Khantaphant & Benjakul, 2010). چون آمونیوم سولفات پس از انحلال در آب یون‌هایی ایجاد می‌کند که با پروتئین بر سر اتصال به آب رقابت می‌کند و در غلظت‌های بالا می‌تواند مولکول‌های آب را از دسترس پروتئین خارج نماید، از این روش استفاده می‌شود. این امر موجب کاهش حلالیت پروتئین و در نتیجه رسوب آن می‌شود. در عمل میزان آمونیوم سولفات افزوده شده از طریق جداول خاص محاسبه شد و در سه مرحله افزوده گردید: مرحله اول افزایش غلظت اشباعیت از صفر به ۳۰٪ که پروتئین های آبگریزتر رسوب کردند. مرحله دوم افزایش غلظت اشباعیت از ۳۰٪ به ۶۰٪ که اغلب پروتئین ها رسوب کردند. مرحله سوم افزایش اشباعیت از ۶۰٪ به ۹۰٪ که تقریباً تمام پروتئین موجود در محلول رسوب نمودند (Burgess, 2009; Wingfield, 1998).

پژوهشگران زیادی با استفاده از این روش به خالص‌سازی و ترسیب آنزیم‌ها از ماهیان مختلف پرداخته‌اند. برای مثال، Castillo-Yánez و همکاران (۲۰۰۵) برای ترسیب تریپسین از ضمایم پیلوریک ماهی ساردین مونتری (*Sardinops sagax caerulea*) این محدوده را ۷۰-۳۰ درصد تخمین زدند و میزان تخلیص و بازده در این مرحله را بترتیب ۱/۳ و ۷۳ درصد گزارش کردند. Bougatef و همکاران (۲۰۰۷) مقدار سولفات آمونیوم مورد نیاز برای استخراج تریپسین از ضمایم پیلوریک ماهی ساردین (*Sardina pilchardus*) را ۶۰-۳۰ درصد اشباعیت و میزان تخلیص و بازده را بترتیب ۳/۵۸ و ۴۰/۴۲ درصد گزارش کردند.

کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون بر مبنای قابلیت ورود مولکول‌ها به درون منافذ ژل بستر استوار است و ترکیبات با وزن مولکولی

زیاد نمی‌توانند وارد حفره‌ها شوند در نتیجه، بسرعت همراه فاز متحرک از ستون خارج می‌گردند، ولی مولکول‌های کوچکتر در درون حفره‌ها گیر می افتند و بترتیب وزن مولکولی و به صورت نسبتاً خالص از ستون خارج می شوند. نتایج حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون توسط سایر محققان به شرح ذیل است: Villalba-Villalba و همکاران (۲۰۱۳) برای گربه ماهی (*P. disjunctivus*, Weber, 1991) میزان تخلیص و بازده این مرحله را ۴/۸۴ و ۲۸/۰۶ درصد گزارش کردند. Souza و همکاران (۲۰۰۷) در بز ماهی خالدار (*Pseudupeneus maculatus*) میزان تخلیص و بازده را ۵۷/۷ و ۲۶/۱ درصد و Ben Khaled و همکاران (۲۰۰۸) در ساردین (*S. aurita*) میزان تخلیص و بازده این مرحله را ۴/۴۲ و ۳۴/۷ درصد گزارش کردند.

محاسبه سینتیک فعالیت

پارامترهای سینتیک آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی سفید و تریپسین تجاری نشان داد که تریپسین روده ماهی سرعت فعالیت بالاتری نسبت به تریپسین تجاری دارد. لذا، می‌تواند با سرعت بیشتری سوبسترای خود را شکسته و فرآورده تولید نماید. K_m نشان‌دهنده تمایل ترکیب آنزیم با سوبسترا می‌باشد و هرچه مقدار عددی آن بزرگتر باشد، آنزیم سریعتر به بیشینه فعالیت خود می‌رسد. ثابت کاتالیزوری (K_{cat}) (عدد تبدیل یک آنزیم) به ماکزیمم تعداد مولکولهای سوبسترا گفته می‌شود که می‌تواند به ازاء هر مولکول آنزیم در واحد زمان به محصول تبدیل شود. آنزیم تریپسین روده ماهی سفید ثابت کاتالیزوری بالاتری نسبت به تریپسین تجاری (خوک) داشت و کارایی کاتالیزوری آن نیز بالاتر از تریپسین تجاری بود. این نتایج با نتایج بدست آمده توسط Ahsan و Watabe (۲۰۰۱) بر آنزیم تریپسین ماهی آنچوی ژاپنی *(E. japonicas)* و تریپسین گاوی همخوانی دارد. آنها گزارش نمودند که در ماهی آنچوی دو ایزوفرم از آنزیم تریپسین شناسایی شده است که ثابت کاتالیزوری یکی از ایزوفرم‌ها بالاتر از ثابت کاتالیزوری برای آنزیم تریپسین گاوی بود و کارایی کاتالیزوری هر دو ایزوفرم بسیار بالاتر از کارایی کاتالیزوری آنزیم تریپسین گاوی بود.

در مقایسه با تریپسین سایر ماهیان نیز k_m و K_{cat} تریپسین روده ماهی سفید بزرگتر از ماهی سرخو (Van Hau & Benjakul, 2006) می‌باشد و در مقایسه با ماهی زبرا بلنی (Ktari *et al.*, 2012) k_m تقریباً برابر و K_{cat} بزرگتر است.

بنابراین، آنزیم تریپسین روده ماهی سفید میل ترکیبی بالاتری برای هیدرولیز سوبسترای BAPNA نسبت به تریپسین ماهیان مذکور دارد. کارایی کاتالیزوری آنزیم تریپسین تخلیص شده از روده ماهی سفید نیز بالاتر از آنزیم تریپسین تخلیص شده از ماهیان سرخو، ساردین (*S. aurita*) (Ben Khaled *et al.*, 2008) و زبرا بلنی بود. Ahsan و Watabe (۲۰۰۱) و Kanno و همکاران (۲۰۱۱) در توجیه تفاوت پارامترهای سینتیک تریپسین آبزیان در مقایسه با جانوران خشکی بیان کردند که در آبزیان بنظر می‌رسد به دلیل پائین بودن دمای محیط اطراف، آنزیم های گوارشی نیاز به ساختار انعطاف پذیرتری دارند تا بتوانند خود را با تغییرات دمای محیط اطراف تطبیق دهند و در دمای پائین محیط پیرامون خود توانایی متصل شدن را به سوبسترا داشته باشند.

محاسبه نیمه عمر آنزیم

نیمه عمر آنزیم "مدت زمان لازم برای کاهش فعالیت آنزیم در محیط واکنش به نصف فعالیت اولیه" می‌باشد. آنزیم ها به دلیل ساختار پروتئینی خود ممکن است بر اثر عواملی نظیر دماهای بالا، انجماد، فشار، تغییرات شدید pH و ... دچار تغییر شکل ساختاری و در نتیجه افت فعالیت شوند (Chaplin & Bucke, 1990). Pazhang و همکاران (۲۰۱۶) در تحقیقی بر اثر سوربیتول و گلیسرول در پایداری تریپسین تجاری خوک، نیمه عمر آن را زمانی که هیچ افزودنی به آن اضافه نشده بود، ۴۳/۳ دقیقه گزارش کردند. سوبسترای این آزمایش کازئین و دمای انجام آن ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. einrich (۱۹۷۲) نیمه عمر تریپسین در مجاورت سوبسترای TAME را در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه گزارش کرده و نیمه عمر برای سوبسترای BAPNA را در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۵۰٪ DMSO، حدود یک ساعت تخمین زده است. آنچه مسلم است، منشأ تریپسین استخراجی و به تبع آن دما و pH آزمایش، حضور سایر مواد پایدار یا ناپایدار کننده، سوبسترای مورد کاربرد، همگی بر نتیجه و محاسبات تاثیر خواهند گذاشت.

نتایج خالص‌سازی و بررسی‌های سینتیک و نیمه عمر آنزیم تریپسین روده ماهی سفید نشان داد که این آنزیم با سهولت و هزینه کم قابل جداسازی و خالص سازی است و از لحاظ سینتیک نسبت به تریپسین تجاری (خوک) از کارایی بالاتری برخوردار است و قابلیت استفاده را در صنایع غذایی، صنایع

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.1.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119548]

شیلات، صنایع تهیه محیط کشت میکروبی و همچنین کاربرد درتحقیقات بیوتکنولوژی دارد.

تشکر و قدردانی

از اساتید و کارکنان محترم بخش بیوتکنولوژی موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

دریانبرد، غ.، فضلی، ح.، تقوی مطلق، س. ا. ا.، بندانی، غ.، پورغلامی مقدم، ا.، ۱۳۹۸. سن، رشد و مقدار زی‌توده ماهی سفید (Rutilus frisii, Kamensky., 1901) در آبهای ایرانی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران. ۲۸ (۴) :۷۹-۸۷. (DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119433)

زمانی ع.، رضایی م.، مدنی ر.، ۱۳۹۰. اثرات برخی از عوامل بیوشیمیایی بر فعالیت آنزیم تریپسین روده و ضمائم پیلوریک کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) برای جلوگیری از پدیده هضم دیواره شکمی در محیط in vitro. مجله علمی شیلات ایران. ۲۰ (۴) :۵۳ - ۶۲. (DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110023)

عبدلی ا.، نادری م.، ۱۳۸۷. تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. انتشارات علمی آبزیان، تهران : ۱۳۷-۱۴۰

Abd, A.S. and Ghaninezhad, D., 2007. Stock assessment of the Caspian Sea in Kutum (*Rutilus frisii* Kutum) Iranian coastal waters of the Caspian Sea.

Ahsan, M.N. and Watabe, S., 2001. Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*. *Journal of protein chemistry*, *20*(1): 49-58. DOI:10.1023/A: 1011005104727

Ben Khaled, H., Bougatef, A., Balti, R., Triki-Ellouz, Y., Souissi, N. and 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. DOI:10.1002/jsfa.3386

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*(1): 343-350. DOI:10.1016/j.foodchem. 2006.05.050

Burgess, R.R., 2009. Chapter 20 Protein Precipitation Techniques. In R. R. Burgess and M. P. Deutscher (Eds.). Academic Press. *Methods in Enzymology*, 463: 331-342.

Cancre, I., Ravallec, R., Van Wormhoudt, A., Stenberg, E., Gildberg, A. and Le Gal, Y., 1999. Secretagogues and growth factors in fish and crustacean protein hydrolysates. *Marine Biotechnology*, *1*(5): 489-494. DOI:10.1007/ PL00011805

Castillo-Yánez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F.L. and 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. DOI:10.1016/j.cbpc.2004.09.031

Chaplin, M.F. and Bucke, C., 1990. *Enzyme Technology*: Cambridge University Press.

Ghaninejad, D., Abdolmalaki, S. and Kuliyev, Z.M., 2010. Reproductive biology of the golden grey mullet, *Liza aurata* in the Iranian coastal waters of the Caspian Sea. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *9*(3): 402-411.

Kanno, G., Kishimura, H., Ando, S., Klomklao, S., Nalinanon, S., Benjakul, S. and Saeki, H., 2011. Structural properties of trypsin from cold-adapted fish, arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*). *European Food*

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.1.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119548]

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.1.0]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119548]

Research and Technology, 232(3): 381-388. DOI:10.1007/s00217-010-1404-6

Khantaphant, S. and Benjakul, S., 2010. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry, 120*(3): 658-664. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.09.098

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. DOI:10.1016/ j.foodchem.2011.07.015

Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society, 56*(3): 658-666. DOI:10.1021/ja01318a036

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*(1): 265-275.

Michaelis, L. and Menten, M.L., 1913. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift, 49*(333-369): 352.

Nasri, R., Sila, A., Ktari, N., Lassoued, I., Bougatef, A., Karra-Chaâbouni, M. and Nasri, M., 2012. Calcium dependent, alkaline detergent-stable trypsin from the viscera of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*): Purification and characterization. *Process Biochemistry, 47*(12): 1957-1964. DOI:10.1016/ j.procbio.2012.07.002

Pazhang, M., Mehrnejad, F., Pazhang, Y., Falahati, H. and Chaparzadeh, N., 2016. Effect of sorbitol and glycerol on the stability of trypsin and difference between their stabilization effects in the various solvents. *Biotechnology and applied biochemistry, 63*(2): 206-213. DOI: 10.1002/bab.1366

Shahidi, F. and Kamil, Y.J., 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology, 12*(12): 435-464. DOI:10.1016/S0924-2244(02)00021-3

Simpson, B.K., 2000. Digestive proteinases from marine animals. *Food science and technology-new york-marcel dekker*, 191-214.

Souza, A.A., Amaral, I.P., Santo, A.R.E., Carvalho, L.B. and Bezerra, R.S., 2007. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chemistry, 100*(4): 1429-1434. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.12.016

Van Hau, P. and Benjakul, S., 2006. Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper (*Pricanthus macracanthus*). *Journal of Food Biochemistry, 30*(4): 478-495. DOI:10.1111/j.1745-4514. 2006.00089.x

Villalba-Villalba, A.G., Ramírez-Suárez, J.C., Valenzuela-Soto, E.M., Sánchez, G.G., Ruiz, G.C. and Pacheco-Aguilar, R., 2013. Trypsin from viscera of vermiculated sailfin catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991: Its purification and characterization. *Food Chemistry, 141*(2): 940-945. DOI:10.1016/ j.foodchem.2013.03.078

Whitaker, J.R., Voragen, A.G. and Wong, D.W., 2003. *Handbook of food enzymology*: Marcel Dekker.

Wingfield, P., 1998. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols in Protein Science, 13*(1): A.3F.1-A.3F.8. DOI: 10.1002/0471140864.psa03fs13

compatibility with oxidants and surfactants. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *23*(3): 237-252. DOI:10.1080/10498850.2012.712630.

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

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.1.0]
[ ]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119548

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.1.0]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119548]

Extraction and purification of Trypsin from intestine of Caspian kutum (*Rutilus frisii* Kutum) and Calculation of its Kinetic parameters and Half Life

Hasebi Z.[1]; Motamedzadegan A.[1]; Madani, R.[2]; Zamani A.[3]

*amotgan@yahoo.com

1-Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran.

2-Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3-Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Hamedan, Iran.

Abstract

In recent decades, recovery and identification of digestive enzymes from fish has attracted much attention and new applications for these enzymes have been defined in some industries, such as the food and detergent industries. One of these recovered enzymes is Trypsin, which in this study was extracted and purified from the intestine of Caspian kutum using a three-step extraction method with 50 mM Tris-HCl buffer (containing 10 mM $CaCl_2$ pH 7.5), 60% ammonium sulfate precipitation and Sephadex G-75 gel chromatography. The Result was an enzyme with 52% yield and a purity of 25.78-fold. The kinetic parameters of V_{max} and K_m for BAPNA substrate were calculated using the Michaelis-Menten equation and were 2.9958 µmol/mg.min and 0.5350 mM respectively and K_{cat} was 6.2568 S^{-1}. The kutum Trypsin's half-life was also calculated as 58.72 min for BAPNA substrate using the conversion of the enzyme activity graph (in minutes) to natural logarithmic graph and determining its slope. The results showed that it is easy and economical to extract and purify Trypsin from intestine of Caspian kutum and it is kinetically more effective than commercial Trypsin. It is suitable for use in the food industries, fish processing industry, culture media production as well as application in biotechnology research.

Keywords: kutum, Trypsin, Half-life, BAPNA

*Corresponding author