مقاله علمی – پژوهشی:

فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل ماهی (*Huso huso*) تحت تأثیر برخی عوامل فیزیکی و شیمیایی

عباس زمانی*[۱]، مریم خواجوی[۱]

*a.zamani@malayeru.ac.ir

۱-گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، همدان.

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

چکیده

در مطالعه حاضر، عوامل فیزیکی و شیمیایی شامل تعیین دما و pH بهینه و اثر بازدارنده‌های آنزیمی، یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده بر میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل ماهی (*Huso huso*) بررسی گردید. براساس یافته‌های این تحقیق، دما و pH بهینه فعالیت آنزیم کیموتریپسین به‌ترتیب ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۸ بود و در دمای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آن به‌شدت کاهش یافت. بازدارنده‌ها شامل SBTI، TLCK،PMSF، پارا آمینوبنزآمیدین، TPCK، ' یدواستیک اسید و EDTA بطور معنی‌داری از فعالیت آنزیم جلوگیری کردند که بازدارنده‌های PMSF، SBTI و TPCK اثر مهارکنندگی کاملی بر فعالیت آنزیم داشتند (P<۰/۰۵). یون‌های $^{+}$ $^{+}$ سبب افزایش معنی‌دار و یون‌هایCu^{2+}،Ba^{2+}، Fe^{2+}،Zn^{2+}،Co^{2+} $^{+}$ باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم گردیدند (P<۰/۰۵). یون‌های$^{+}$ وNa^{+} اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم نشان ندادند (P>۰/۰۵). فعالیت آنزیم کیموتریپسین در حضور سورفاکتانت‌های ساپونین و سدیم کولات افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) و در حضور سدیم دودسیل سولفات و عوامل اکسیدکننده (سدیم پربورات و پراکسید هیدروژن) کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) نشان داد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد فعالیت آنزیم کیموتریپسین در روده فیل‌ماهی در حضور بازدارنده‌ها، یون‌های فلزی (غیر $^{+}$،Mg^{2+}، K^{+} وNa^{+})، سدیم دودسیل سولفات، سدیم پربورات و پراکسید هیدروژن کاهش معنی‌دار و در حضور Ca^{2+} وMg^{2+}، ساپونین و سدیم کولات افزایش معنی‌داری داشت که می‌تواند در ارزیابی اثرگذاری آنها بر فعالیت بهینه این آنزیم در فیزیولوژی گوارش فیل ماهی موثر باشد.

لغات کلیدی: روده، کیموتریپسین، فیل ماهی، عوامل فیزیکی و شیمیایی

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

مقدمه

امروزه یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های جهانی افزایش بیش از حد مواد آلاینده و سمی در محیط‌های آبی است که به اشکال مختلف مانند فاضلاب، پساب‌های مواد آلی و معدنی کارخانجات، مواد شیمیایی اعم از فلزات، نشت نفت و میکروپلاستیک‌ها به درون منابع آبی رها گردیده است و بعد از ورود به زنجیره غذایی اکوسیستم، اثرات سوء مستقیم یا غیرمستقیم بر حیات آبزیان به‌ویژه ماهیان دارند (قلی‌پور و همکاران، ۱۳۹۶؛ راستا و همکاران، ۱۳۹۹). در سال‌های اخیر، استفاده از منابع آبی با رشد چشمگیر صنعت آبزی‌پروری افزایش یافته است که اهمیت کیفیت آب مورد استفاده را بیش از پیش نمایان می‌سازد (کریمیان و همکاران، ۱۳۹۹). لذا، بررسی نقش مواد شیمیایی موجود در آب بر شاخص‌های فیزیولوژیک از جمله آنزیم‌ها مهم و ضروری می‌باشد (باقری و هدایتی، ۱۳۹۸). آنزیم‌ها، ماکرومولکول‌های پروتئینی هستند که به عنوان کاتالیزور در واکنش‌های شیمیایی شرکت می‌کنند و نقش مهمی در کاهش انرژی مورد نیاز برای انجام واکنش دارند (Zamani and Benjakul, 2016; De Freitas-Júnior *et al*., 2021). آنزیم‌های گوارشی دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که در فرایند گوارش شرکت می‌کنند و سبب تجزیه ماکرومولکول‌ها به عناصر سازنده کوچکتر می‌شوند تا شرایط برای جذب آنها در بدن تسهیل شود (Kolkovski, 2001; Yufera and Darias, 2007). این آنزیم‌ها ظرفیت گوارش در جانور مورد مطالعه نظیر ماهی را منعکس می‌کنند و می‌توانند شاخص تغذیه‌ای مناسبی در مراحل مختلف رشد ماهی باشند (Chong *et al*., 2002). علاوه‌براین، ارزیابی فعالیت آنزیم‌های گوارشی به عنوان یک روش بیوشیمیایی ساده و مطمئن می‌تواند اطلاعات مفیدی درباره فیزیولوژی گوارش در ماهی ارائه کند (Twining *et al*., 1983).

پروتئازهای گوارشی از مهم‌ترین دسته آنزیم‌ها هستند که نقش مهمی در شکست پیوندهای پپتیدی در مولکول پروتئین دارند (Garcia-Carreno *et al*., 1993). یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های پروتئازی، کیموتریپسین است که به دسته پروتئازهای سرین تعلق دارد و به صورت یک پیش‌آنزیم در سلول‌های پانکراس تولید شده و به دوازدهه ترشح می‌شود. این آنزیم فعالیت آندوپپتیدازی دارد و پیوند پپتیدی در زنجیره پروتئینی را از سمت گروه کربوکسیل جایی‌که اسیدهای آمینه هیدروفوبیک (تیروزین، فنیل آلانین و تریپتوفان) قرار دارد، هیدرولیز می‌کند (Castillo-Yanez *et al*., 2005). این آنزیم در گونه‌های مختلفی از ماهیان مانند دیسکاس (*Symphysodon aequifasciata*)، ساردین (*Sardinops sagax caeruleus*)، کاراس (*Carassius auratus*)، آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و اوزون برون (*Acipenser stellatus*) گزارش شده است (Chong *et al*., 2002; Castillo-Yanez *et al*., 2005; Yang *et* 2009; Zamani *et al*., 2009; Golchinfar *et al*., 2011; Ghasemi *et al*., 2020). غلظت آنزیم کیموتریپسین در بافت روده تقریباً ۱۰۵ برابر بالاتر از بافت‌های غیر روده‌ای تخمین زده می‌شود و میزان فعالیت و غلظت این آنزیم با توجه به گونه و زیستگاه ماهی متغیر است (Von Elert *et al*., 2004; De la Parra *et al*., 2007). فعالیت این آنزیم همانند سایر ماکرومولکول‌های زیستی تحت‌تأثیر برخی عوامل شیمیایی مانند یون‌های فلزی، بازدارنده‌ها، سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده قرار دارد که می‌تواند فرایند گوارش در موجود آبزی نظیر ماهی را با مشکل مواجه کند. لذا، بررسی فعالیت آنزیم کیموتریپسین تحت تأثیر عوامل شیمیایی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص ظرفیت گوارشی ماهیان پرورشی فراهم نماید. یکی از مهم‌ترین این ماهیان، گونه فیل ماهی (*Huso huso*) متعلق به خانواده تاسماهیان (Acipenseridae) است که در سال‌های اخیر پرورش تجاری آن همانند سایر گونه‌های ماهیان خاویاری به دلیل تقاضای بالا برای محصولاتی مانند خاویار، گوشت، پوست و غضروف توسعه یافته و بر اساس سالنامه آماری سازمان شیلات ایران میزان تولید این ماهیان طی سال‌های ۹۹-۱۳۸۸ از ۳۶۳ تن به ۳۵۰۳ تن افزایش یافته است (سازمان شیلات ایران، ۹۹-۱۳۸۸). هدف از مطالعه حاضر، تعیین دما و pH بهینه و بررسی اثر یون‌های فلزی، بازدارنده‌های آنزیمی، سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسید کننده بر میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

از روده فیل ماهی پرورشی می‌باشد تا بتوان اطلاعات ارزشمندی در خصوص ظرفیت گوارشی ناشی از فعالیت این آنزیم به‌دست آورد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه از ماهی

در این مطالعه، امعاء و احشاء فیل‌ماهی پرورشی ۳ ساله با وزن ۸ کیلوگرم از مزرعه پرورشی در استان مازندران تهیه شده و در داخل یک ظرف یونولیتی با نسبت ۱ به ۲ با یخ مخلوط گردیده و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس روده از امعاء و احشاء ماهی در حضور یخ جدا شده و بعد از شستشو با آب مقطر سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) بلافاصله در۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Zamani *et al.*, 2017).

آماده‌سازی عصاره آنزیمی

نمونه روده پس از خروج از فریزر برای مدت ۲ ساعت در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند تا از حالت انجماد خارج شود. سپس جهت چربی‌زدایی، نمونه با نسبت ۱ به ۳ با استون سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) مخلوط شد و برای مدت ۱ دقیقه عمل همگن‌سازی با هموژنایزر درحضور یخ انجام شد. سپس نمونه همگن شده بوسیله کاغذ صافی واتمن (شماره ۲) فیلتر شده و مواد باقیمانده روی فیلتر چندین مرتبه با استون سرد شستشو شدند تا عمل چربی‌زدایی بخوبی انجام شود. سپس مواد باقیمانده روی فیلتر برای مدت یک شبانه روز در دمای اتاق قرار گرفت تا کاملاً خشک شود (Zamani *et al.*, 2014). پودر خشک شده با بافر ۵۰ میلی مولار تریس-HCl و pH ۷/۵ (حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$ و ۰/۵ مولار NaCl) با نسبت ۱ به ۵۰ ترکیب شده و برای مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد روی همزن مغناطیسی به آرامی مخلوط شدند. سپس مخلوط حاصله برای مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ گردید و محلول رویی به عنوان عصاره خام آنزیمی در نظر گرفته شد (Khantaphant and Benjakul, 2010).

سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین

برای سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین از روش Tsai و همکاران (۱۹۸۶) و از سوبسترای SAPNA (succinyl-(Ala)$_2$-Pro-phe-*p*-nitroanilide) استفاده گردید. در این روش، ۱۰ µl عصاره آنزیمی با ۹۹۰ µl محلول سوبسترا- بافر (۰/۱ میلی مولار SAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس-HCl، pH ۸ حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$) مخلوط گردید و میزان افزایش جذب در طول موج ۴۱۰nm در فواصل ۳۰ ثانیه و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با اسپکتروفتومتر ثبت گردید. نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی تهیه گردید، با این تفاوت که به جای نمونه آنزیمی از آب مقطر استفاده شد. برای محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم کیموتریپسین از فرمول ذیل استفاده گردید:

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

در این فرمول ۸۸۰۰ بیانگر ضریب تاریکی برای پارا - نیتروآنیلین می‌باشد که محصول هیدرولیز سوبسترای SAPNA به‌وسیله آنزیم کیموتریپسین است.

سنجش پروتئین محلول

برای سنجش میزان پروتئین محلول از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده گردید. در این روش از آلبومین سرم گاوی با غلظت ۱ mg / ml به عنوان استاندارد استفاده شد و قرائت نوری نمونه‌ها در ۷۵۰ nm با اسپکتروفتومتر انجام شد.

دما و pH بهینه

برای تعیین دمای بهینه، ابتدا ۱۰µl نمونه آنزیمی با ۹۹۰µl از محلول سوبسترا- بافر (۰/۱ میلی مولار

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

SAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس- HCl، pH۸ ۱۰ میلی ترکیب شد و فعالیت آنزیم برای مدت ۱۰ دقیقه در فواصل ۳۰ ثانیه در دماهای ۱۰، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد با اسپکتروفتومتر سنجش گردید. برای تعیین pH بهینه، ابتدا ۱۰µl نمونه آنزیمی با ۹۹۰µl از محلول سوبسترا- بافر با pH های مختلف (۰/۱ میلی مولار SAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار استات سدیم با pH ۶-۴، بافر ۵۰ میلی مولار تریس با pH۷-۹ و بافر ۵۰ میلی مولار گلایسین با pH۱۱-۱۰؛ تمام بافرها حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$ بودند) ترکیب شده و سپس فعالیت آنزیم کیموتریپسین در طول موج ۴۱۰nm در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه در فواصل ۳۰ ثانیه با اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Castillo-Yanez *et al.*, 2005).

یون‌های فلزی

اثر یون‌های فلزی شامل یون‌های تک ظرفیتی (Na^{+})، دو ظرفیتی (Ca^{+2}، Mg^{+2}، Mn^{+2}، Ba^{+2}، Cu^{+2}، Co^{+2}، Fe^{+2}، Zn^{+2}) و سه ظرفیتی (Al^{+3}) در غلظت ۵ mM بر فعالیت آنزیم کیموتریپسین بررسی شد (Balti *et al.*, 2012). برای این منظور، ابتدا نمونه آنزیمی با یون‌های فلزی با نسبت ۱ به ۱ برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۱۰µl از مخطوط فوق با ۹۹۰µl از محلول سوبسترا- بافر (۰/۱ میلی مولار SAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس-HCl، pH ۸ حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$) ترکیب شده و میزان افزایش جذب در طول موج ۴۱۰nm در فواصل ۳۰ ثانیه و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله اسپکتروفتومتر ثبت گردید. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد یون فلزی بود. سپس فعالیت نسبی آنزیم کیموتریپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمول ذیل به صورت درصد گزارش گردید:

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

سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده

ابتدا نمونه آنزیمی با نسبت ۱ به ۱ با سورفاکتانت‌ها (ساپونین، سدیم دودسیل سولفات و سدیم کولات تا حصول غلظت نهایی ۱ درصد) و عوامل اکسیدکننده (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 ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. سپس ۱۰ µl از مخلوط آنزیمی فوق با ۹۹۰ µl محلول سوبسترا - بافر (۰/۱ میلی مولار SAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس- HCl، pH ۸ حاوی ۱۰ میلی مولار ترکیب شده و میزان افزایش جذب در طول موج ۴۱۰nm در فواصل ۳۰ ثانیه و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله اسپکتروفتومتر ثبت گردید. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود. فقط نمونه شاهد فاقد این ترکیبات بود و از آب مقطر استفاده گردید (Jellouli *et al.*, 2009). سپس فعالیت نسبی آنزیم کیموتریپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمول ذیل به صورت درصد گزارش گردید:

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

بازدارنده‌های آنزیمی

ابتدا نمونه آنزیمی با نسبت ۱ به ۱ با بازدارنده‌های اختصاصی تریپسین (SBTI[1] ۰/۰۵ mM و TLCK[2] ۵ mM)، بازدارنده‌های پروتئازهای سرین (PMSF[3] ۱۰mM و پاراآمینوبنزآمیدین[4] ۵mM)، بازدارنده

[1] Soybean trypsin inhibitor
[2] N-tosyl-L-Lysine Chloromethyl Keton
[3] Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride
[4] ρ-Aminobenzamidine

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

اختصاصی کیموتریپسین (5mM TPCK[1])، بازدارنده اختصاصی پروتئازهای آسپارتیک (پپاستاتین A[2] ۰/۰۱mM)، بازدارنده پروتئازهای سیستئین (یدواستیک اسید[3] ۱mM) و بازدارنده متالوپروتئازها (EDTA[4] ۲mM) ترکیب شد و برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون گردید. سپس ۱۰µl از مخلوط آنزیمی فوق با ۹۹۰µl محلول سوبسترا- بافر (۰/۱ میلی مولار SAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس- HCl، pH ۸ حاوی ۱۰ میلی ترکیب شده و میزان افزایش جذب در طول موج ۴۱۰nm در فواصل ۳۰ ثانیه و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله اسپکتروفتومتر ثبت گردید. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود. فقط نمونه شاهد فاقد بازدارنده بود (Balti *et al.*, 2012). سپس فعالیت نسبی آنزیم کیموتریپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمول ذیل به صورت درصد گزارش گردید:

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

آنالیز آماری

در این تحقیق، برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف، برای بررسی اثر یون‌های فلزی، بازدارنده‌ها، سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسید کننده بر فعالیت آنزیم کیموتریپسین از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) تحت نرم افزار SPSS20 و برای تعیین معنی‌دار 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.

نتایج

دما و pH بهینه

نتایج حاصل از بررسی دما و pH بهینه آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل‌ماهی در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد دمای بهینه آنزیم برابر با ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود به‌طوری‌که با افزایش دما در ۵۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم افزایش یافت و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به حداکثر خود رسید (شکل 1a). با افزیش دما تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد کاهش تدریجی در فعالیت آنزیم مشاهده شد ولی در ۷۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد یک کاهش ناگهانی در فعالیت آنزیم ثبت گردید. همان‌طوری‌که در شکل 1b نشان داده شده است، میزان pH بهینه فعایت آنزیم کیموتریپسین برابر ۸ بود و با افزایش pH در دامنه ۸-۴، فعالیت آن افزایش و در pH ۸-۱۱ کاهش یافت به‌طوری‌که در pH، ۸-۹ یک کاهش تدریجی و از pH، ۱۰-۱۱ یک کاهش شدید مشاهده شد.

اثر یون‌های فلزی

نتایج حاصل از بررسی اثر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل‌ماهی در جدول ۱ نشان داده شده است. یون‌های $^{+}$ وNa^{+} تأثیر معنی‌داری را بر میزان فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵). یون‌های $^{+}$ و $^{+}$ باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد گردیدند درحالی‌که در حضور یون‌های $^{+}$، Cu^{2+}، Ba^{2+}، Co^{2+}، Fe^{2+}، Zn^{2+} و $^{+}$ کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه کنترل مشاهده شد که کمترین میزان فعالیت در حضور یون $^{+}$ ثبت گردید (P<۰/۰۵).

اثر بازدارنده‌ها

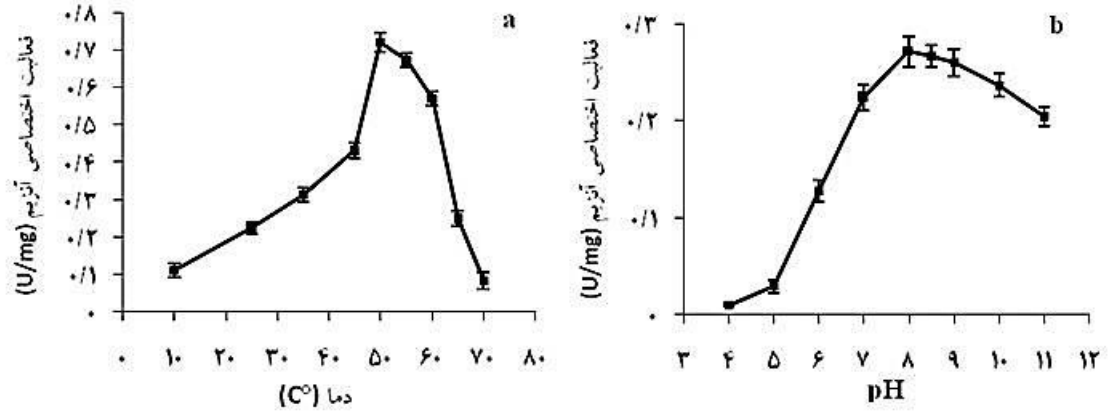
نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارنده‌ها بر میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل‌ماهی در جدول ۲ ارائه شده است. میزان فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد در حضور تمام بازدارنده‌های مورد آزمایش کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که بین بازدارنده‌های SBTI، TPCK، PMSF و بین بازدارنده‌های TLCK، پپاستاتین A، یدواستیک اسید

[1] N-tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone
[2] Pepstatin A
[3] Iodoacetic acid
[4] Ethylenediaminetetraacetic acid

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بالاترین میزان بازدارندگی در حضور PMSF و کمترن میزان آن در حضور پپاستاتین A و یدواستیک اسید ثبت گردید.



شکل ۱: تأثیر دما و pH بر فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل‌ماهی (*Huso huso*). a: دمای بهینه، b: pH بهینه

Figure 1: The effect of temperature and pH on the chymotrypsin activity extracted from beluga (*Huso huso*) intestine. a: optimum temperature, b: optimum pH

جدول ۱: تأثیر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم کیموترپیسین استخراج شده از روده فیل‌ماهی (*Huso huso*)

Table 1: The effect of metal ions on the chymotrypsin activity extracted from beluga (*Huso huso*) intestine

یون فلزی	غلظت (mM)	فعالیت نسبی (%)
نمونه شاهد	-	۱۰۰ ± ۰/۰۰ c
K^{+}	۵	۱۰۰ ± ۱/۲۵ c
Na^{+}	۵	۱۰۰ ± ۱/۱۵ c
Ca^{+2}	۵	۱۱۵ ± ۱/۰۷ a
Mg^{+2}	۵	۱۱۲ ± ۱/۱۹ b
Cu^{+2}	۵	۴۳/۶ ± ۱/۲۳ f
Zn^{+2}	۵	۴۹/۵ ± ۰/۴۷ e
Mn^{+2}	۵	۷۸/۴ ± ۰/۹۸ d
Ba^{+2}	۵	۴۳/۲ ± ۱/۳۵ f
Co^{+2}	۵	۲۵/۸ ± ۱/۳۰ h
Fe^{+2}	۵	۱۵/۴ ± ۱/۲۶ i
Al^{+3}	۵	۳۳/۳ ± ۱/۳۹ g

حروف کوچک غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است (P< ۰/۰۵).

جدول ۲: تأثیر انواع مختلف بازدارنده‌ها بر میزان فعالیت آنزیم کیموترپیسین استخراج شده از روده فیل‌ماهی (*Huso huso*)

Table 2: The effect of different inhibitors on the chymotrypsin activity extracted from beluga (*Huso huso*) intestine

انواع بازدارنده	غلظت (mM)	بازدارندگی (٪)
شاهد	-	۰ ± ۰/۰۰ e
PMSF	۱۰	۹۸/۵ ± ۱/۲۵ a
SBTI	۰/۰۵	۹۶/۵ ± ۱/۳۳ a
TLCK	۵	۱/۸ ± ۰/۴۲ d
پارا- آمینو بنزآمیدین	۵	۵۸/۶ ± ۰/۹۵ b
TPCK	۵	۹۷/۳ ± ۱/۷۶ a
پپاستاتین A	۰/۰۱	۱/۵ ± ۰/۰۶ d
یدواستیک اسید	۱	۱/۵ ± ۰/۰۳ d
EDTA	۲	۲/۲ ± ۰/۰۶ c

حروف کوچک غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است (P< ۰/۰۵).

اثر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده

در جدول ۳ اثر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده بر میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل‌ماهی ارائه شده است. در حضور سورفاکتانت‌های

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

ساپونین و سدیم کولات افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه کنترل مشاهده گردید (P<۰/۰۵) درحالی‌که فعالیت آنزیم در حضور سدیم دودسیل سولفات کاهش معنی‌داری را نسبت به نمونه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). عوامل اکسیدکننده سدیم پربورات و پراکسید هیدروژن باعث کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین نسبت به نمونه کنترل گردیدند (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در دامنه ۵-۱۵ درصد کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد ثبت گردید (P<۰/۰۵).

جدول ۳: اثر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسید کننده بر میزان فعالیت آنزیم کیموترپیسین استخراج شده از روده فیل‌ماهی (*Huso huso*)

Table 3: The effect of surfactants and oxidizing agents on the chymotrypsin activity extracted from beluga (*Huso huso*) intestine

سورفاکتنت و عوامل اکسیدکننده		غلظت (٪)	فعالیت نسبی (٪)
سورفاکتانت	شاهد	-	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{c}
	سدیم دودسیل سولفات	۱	۲/۲۵ ±۰/۷۷ ^{h}
	سدیم کولات	۱	۱۲۸/۵۰ ±۰/۹۲^{b}
	ساپونین	۱	۱۲۱/۲۰ ±۰/۷۵^{a}
عوامل اکسیدکننده	سدیم پربورات	۱	۷۱/۱۱± ۰/۶۲^{d}
	پراکسید هیدروژن	۵	۶۵/۸۰ ±۰/۴۰^{e}
		۱۰	۵۸/۲۴ ±۰/۵۱^{f}
		۱۵	۳۸/۳۰ ±۰/۳۷^{g}

حروف کوچک غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است (P< ۰/۰۵).

بحث

دما و pH از عوامل موثر بر فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌ها بوده و در نتیجه آنها دارای دما و pH بهینه برای فعالیت خود هستند. در این مطالعه دمای بهینه فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل‌ماهی ۵۰ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید که با نتایج گزارش شده در ماهی ساردین (*S. gax caeruleus*) و کاراس (*C. auratus*) هم‌خوانی داشت (Castillo-Yanez *et al*., 2005; Yang *et al*., 2009). ولی از دمای بهینه این آنزیم در آبزیانی مانند ماهی مرکب، (*Sepia officinalis*) (۵۵ درجه سانتی‌گراد) و اسکوئید، (*Dosidicus gigas*) (۶۵ درجه سانتی‌گراد) پائین‌تر بود (Balti *et al*., 2012; Marquez-Rios *et al*., 2016). دمای بهینه فعالیت آنزیم کیموتریپسین در ماهیان ۵۵-۴۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است و در دمای بالاتر از ۵۵ درجه سانتی‌گراد ناپایدارند (Castillo-Yanez *et al*., 2005). البته تفاوت در دمای فعالیت آنزیم می‌تواند ناشی از عواملی مانند دمای زیستگاه ماهی، سوبسترای مورد استفاده جهت سنجش فعالیت آنزیم و اختلاف در ساختار آنزیم باشد که از طریق ژنتیک ماهیان کنترل می‌شود (Klomklao and Benjakul, 2018). غیرفعال شدن آنزیم (Inactivation) در دماهای بالا احتمالا می‌تواند به دلیل از هم گسیختگی ساختاری آنزیم باشد.

مقدار pH بهینه برای آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل ماهی ۸ بود. Castillo-Yanez و همکاران (۲۰۰۵) چنین نتایجی را در ماهی ساردین (*S agax caeruleus*) و Yang و همکاران (۲۰۰۹) در ماهی کاراس (*C. auratus*) نیز گزارش کردند، ولی از میزان pH گزارش شده در آبزیانی مانند ماهی مرکب (*S. officinalis*) (۸/۵) (Balti *et al*., 2012) پائین‌تر بود. pH بهینه فعالیت آنزیم کیموتریپسین در ماهیان ۵-۷/۹ گزارش شده است و در pH اسیدی ناپایدارند (Castillo-Yanez *et al*., 2005). بر اساس گزارش Simpson (۲۰۰۰) کیموتریپسین در جانوران خونگرم معمولاً در pH به‌شدت قلیایی و اسیدی پایدار است درحالی‌که در ماهیان، پایداری خود را فقط در pH قلیایی نشان می‌دهد.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

بر اساس یافته‌های De la Parra و همکاران (۲۰۰۷) آنزیم کیموتریپسین در ماهی تون (*Thunnus orientalis*) در محدوده pH ۷-۱۰ دارای بالاترین فعالیت است و در محدوده pH ۳-۵ فقط ۲۰٪ فعالیت خود را حفظ می‌کند. در pH به‌شدت اسیدی و قلیایی، دفع الکترواستاتیک بین مولکولی قوی از طریق القاء بار الکتریکی سبب تورم و از هم گسیختگی ساختار آنزیم می‌شود (Dos Santos *et al*., 2020). آنزیم کیموتریپسین متعلق به گروه پروتئازهای قلیایی است و تحت شرایط اسیدی ساختار و توزیع بار الکتریکی آن تغییر می‌کند و آنزیم نمی‌تواند به طور صحیح به سوبسترا متصل شود (Khangembam and Chakrabarti, 2015).

نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل ماهی نشان داد که تمام بازدارنده‌های مورد آزمایش اثر مهارکنندگی معنی‌داری بر فعالیت آنزیم داشتند که اثر مهارکنندگی بازدارنده‌های PMSF، SBTI و TPCK (>۹۶٪) و پارا آمینو بنزآمیدین (>۵۸٪) نسبت به سایر بازدارنده‌ها بالاتر بود. نتایج این مطالعه با مطالعات انجام شده در ماهی ساردین (*Sagax caeruleus*) (Castillo-Yanez *et al*., 2005)، کاراس (*C. auratus*) (Yang *et al*., 2009) و آبزیانی مانند ماهی مرکب (*S. officinalis*) (Balti *et al*., 2012) و اسکوئید (*D. gigas*) (Marquez-Rios *et al*., 2016) همخوانی داشت. بازدارنده‌ها (طبیعی و مصنوعی) می‌توانند از طریق تشکیل کمپلکس آنزیم – بازدارنده باعث کاهش فعالیت کاتالیزوری آنزیم کیموتریپسین شده و از آن‌جایی‌که این آنزیم از دسته پروتئازهای سرین (در جایگاه فعال آنها اسید آمینه سرین در مرکز فعالیت کاتالیزوری قرار دارد) می‌باشد، در حضور بازدارنده‌های اختصاصی سرینوپروتئازها مانند PMSF، SBTI و TPCK کاهش معنی‌داری در فعالیت کاتالیزوی آنزیم مشاهده می‌شود (Garcia-Carreno *et al*., 1993; Zhou *et al*., 2011).

نتایج حاصل از بررسی یون‌های فلزی نشان داد یون‌های کلسیم و منیزیم باعث افزایش فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل ماهی گردیدند درحالی‌که سایر یون‌های فلزی اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم داشتند یا مانند سدیم و پتاسیم تأثیری بر فعالیت آنزیم نشان ندادند. این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعه ماهی ساردین (*Sagax caeruleus*) و کاراس (*C. auratus*) و آبزیانی مانند ماهی مرکب (*S. officinalis*) و اسکوئید (*D. gigas*) همخوانی داشت (Castillo-Yanez *et al*., 2006; Yang *et al*., 2009; Balti *et al*., 2012; Marquez-Rios *et al*., 2016). یون‌های فلزی می‌توانند به طور مؤثری از طریق تغییر جریان الکترون در یک سوبسترا یا آنزیم واکنش کاتالیز شده را کنترل کنند و با توجه به گروه‌های عامل موجود در جایگاه فعال آنزیم در اتصال آن به سوبسترا نقش داشته باشند. برخی یون‌های فلزی مانند کلسیم و منیزیم به عنوان کوفاکتور باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌شوند و برخی دیگر مانند جیوه و مس فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهند (Green and Neurath, 1953). برخی یون‌ها مانند کبالت بخش سولفیدریل آنزیم را تحت تأثیر قرار می‌دهند و بازدارندگی بالایی را بر فعالیت آنزیم اعمال می‌کنند (Freitas-Júnior *et al*., 2012). البته تاثیر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم در گونه‌های مختلف ماهیان ممکن است تابع گونه ماهی و سازگاری‌های غذایی و زیست‌محیطی آن باشد (Khangembam and Chakrabarti, 2015).

فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل ماهی در حضور سورفاکتانت‌ها بجز SDS افزایش یافت. آنزیم در حضور سورفاکتانت‌های یونی و غیریونی پایدار است و می‌تواند تا ۸۰٪ فعالیت کاتالیزوی خود را بعد از ۱ ساعت حفظ نماید (Esposito *et al*., 2009). بررسی‌ها نشان می‌دهد سورفاکتانت‌ها در غلظت‌های بالا باعث دناتوره شدن آنزیم‌ها می‌شوند، ولی در غلظت‌های پائین تغییری در ساختار آنزیم ایجاد نمی‌کنند 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 (Rubingh, 1996). نتایج این مطالعه نشان داد آنزیم کیموتریپسین در حضور عوامل اکسیدکننده (سدیم پربورات و پراکسید هیدروژن) ناپایدار است و از فعالیت آن کاسته شد. در

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

خصوص تأثیر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده بر فعالیت آنزیم کیموتریپسین تحقیق مشابهی یافت نشد، ولی چنین نتایجی در خصوص آنزیم تریپسین که همانند کیموتریپسین از دسته پروتئازهای سرین بوده و جایگاه فعال کاتالیزوری آنها مشابه یکدیگر است، در ماهیانی مانند زبرا بلنی (*Salaria basilisca*) و کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) گزارش شده است (Ktari *et al*., 2012; Zamani *et al*., 2014). بسیاری از پروتئازها در حضور عوامل اکسیدکننده مانند پراکسید هیدروژن ناپایدارند به‌طوری‌که 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 (Finnegan *et al*., 2010).

از یافته‌های مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت فعالیت آنزیم کیموتریپسین حاصل از روده فیل ماهی تحت تأثیر یون‌های فلزی، بازدارنده‌های آنزیمی، سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده قرار دارد و کنترل این عوامل می‌تواند تا حد زیادی بر فعالیت بهینه این آنزیم در فیزیولوژی گوارش فیل ماهی مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه ملایر جهت تامین هزینه‌های این طرح تحقیقاتی با شماره ۳۱۰-۱-۸۴/۹ قدردانی می‌گردد.

منابع

باقری، ط. و هدایتی، ع. ا.، ۱۳۹۸. تأثیر آلاینده‌های نفتی دریای خزر بر ماهیان خاویاری: مطالعه موردی بر شاخص‌های فیزیولوژیکی فیل‌ماهی (*Huso huso*) . اولین همایش ملی فرصت‌ها و چالش‌های پیش روی دریای خزر (با تکیه بر رژیم حقوقی، سیاسی و امنیتی، شیلات و محیط زیست، اقتصادی)، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان. https://civilica.com/doc/973867

راستا، م.، ستاری، م.، شکرالله زاده طالشی، م. و ایمان پور نمین، ج.، ۱۳۹۹. آلودگی میکروپلاستیک در رسوبات تالاب انزلی، جنوب غربی دریای خزر (استان گیلان). مجله علمی شیلات ایران، ۲۹(۴): ۱۲۱-۱۳۳. (DOI) : 10.22092/ISFJ.2020.122999

سازمان شیلات ایران، ۹۹-۱۳۸۸. سالنامه آماری شیلاتی ایران، معاونت طرح و برنامه، سازمان شیلات ایران، تهران، ۶۴ ص.

قلی‌پور، س.، خارا، ح. و پژند، ذ.، ۱۳۹۶. بررسی (LC50 96 h) و ضایعات هیستوپاتولوژیکی نیتریت روی بافت‌های آبشش، کبد و کلیه تاسماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*). فیزیولوژی و تکوین جانوری (علوم زیستی)، ۱۱(۱): ۱-۱۲.

کریمیان، ع.، ذاکری، م.، فارابی، م. و.، حقی، م. **وکوچینیان، پ.، ۱۳۹۹.** مطالعه پارامترهای غیر زیستی آب در مجاورت قفس های دریایی پرورش ماهی در ساحل جنوبی دریای خزر، منطقه عباس آباد. مجله علمی شیلات ایران، ۲۹(۶): ۱۱-۲۸. (DOI) : 10.22092/ISFJ.2021.123534

Balti, R., Bougherra, F., Bougatef, A., Hayet B.K., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Guillochon, D and Nasri, M., 2012. Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates: Purification and biochemical characterisation. *Food Chemistry*, 130(3): 475-484. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.019

Castillo-Yanez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreno, F.L. and Del Toro, M.A.N., 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140B: 91–98. DOI.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.031

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

Chong, A.S.C., Hashim, R., Chow-Yang, L. and Ali A.B., 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish, *Symphysodon aeguifasciata*. *Aquaculture*, 203: 321-333. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00630-5

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. DOI: 10.1016/j.bcab.2021.102073

De la Parra, A.M., Rosas, A., Lazo, J.P. and Viana, M.T., 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33(3): 223-231. DOI: 10.1007/s10695-007-9134-9

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. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101584

Esposito, T.S., Amaral, I.P.G., Buarque, D.S., Oliveira, G.B., Carvalho, L.B. and Bezerra, R.S., 2009. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry*.112: 125–130. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.05.049

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. DOI: 10.1093/jac/dkq308

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. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.056

García-Carreno, 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: 65–69. DOI: 10.1006/abio.1993.1457

Ghasemi, N., Imani, A., Noori, F. and Shahrooz, R., 2020. Ontogeny of digestive tract of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) from hatching to juvenile stage: Digestive enzymes activity, stomach and proximal intestine. *Aquaculture*, 519: 734-751. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734751

Golchinfar, F., Zamani, A., Hajimoradloo, A . and Madani, R., 2011. Assessment of digestive enzymes activity during the fry

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

development of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*: from hatching to primary stages after yolk sac absorption. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10 (3): 403-414.

Green, N.M. and Neurath, H., 1953. The effects of divalent cations on trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 204: 379-390. DOI: 10.1021/ja01128a523

Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Balti, R., Barkia, A. and Nasri, M., 2009. New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: Purification and characterisation. *Food Chemistry*, 116: 644–650. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.087

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. https://doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.140

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. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.098

Klomklao, 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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.059

Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles - Implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200: 181-201. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00700-1

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

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.

Marquez-Rios, E., Cota-Arriola, O., Villalba-Villalba, A.G., Ezquerra-Brauer, J.M., Ocaño-Higuera, V.M., Lopez-Corona, B.E. and Torres-Arreola, W., 2016. Chymotrypsin isolation from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas: Partial characterization and effect on muscle collagen. *Food Science and Biotechnology*, 25(4):1011-1016. DOI: 10.1007/s10068-016-0163-y

Rubingh, D.N., 1996. The influence of surfactants on enzyme activity. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1(5): 598-603. DOI: 10.1016/S1359-0294(96)80097-5

Simpson, B.K., 2000. Digestive proteinases from marine animals. In: Haard, N. F. and Simpson, B. K., (eds.) Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

Seafood Quality. New York, Marcel Dekker, USA. pp. 531–540.

Tsai, I.H., Chuang, K.L. and Chuang, J.L., 1986. Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 85B: 235–239. DOI: 10.1016/0305-0491(86)90248-8

Twining, S.S., Alexander, P.A., Huibregste, K. and Glick, D.M., 1983. A pepsinogen from rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75B: 109–112. DOI:10.1016/0305-0491(83)90046-9

Von Elert, E., Agrawal, M.K., Gebauer, C., Jaensch, H., Bauer, U. and Zitt, A., 2004. Protease activity in gut of Daphnia magna: evidence for trypsin and chymotrypsin enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137B (3): 287-296. DOI: 10.1016/j.cbpc.2003.11.008

Yang, F., Su, W.J., Lu, B.J., Wu, T., Sun, L.C., Hara, K. and Cao, M.J., 2009. Purification and characterization of chymotrypsins from the hepatopancreas of Crucian carp (*Carassius auratus*). *Food Chemistry*, 116(4): 860-866. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.035

Yufera, M. and Darias, M.J., 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. Aquaculture, 268: 53–63. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.050

Zamani, A., Hajimoradloo, A., Madani, R . and Farhangi, M., 2009. Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of the endangered Caspian brown trout *Salmo caspius*. *Journal of Fish Biology*, 75(4): 932-937. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2009.02348.x

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. DOI: 10.1080/10498850.2012.712630

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. DOI: 10.1002/jsfa.7172

Zamani, A., Madani, R., Rezaei, M. and Benjakul, S., 2017. Antioxidative activitiy 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. DOI: 10.1080/10498850.2015.1073822

Zhou, L., Budge, S.M., Ghaly, A.E., Brooks, M.S. and Dave D., 2011. Extraction, purification and characterization of fish chymotrypsin: A review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 7(3):104-123.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]

Chymotrypsin activity extracted from beluga (*Huso huso*) intestine under some physical and chemical factors

Zamani A.[1*]; Khajavi M.[1]

[*]a.zamani@malayeru.ac.ir

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

Abstract

In the present study, the physical and chemical factors including optimum temperature and pH, the effect of inhibitors, metal ions, oxidizing agents, and surfactants were assayed on the chymotrypsin activity from beluga (*Huso huso*) intestine. According to the obtained results, the optimum temperature and pH of the chymotrypsin were recorded at 50°C and 8, respectively, and its activity was extremely decreased at temperature>50°C. Inhibitors including SBTI, TLCK, PMSF, ρ-aminobenzamidine, TPCK, pepstatin A, iodoacetic acid and EDTA significantly inhibited the enzyme activity that PMSF, SBTI and TPCK 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 enzyme ($P>0.05$). 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 this study showed that the chymotrypsin activity from beluga intestine had a significant decrease in presence of inhibitors, metal ions (except for Ca^{+2}, Mg^{+2}, K^{+} and Na^{+}), SDS, sodium perborate and hydrogen peroxide and showed a significant increase in presence of Ca^{+2} and Mg^{+2}, saponin and sodium cholate that it can be affected the maximum activity of the enzyme in digestive physiology of the beluga.

Keywords: Intestine, Chymotrypsin, Beluga, Physical and chemical factors

[*]Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.6.2]