



مقاله علمی - پژوهشی:

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

عباس زمانی^{*}، مریم خواجه‌جوری^۱

^{*}a.zamani@malayeru.ac.ir

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

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۱

چکیده

در مطالعه حاضر، عوامل فیزیکی و شیمیایی شامل تعیین دما و pH بهینه و اثر بازدارنده‌های آنزیمی، یون‌های فلزی، سورفاکтанت‌ها 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 به ترتیب ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۸ بود و در دمای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آن بهشدت کاهش یافت. بازدارنده‌ها شامل PMSF، TLCK، SBTI، پارا آمنوبنزوآمیدین، TPCK، یدواستیک اسید و EDTA بطور معنی‌داری از فعالیت آنزیم جلوگیری کردند که بازدارنده‌های TPCP و SBTI اثر مهارکننده‌گی کاملی بر فعالیت آنزیم داشتند ($P < 0.05$). یون‌های Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم گردیدند ($P < 0.05$). یون‌های Na^+ و Ca^{2+} اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم نشان ندادند ($P > 0.05$). فعالیت آنزیم کیموتریپسین در حضور سورفاکتانت‌های ساپونین و سدیم کولات افزایش معنی‌دار (۰.۰۵) و در حضور سدیم دودسیل سولفات و عوامل اکسیدکننده (سدیم پربورات و پراکسید هیدروژن) کاهش معنی‌داری (۰.۰۵) نشان داد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد فعالیت آنزیم کیموتریپسین در روده فیل ماهی در حضور بازدارنده‌ها، یون‌های فلزی (غیر Mg^{2+} , K^+ و Na^+), سدیم دودسیل سولفات، سدیم پربورات و پراکسید هیدروژن کاهش معنی‌دار و در حضور Mg^{2+} , Ca^{2+} و ساپونین و سدیم کولات افزایش معنی‌داری داشت که می‌تواند در ارزیابی اثر گذاری 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

مقدمه

ترشح می‌شود. این آنزیم فعالیت آندوپیتیدازی دارد و پیوند پپتیدی در زنجیره پروتئینی را از سمت گروه کربوکسیل جایی که 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 (*Sympysodon aequifasciata*)، ساردین (*Sardinops sagax caeruleus*)، کاراس (*Carassius auratus*), آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*)، قزلآلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و اووزون برون Chong *et al.*, 2002; Castillo-Yanez *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009; Zamani *et al.*, 2009; Golchinfar *et al.*, 2011; Ghasemi *et al.*, 2020 کیموتربیپسین در بافت روود تقریباً 10^5 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 تحت تأثیر برخی عوامل شیمیایی مانند یون‌های فلزی، بازدارنده‌ها، سورفاکтанتها و عوامل اکسیدکننده قرار دارد که می‌تواند فرایند گوارش در وجود آبزی نظیر ماهی را با مشکل مواجه کند. لذا، بررسی فعالیت آنزیم کیموتربیپسین 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 ۹۹-۹۶ از ۱۳۸۸ تا ۱۳۸۳ تن به ۳۵۰۳ تن افزایش یافته است (سازمان شیلات ایران، ۱۳۸۸-۹۹). هدف از مطالعه حاضر، تعیین دما و pH بهینه و بررسی اثر یون‌های فلزی، بازدارنده‌های آنزیمی، سورفاکتانتها و عوامل اکسیدکننده بر میزان فعالیت آنزیم کیموتربیپسین استخراج شده

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 میکروبلاستیک‌ها 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 (قلیبور و همکاران، ۱۳۹۶؛ راستا و همکاران، ۱۳۹۹). در سال‌های اخیر، استفاده از منابع آبی با رشد چشمگیر صنعت آبزی پروری 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 کاوش انرژی مورد نیاز برای انجام واکنش دارند (Zamani and Benjakul, 2016; De Freitas-Júnior *et al.*, 2021). آنزیم‌های گوارشی دسته‌های 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 نظری ماهی را منعکس می‌کنند و می‌توانند شاخص تغذیه‌ای مناسبی در مراحل مختلف رشد ماهی باشند (Chong *et al.*, 2002). علاوه‌بر این، 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، کیموتربیپسین است که به دسته پروتئازهای سرین تعلق دارد و به صورت یک پیش‌آنزیم در سلول‌های پانکراس تولید شده و به دوازده

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-۰/۵ HCl و ۷/۵ pH (حاوی ۱۰ میلی مولار CaCl₂ و ۰/۵ مولار NaCl) با نسبت ۱ به ۵۰ ترکیب شده و برای مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد روی همزن مغناطیسی به آرامی مخلوط شدند. سپس مخلوط حاصله برای مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در ۱۴۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید و محلول رویی به عنوان عصاره خام آنزیمی در نظر گرفته شد (Khantaphant, 2010 and Benjakul, 2010).

سنجدش فعالیت آنزیم کیموتربیپسین

برای سنجدش فعالیت آنزیم کیموتربیپسین از روش Tsai و همکاران (۱۹۸۶) و از سوبسترات 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 میلی مولار تریس-HCl، pH ۸) حاوی ۱۰ میلی مولار CaCl₂ مخلوط گردید و میزان افزایش جذب در طول موج ۴۱۰ nm در فواصل ۳۰ ثانیه و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد 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 کیموتربیپسین از فرمول ذیل استفاده گردید:

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

مواد و روش کار

تهیه نمونه از ماهی

در این مطالعه، اماء و احشاء فیل ماهی 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 اماء و احشاء ماهی در حضور یخ جدا شده و بعد از شستشو با آب مقطر سرد (۴ درجه سانتی گراد) بلا فاصله در ۸۰- درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد) قرار داده شدند تا از حالت انجماد خارج شود. سپس جهت چربی‌زدایی، نمونه با نسبت ۱ به ۳ با استون سرد (۲۰- درجه سانتی گراد) مخلوط شد و برای مدت ۱ دقیقه عمل همگن‌سازی با هموژنایزر در حضور 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

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

سرم گاوی با غلظت ۱ mg / ml به عنوان استاندارد استفاده شد و قرائت نوری نمونه‌ها در ۷۵۰ nm اسپکتروفتومتر انجام شد.

دما و pH بهینه

برای تعیین دمای بهینه، ابتدا ۱۰ µl نمونه آنزیمی با ۹۹۰ µl از محلول سوبسترا- بافر (۰/۱ میلی مولار ۱۹

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

سنجدش پروتئین محلول

برای سنجدش میزان پروتئین محلول از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده گردید. در این روش از آلبومین

ثبت گردید. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد یون فلزی بود. سپس فعالیت نسبی آنزیم کیموتربیپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمول ذیل به صورت درصد گزارش گردید:

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

سورفاکtantها و عوامل اکسیدکننده

ابتدا نمونه آنزیمی با نسبت ۱ به ۱ با سورفاکtantها (سایپونین، سدیم دودسیل سولفات و سدیم کولات تا حصول غلظتنهایی ۱ درصد) و عوامل اکسیدکننده (سدیم پرپورات با غلظتنهایی ۱ درصد و پراکسید هیدروژن با غلظتنهایی ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) ترکیب شد و برای مدت ۱ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد انکوباسیون شدند. سپس ۱۰ μl از محلول آنزیمی فوق با ۹۹۰ μl محلول سوبسترا - بافر (۱/۱۰ میلی مolar SAPNA در بافر ۵۰ میلی مolar تریس- ۸ pH-HCl) در غلظت ۵ mM برخواست. برای این منظور، ابتدا نمونه آنزیمی با یونهای Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} و سه ظرفیتی (Al^{+3}) ترکیب شده و سپس فعالیت آنزیم کیموتربیپسین در طول موج ۴۱۰ nm در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه در فواصل ۳۰ ثانیه با اسپکتروفوتومتر 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} , Cu^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2}) و سه ظرفیتی (Al^{+3}) در غلظت ۵ mM بر 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 ۱۰ μl از مخطوط فوق با ۹۹۰ μl محلول سوبسترا - بافر (۱/۱۰ میلی مolar SAPNA در بافر ۵۰ میلی مolar تریس- ۸ pH-HCl) در غلظت ۱۰ mM برخواست. برای این منظور، ابتدا نمونه آنزیمی با یونهای Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} و سه ظرفیتی (Al^{+3}) ترکیب شده و میزان افزایش جذب در طول موج ۴۱۰ nm در فواصل ۳۰ ثانیه و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد بدوسیله اسپکتروفوتومتر

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

^۱PMSF mM، بازدارنده‌های پروتئازهای سرین و ^۲TLCK mM و پارآمینوبنزا میدین^۳ mM، بازدارنده

بازدارنده‌های آنزیمی

ابتدا نمونه آنزیمی با نسبت ۱ به ۱ با بازدارنده‌های اختصاصی تریپسین (SBTI^۱ ۰/۰۵ mM و

^۳ Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride

^۴ ρ -Aminobenzamidine

^۱ Soybean trypsin inhibitor

^۲ N-tosyl-L-Lysine Chloromethyl Keton

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 بهطوری که با افزایش دما در ۱۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم افزایش یافت و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به حداقل خود رسید (شکل ۱a). با افزایش دما تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد کاهش تدریجی در فعالیت آنزیم مشاهده شد ولی در ۶۵-۷۰ درجه سانتی‌گراد یک کاهش ناگهانی در فعالیت آنزیم ثبت گردید. همان‌طوری که در شکل ۱b نشان داده شده است، میزان pH بهینه فعالیت آنزیم کیموتریپسین برابر ۸ بود و با افزایش pH در دامنه ۴-۸، فعالیت آن افزایش و در pH ۱۱-۸ کاهش یافت بهطوری که در pH ۹-۸ یک کاهش تدریجی و از pH ۱۱-۱۰ 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 Na^+ و Ca^{2+} معنی‌داری را بر میزان فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد نشان ندادند ($P > 0.05$). یون‌های Fe^{2+} و Zn^{2+} باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد گردیدند در حالی که در حضور یون‌های Cu^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} ، P^{3-} و K^+ معنی‌داری در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه کنترل مشاهده شد که کمترین میزان فعالیت در حضور یون P^{3-} ثبت گردید ($P < 0.05$).

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 ($P < 0.05$) بهطوری که بین بازدارنده‌های SBTI، TPCK، PMSF و بین بازدارنده‌های TLCK، پیاستاتین A، یدواستیک اسید

اختصاصی کیموتریپسین (5mM TPC¹، بازدارنده اختصاصی پروتئازهای آسپارتیک (پیاستاتین A² 1mM ، بازدارنده پروتئازهای سیستئین (یدواستیک اسید³ 1mM) و بازدارنده متالوپروتئازها (EDTA⁴ 2mM) ترکیب شد و برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون گردید. سپس $10\mu\text{l}$ از مخلوط آنزیمی فوق با $990\mu\text{l}$ محلول سوبسترا-بافر (۱/۱۰ میلی مolar SAPNA در بافر ۵۰ میلی مolar HCl pH ۸) حاوی 10 nm میلی ترکیب شده و میزان افزایش جذب در طول موج 410nm در فواصل ۳۰ ثانیه و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد بهوسیله اسپکتروفوتومتر ثبت گردید. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود. فقط نمونه شاهد فاقد بازدارنده بود (Balti et al., 2012). سپس فعالیت نسی آنزیم کیموتریپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمول ذیل به صورت درصد گزارش گردید:

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

آنالیز آماری

در این تحقیق، برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف، برای بررسی اثر یون‌های فلزی، بازدارنده‌ها، سورفاکтанتها 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 اکسید کننده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام ارزیابی‌ها نیز در ۳ تکرار انجام گرفت.

¹ N-tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone

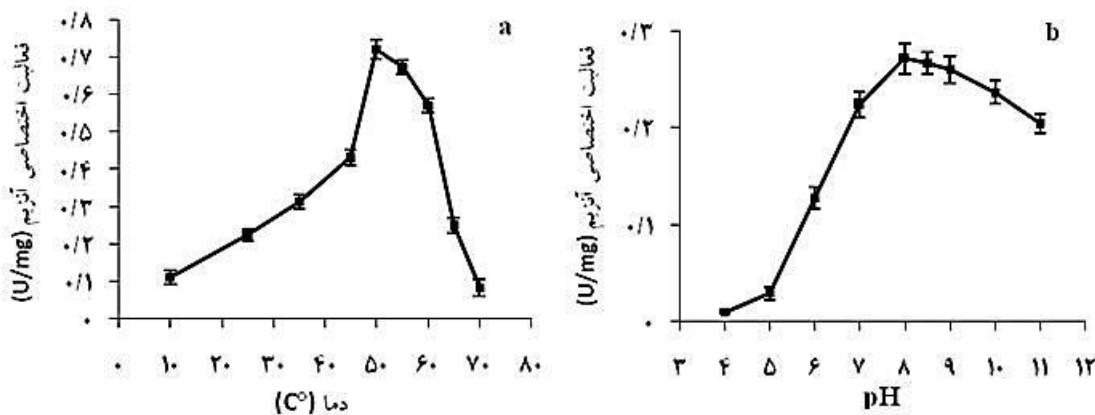
² Pepstatin A

³ Iodoacetic acid

⁴ Ethylenediaminetetraacetic acid

در حضور پپاستاتین A و یدواستیک اسید ثبت گردید.

اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). بالاترین میزان بازدارندگی در حضور PMSF و کمترن میزان آن



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

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

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

حروف کوچک غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$). (P<0.05).

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

جدول ۱: تأثیر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین 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	غلوظت (mM)	فعالیت نسبی (%)
نمونه شاهد	-	۱۰۰ ± ۰/۰۰ ^c
K ⁺	۵	۱۰۰ ± ۱/۲۵ ^c
Na ⁺	۵	۱۰۰ ± ۱/۱۵ ^c
Ca ^{۲+}	۵	۱۱۵ ± ۱/۰۷ ^a
Mg ^{۲+}	۵	۱۱۲ ± ۱/۱۹ ^b
Cu ^{۲+}	۵	۴۳/۶ ± ۱/۲۳ ^f
Zn ^{۲+}	۵	۴۹/۵ ± ۰/۴۷ ^e
Mn ^{۲+}	۵	۷۸/۴ ± ۰/۹۸ ^d
Ba ^{۲+}	۵	۴۲/۲ ± ۱/۳۵ ^f
Co ^{۲+}	۵	۲۵/۸ ± ۱/۳۰ ^h
Fe ^{۲+}	۵	۱۵/۴ ± ۱/۲۶ ⁱ
Al ^{۳+}	۵	۳۳/۳ ± ۱/۳۹ ^g

حروف کوچک غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$). (P<0.05).

هیدروژن باعث کاهش معنی داری در میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین نسبت به نمونه کنترل گردیدند ($P < 0.05$). به طوری که با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در دامنه ۱۵-۵ درصد کاهش معنی داری در میزان فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد ثبت گردید ($P < 0.05$).

سایونین و سدیم کولات افزایش معنی داری در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه کنترل مشاهده گردید ($P < 0.05$). در حالی که فعالیت آنزیم در حضور سدیم دودسیل سولفات کاهش معنی داری را نسبت به نمونه شاهد نشان داد ($P < 0.05$). عوامل اکسیدکننده سدیم پرپورات و پراکسید

(Huso huso) جدول ۳: اثر سورفاکтанتها و عوامل اکسیدکننده بر میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین استخراج شده از روده فیل ماهی

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

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

حروف کوچک غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$).

استفاده جهت سنجش فعالیت آنزیم و اختلاف در ساختار آنزیم باشد که از طریق ژنتیک ماهیان کنترل می شود (Klomklao and Benjakul, 2018). غیرفعال شدن آنزیم (Inactivation) در دماهای بالا احتمالاً می تواند 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 (2005) چنین نتایجی را در ماهی سارдин (S. agax) در ماهی کاراس (C. auratus) نیز گزارش کردند، ولی از میزان pH گزارش شده در آبزیانی مانند ماهی مرکب (S. agax) (Yang et al., 2009) پائین تر بود. Balti et al., (2012) pH (8/۵) officinalis در ماهیان کیموتریپسین در ماهیان (C. auratus) نیز گزارش شده است و در pH ۷/۹-۵ Castillo- (Simpson et al., 2005) گزارش شده است. بر اساس گزارش Yanez et al., (2000) کیموتریپسین در جانوران خونگرم معمولاً در pH به شدت قلیایی و اسیدی پایدار است در حالی که در ماهیان، پایداری خود را فقط در pH قلیایی نشان می دهد.

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 فیل ماهی ۵۰ درجه سانتی گراد تعیین گردید که با نتایج گزارش شده در ماهی سارдин (S. gax caeruleus) و کاراس (C. auratus) هم خوانی داشت (Castillo-Yanez et al., 2005; Balti et al., 2012; Yang et al., 2009). ولی از دمای بهینه این آنزیم در آبزیانی مانند ماهی مرکب، (Sepia officinalis) درجه سانتی گراد (Dosidicus gigas) درجه سانتی گراد (Balti et al., 2012; Rios et al., 2016 Marquez-آنزیم کیموتریپسین در ماهیان ۴۵-۵۵ درجه سانتی گراد گزارش شده است و در دمای بالاتر از ۵۵ درجه سانتی گراد ناپایدارند (Castillo-Yanez et al., 2005). البته تفاوت در دمای فعالیت آنزیم می تواند ناشی از عواملی مانند دمای زیستگاه ماهی، سوبسترای مورد

استخراج شده از روده فیل ماهی گردیدند در حالی که 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 سارдин (Sagax caeruleus) (Castillo-Yanez *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009; Balti *et al.*, 2012; Marquez-Rios *et al.*, 2016) هم خوانی داشت (D. officinalis) و اسکوئید (S. gigas) هم خوانی داشت (D. officinalis) و اسکوئید (S. gigas). 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 Green and مس فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهند (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 کیموتربیپسین استخراج شده از روده فیل ماهی در حضور سورفاکтанتها بجز SDS افزایش یافت. آنزیم در حضور سورفاکتانتها 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 کیموتربیپسین در حضور عوامل اکسیدکننده (سدیم پرپورات و پراکسید هیدروژن) ناپایدار است و از فعالیت آن کاسته شد. در

بر اساس یافته‌های De la Parra و همکاران (2007) آنزیم کیموتربیپسین در ماهی تون (*Thunnus orientalis*) در محدوده pH ۵-۳ فقط ۲۰٪ فعالیت داشت و در محدوده pH ۱۰-۷ دارای بالاترین فعالیت است. در pH بهشت اسیدی و قلیایی، خود را حفظ می‌کند. در pH ۵-۳ بهشت 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 کیموتربیپسین 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 Chakrabarti, Khangembam and متصل شود (2015).

نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم کیموتربیپسین 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 سارдин (*Sagax caeruleus*) (Yang *et al.*, 2005), کاراس (*C. auratus*) (Marquez-Rios *et al.*, 2009) و آبزیانی مانند ماهی مرکب (*D. gigas*) (Balti *et al.*, 2012) و اسکوئید (S. officinalis) (Khangembam and Chakrabarti, 2015) بازدارنده‌ها (طبیعی و مصنوعی) می‌توانند از طریق تشکیل کمپلکس آنزیم – بازدارنده باعث کاهش فعالیت کاتالیزوری آنزیم کیموتربیپسین شده و از آن جایی که 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 کاتالیزوری 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 کیموتربیپسین

راستا، م.، ستاری، م.، شکرالله زاده طالشی، م. و ایمان پور نمین، ج.، ۱۳۹۹. آبودگی میکروپلاستیک در رسوبات تالاب انزلی، جنوب غربی دریای خزر (استان گیلان). مجله علمی شیلات ایران، ۴(۲۹): 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.

قلی پور، س.، خارا، ح. و پژند، ذ.، ۱۳۹۶. بررسی (LC50 ۹۶ 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. و کوچینیان، پ.، ۱۳۹۹. مطالعه پارامترهای غیر زیستی آب در مجاورت قفسه‌های دریایی پرورش ماهی در ساحل جنوبی دریای خزر، منطقه عباس‌آباد. مجله علمی شیلات ایران، ۶(۲۹): ۱۱-۲۸. (DOI) 10.22092/ISFJ.2021.123534

Balti, R., Bougherra, F., Bougatef, A., Hayet B.K., Nedjar-Arroume, N., Dhuister, 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

خصوص تأثیر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده بر فعالیت آنزیم کیموتربیپسین تحقیق مشابهی یافت نشد، ولی چنین نتایجی در خصوص آنزیم تربیپسین که همانند کیموتربیپسین 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 نایپایدارند 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 دنا توره شدن آن می‌شود (Finnegan et al., 2010).

از یافته‌های مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت فعالیت آنزیم کیموتربیپسین 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 ۳۱۰-۱-۹۴۸ 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 فرستادها 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>

- 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, *Sympodus aequifasciata*. *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-Carreño, 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 (*Acipenserstellatus*) 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

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., Ezquerro-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*

- 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 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. 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.

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, p-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