(DOI): 10.22092/ISFJ.2026.135184 34(6) 85-98 Iranian Scientific Fisheries Journal

Effect of some physical and chemical factors on the trypsin activity from the viscera of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Zamani A.[1*]

*a.zamani@malayeru.ac.ir

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

Received: August 2025 Accepted: October 2025 Published: March 2026

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Introduction

Fish farming industry relies largely on the development of formulated compound diets for promoting growth (Tacon, 2020). However, the ability of fish to digest compound diets is mostly related to the existence of the digestive enzymes in different parts of the gastrointestinal tract (Yúfera and Darias, 2007; Nolasco-Soria, 2021). In gastric fish species, protein is digested along the gastrointestinal tract by several proteases like pepsin, trypsin, and chymotrypsin. Trypsin, as an alkaline protease, has a key role in the digestion of protein, hydrolyzing them to free amino acids and small peptides for intestinal absorption; therefore, the activity of trypsin has been widely used as a valuable indicator of digestive capacity in fish (Nazdar *et al*., 2018). Hence, a better understanding of the properties of trypsin is necessary to generate valuable information for protein degradation in the fish digestive tract. In the present work, it was aimed to evaluate the effect of some physicochemical factors on the trypsin activity from pyloric caeca and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Methodology

Viscera from 10 specimens of rainbow trout with an average weight of 800 ± 31 g were obtained from a local market. Those samples were packed in polyethylene bags, placed in ice with the sample/ice ratio of approximately 1:2(w/w), and directly transported to the laboratory. Upon arrival, the pyloric caeca and intestine were removed from the rest of the collected viscera, washed with cold distilled water (4°C), pooled and stored at -80°C for further analysis (Zamani *et al*., 2023). The frozen samples were partially thawed in the refrigerator at 4°C for 2h and then cut into small pieces. Those pieces were homogenized in 50mM Tris–HCl buffer, filtered with a cheese cloth for separation of the floating fat phase and then centrifuged at 4°C (Zamani *et al*., 2014). The resulting supernatant from each sample was collected and finally used for assessment of the physicochemical factors including optimum temperature and thermostability (from 10 to 70 °C), optimum pH and pH stability (from 4.0 to 11.0), inhibitors (SBTI,

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

TLCK, TPCK, PMSF, pepstatin A, iodoacetic acid, and EDTA) and metal ions (K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Zn^{2+}, and Al^{3+}) on the trypsin activity according to the method described by Zamani *et al.* (2023).

Results

According to the obtained results, optimum temperature and pH of the trypsin from pyloric caeca and intestine were recorded at 55°C and 8.5, respectively. The stability of the trypsin from the both samples was well preserved at temperatures of up to 50°C and pH from 5.0 to 11.0. The enzyme activity from the both samples was significantly inhibited in presence of SBTI, TLCK, PMSF, pepstatin A and iodoacetic acid (p<0.05), while TPCK and EDTA showed no inhibitory effect on the enzyme activity. The enzyme activity from the both samples was significantly increased in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} and decreased by Cu^{2+}, Ba^{2+}, Zn^{2+}, and Al^{3+} (p<0.05). However, Na^+ and K^+ did not show any significant effect on the activity of both samples.

Discussion and conclusion

Enzymes are one of the main biological macromolecules that their maximum activity depend on an optimum temperature to make them functional. The trypsin from pyloric caeca and intestine of rainbow trout had optimum temperature of 55°C. However, an obvious decrease in the trypsin activity of both samples was observed at temperatures above 60°C, probably due to thermal inactivation of this enzyme caused by protein unfolding (Zamani *et al*., 2014). Similar optimum temperature (55°C) was recorded for trypsins in silver mojarra, cuttlefish, unicorn leatherjacket, and beluga and sevruga (Silva *et al*., 2011; Balti *et al*., 2012; Zamani and Benjakul, 2016; Zamani *et al*., 2023). The optimal temperature of trypsin is in the range of 30-60°C and the differences could be attributed to the temperature of fish habitat or experimental conditions used in assessments (Klomklao and Benjakul, 2018). The stability of trypsin from both samples was highly maintained up to 50°C. These results were in accordance with those of mandarin fish, grey triggerfish, mrigal carp, catfish, albacore tuna, common dolphinfish, and beluga and sevruga (Lu *et al*., 2008; Jellouli *et al*., 2009; Khangembam and Chakrabarti, 2015; Dos Santos *et al*., 2016; Klomklao and Benjakul, 2018; dos Santos *et al*., 2020; Zamani *et al*., 2023). In general, thermostability of the trypsin enzyme might vary by some factors such as fish species and experimental conditions (Kanno *et al*., 2010). Trypsin from both samples had a maximal activity at pH 8.5. The optimum pH (8.5) recorded for the enzyme in both samples was similar with data reported from the brownstripe red snapper, masu salmon, albacore tuna, and Asian seabass (Kanno *et al*., 2010; Khantaphant and Benjakul, 2010; Klomklao and Benjakul, 2018; Patil *et al*., 2023). The stability of trypsin from both samples was highly preserved at pH values comprised between 5.0 and 11.0. Similar results were reported for trypsins from grey triggerfish, masu salmon, zebra blenny, catfish, albacore tuna, common dolphinfish, and beluga and sevruga (Jellouli *et al*., 2009; Kanno *et al*., 2010; Ktari *et al*., 2012; Dos Santos *et al*., 2016; Klomklao and Benjakul, 2018; dos Santos *et al*., 2020; Zamani *et al*., 2023). The high ranges of pH may change the net charge and conformation of an enzyme and inhibit to bind to substrate properly, resulting in the abrupt loss of enzymatic activity (Klomklao and Benjakul, 2018). Trypsins are mainly known to be more activity within a range of pH values comprised between 7.5 and 10.5 (Simpson, 2000). The sensitivity of protease

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

enzymes to various inhibitors is a valuable tool for their proper functional characterization (Dos Santos *et al*., 2020). The results of this study showed that specific inhibitors including SBTI and TLCK had a complete inhibitory effect on the enzyme activity from both samples while the other inhibitors partially inhibited the enzyme activity or had no inhibitory effect on the enzyme activity. Our findings was in agreement with data reported in the brownstripe red snapper, masu salmon, silver mojarra, zebra blenny, mrigral carp, albacore tuna, common dolphinfish, Asian seabass, and beluga and sevruga (Kanno *et al*., 2010; Khantaphant and Benjakul, 2010; Silva *et al*., 2011; Ktari *et al*., 2012; Khangembam and Chakrabarti, 2015; Klomklao and Benjakul, 2018; dos Santos *et al*., 2020; Zamani *et al*., 2023; Patil *et al*., 2023). SBTI is a single polypeptide chain that acts as a reversible competitive inhibitor of trypsin and forms a stable, enzymatically inactive complex with trypsin, resulting in reduction of the enzyme availability (Senphan *et al*., 2015). TLCK is an irreversible inhibitor of trypsin and trypsin-like serine protease that deactivates these enzymes through the formation of a covalent bond with histidine residue in the catalytic site of the enzyme and blocks the active center of the enzyme for binding to substrate (Eun-Sil *et al*., 1998). The obtained results from the metal ions showed that Ca^{2+} and Mg^{2+} increased the enzyme activity from the both samples while Cu^{2+}, Ba^{2+}, Zn^{2+}, and Al^{3+} decreased the enzyme activity and Na^{+} and K^{+} had no effect on the enzyme activity. Our results were in agreement with data reported in mandarin fish, zebra blenny, common dolphinfish, and beluga and sevruga (Lu *et al*., 2008; Ktari *et al*., 2012; dos Santos *et al*., 2020; Zamani *et al*., 2023). Metal ions can affect enzyme-catalyzed reactions by changing the electron flow in a substrate or enzyme and play a key role in binding to the substrate, depending on the functional groups present in the active site of enzyme. Abita *et al*. (1969) showed that Ca^{2+} can bind to the N-terminal of trypsinogen and, without changing its structure, increase the affinity of the lysine-isoleucine bond for hydrolysis by trypsin. Of course, the effect of metal ions on the activity of trypsin enzyme may depend on fish species as well as dietary and environmental adaptations (Khangembam and Chakrabarti, 2015). Based on the obtained results, the trypsin enzyme activity from the pyloric caeca and intestine of rainbow trout was significantly affected by the tested physicochemical factors which can affect the optimal activity of the enzyme in digestive physiology.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgment

The author would like to thank the staff of the Fisheries Laboratory at Malayer University for their helpful assistance during the research process.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

مجله علمی شیلات ایران ۹۸-۸۵ (٦) ٣٤ (DOI): 10.22092/ISFJ.2026.135184

مقاله علمی – پژوهشی:

تأثیر برخی شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی بر فعالیت آنزیم تریپسین امعاء و احشاء ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

عباس زمانی*[۱]

*a.zamani@malayeru.ac.ir

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

تاریخ دریافت: مرداد ۱٤۰٤ تاریخ پذیرش: مهر ۱٤۰٤ تاریخ چاپ: اسفند ۱٤۰٤

چکیده

در مطالعه حاضر، اثر برخی شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی بر فعالیت آنزیم تریپسین در عصاره خام تهیه شده از ضمائم پیلوریک و روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بررسی گردید. امعاء و احشاء ماهی بعد از انتقال به آزمایشگاه و جداسازی ضمائم پیلوریک و روده، در بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris- HCl همگن شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس مایع‌رویی حاصله برای بررسی شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی شامل دمای بهینه، پایداری دمایی، pH بهینه، پایداری pH، بازدارنده‌ها و یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم استفاده گردید. یافته‌ها نشان داد دما و pH بهینه فعالیت آنزیم از ضمائم پیلوریک و روده به‌ترتیب ۵۵ و ۸/۵ درجه سانتی‌گراد بود و در دمای ۵۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۵-۱۱ نیز پایدار بود. بازدارنده‌های SBTI، TLCK، PMSF، پپاستاتین A و یدواستیک اسید، بازدارندگی معنی‌داری بر فعالیت آنزیم داشتند ($p<۰/۰۵$) درحالی‌که در حضور TPCK و EDTA مهارکنندگی بر فعالیت آنزیم مشاهده نگردید. فعالیت آنزیم تریپسین در ضمائم پیلوریک و روده در حضور یون‌های Cu^{2+}، Ba^{2+}، Zn^{2+} و Al^{3+} کاهش معنی‌دار و در حضور یون‌های Ca^{2+} و Mg^{2+} افزایش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). بر اساس نتایج به‌دست آمده، فعالیت آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان به طور معنی‌داری تحت تأثیر شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی مورد مطالعه قرار داشت که می‌تواند بر فعالیت بهینه این آنزیم در فیزیولوژی گوارش مؤثر باشد.

لغات کلیدی: بازدارنده‌های آنزیمی، تریپسین، ضمائم پیلوریک، قزل‌آلای رنگین‌کمان، گوارش

*نویسنده مسئول

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

مقدمه

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی خانواده آزادماهیان، از دسته ماهیان سردابی است که پرورش آن در ایران از جایگاه بالایی برخودار بوده و بر اساس سالنامه آماری سازمان شیلات ایران میزان تولید آن طی سال‌های ۱۴۰۲-۱۳۹۸ از ۱۸۲۶۰۱ به ۲۳۷۷۱۰ تن رسیده است که یک افزایش ۳۰ درصدی را نشان می‌دهد (Iranian Fisheries Organization, 2024). بر اساس گزارش FAO (۲۰۲۴) میزان پرورش آزادماهیان طی سال‌های ۲۰۲۲-۲۰۱۸ از ۳۵۱۷۰۰۰ به ۴۲۴۳۰۰۰ رسیده است که یک افزایش ۲۱ درصدی را نشان می‌دهد و سهم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سال ۲۰۲۲ حدود ۹۵۹۶۰۰ تن بوده است. یکی از راهبردهای مهم در صنعت آبزی‌پروری به‌ویژه پرورش ماهی که بر میزان تولید و پرورش پایدار آن تأثیرگذار بوده، تولید جیره‌های غذایی برای افزایش رشد و کیفیت محصول است (Tacon, 2020). با این‌حال، توانایی ماهیان در هضم غذا عمدتاً به وجود آنزیم‌های گوارشی در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش مربوط می‌شود. علاوه بر جیره غذایی، حضور برخی ترکیبات شیمیایی مانند یون‌های فلزی و بازدارنده‌ها در محیط آبی نیز می‌تواند بر فعالیت آنزیم‌ها تاثیرگذار باشد. یون‌های فلزی به عنوان الکتروفیل یا نوکلئوفیل می‌توانند از طریق پیوندهای کئوردینانس، آنزیم و سوبسترا را به یکدیگر نزدیک کنند و با ایجاد تغییر در محیط هیدراتاسیون آنزیم، فعالیت کاتالیزوری آن را تحت تأثیر قرار دهند (Glusker *et al*., 2001). بازدارنده‌ها نیز ترکیباتی هستند که با جایگاه فعال و آلوستریک آنزیم واکنش می‌دهند و مانع عملکرد طبیعی آن می‌شوند و در محیط‌های آبی (به صورت ماده شیمیایی) و در برخی مواد غذایی وجود دارند (Garcia-Carreno *et al*., 1993).

آنزیم‌های گوارشی، قابلیت هضم در موجود زنده مورد مطالعه را منعکس می‌کنند و بیانگر وضعیت تغذیه‌ای در مراحل مختلف رشد هستند (Kolkovski, 2001; Yúfera and Darias, 2007). بنابراین، مطالعه فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در زمینه فیزیولوژی گوارش در ماهی ارائه کند و در شناسایی نیاز ماهیان پرورشی به مواد مغذی انرژی‌زا مانند پروتئین، چربی و کربوهیدرات مؤثر باشد (Bolasina *et al*., 2006). در میان این مواد مغذی، پروتئین‌ها در اشکال مختلف و با عملکردهای اختصاصی در بدن دیده می‌شوند و نقش کلیدی در رشد ماهی دارند به‌طوری‌که ارزش غذایی آنها به ترکیب اسید آمینه بستگی دارد. استفاده از منابع پروتئینی در جیره غذایی ماهیان به عوامل مختلفی از جمله ویژگی‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی گونه ماهی، عوامل محیطی (pH، اکسیژن محلول و سطح آمونیاک)، اسید آمینه پروتئین غذایی، وجود عوامل ضد تغذیه‌ای و ... بستگی دارد (Zamani *et al*., 2023).

هضم پروتئین در دستگاه گوارش به‌وسیله چند آنزیم پروتئاز با عملکردهای خاص بر زنجیره پلی‌پپتیدی انجام می‌شود که در این بین آنزیم‌های پپسین، تریپسین و کیموتریپسین مهم‌ترین آنزیم‌های پروتئازی محسوب می‌شوند (Rungruangsak-Torrissen *et al*., 2006) مطالعات نشان می‌دهد که آنزیم تریپسین در ترکیب با سایر پروتئازها و پپتیدازهای قلیایی (کیموتریپسین، آمینوپپتیدازها و کربوکسی‌پپتیدازها)، هضم اسیدی انجام شده در معده را تکمیل نموده و باقیمانده پروتئین و پپتیدها را هیدرولیز می‌کند تا اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک را برای جذب در روده آماده کند (Nolasco-Soria, 2021). بنابراین، فعالیت تریپسین به طور گسترده به عنوان یک شاخص ارزشمند از ظرفیت هضم در ماهی و یک نشانگر زیستی مفید برای وضعیت تغذیه‌ای و فیزیولوژیک نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Nazdar *et al*., 2018). طبق بررسی‌های انجام شده در گونه‌های مختلف ماهی، تریپسین در فعال‌سازی تریپسینوژن و سایر زیموژن‌ها در روده شرکت می‌کند و دارای نقش مؤثری در تجزیه پروتئین جیره غذایی در ماهیان گوشتخوار تا ۵۰-۴۰ درصد است (Nolasco-Soria, 2021). علاوه‌براین، بررسی فعالیت این سرینوپروتئاز در طراحی پروتکل‌های مربوط به قابلیت هضم مواد تشکیل‌دهنده خوراک و فرمولاسیون خوراک‌های با قابلیت هضم بالا در گونه‌های ماهیان پرورشی در محیط آزمایشگاه[1] ضروری است (Gilannejad *et al*., 2017). از این‌رو، درک بهتر ویژگی‌های آنزیم تریپسین می‌تواند

[1] *In vitro*

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

اطلاعات ارزشمندی را در مورد تجزیه پروتئین در دستگاه گوارش ماهی ارائه نماید.

خواص فیزیکی و شیمیایی آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده ماهیان مختلف از جمله کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idellus*)، کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*)، کپور هندی (*Cirrhinus mrigala*)، لیدرجکت تک شاخ (*Aluterus monoceros*)، فلاندر برزیلی (*Paralichthys orbignyanus*)، بس آسیایی (*Lates calcarifer*) و فیل ماهی (*Huso huso*) و اوزون برون (*Acipenser stellatus*) مورد مطالعه قرار گرفته است (Liu *et al*., 2007; Zamani *et al*., 2014; Khangembam and Chakrabarti, 2015; Zamani and Benjakul, 2016; Candiotto *et al*., 2017; Patil *et al*., 2023; Zamani *et al*., 2023). در مطالعه Zamani و همکاران (۲۰۲۳) خواص فیزیکی و شیمیایی آنزیم تریپسین از روده فیل ماهی و اوزون برون بررسی گردید که مقادیر بهینه pH و دما برای تریپسین هر دو گونه به‌ترتیب ۸/۵ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد و پایداری pH و دما نیز به‌ترتیب ۱۱-۶ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین یون Ca^{2+} باعث افزایش فعالیت و یون‌های Cu^{2+}، Zn^{2+} و Co^{2+} باعث کاهش فعالیت آنزیم گردیدند. بنابراین، با توجه به نقش شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی بر فعالیت آنزیم، هدف از این مطالعه بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی شامل دما و pH بهینه، دما و pH پایداری، اثر یون‌های فلزی و بازدارنده‌ها بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین در عصاره خام تهیه شده از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان است تا اطلاعات ارزشمندی در خصوص ظرفیت گوارشی ناشی از فعالیت این آنزیم در شرایط آزمایشگاهی حاصل گردد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه از ماهی

در این مطالعه، امعاء و احشاء ۱۰ عدد ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزن ۳۱±۸۰۰ گرم (نگهداری شده در دمای ۱۸ سانتی‌گراد درون مخزن فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری همراه با هوادهی و اسپری آب) در آبان ۱۴۰۳ از بازار تهیه شده و در داخل یک ظرف یونولیتی با نسبت ۱ به ۲ با یخ مخلوط گردیده و به آزمایشگاه منتقل شدند. و سپس ضمائم پیلوریک و روده به عنوان منابع آنزیمی از امعاء و احشاء در حضور یخ جدا شده و بعد از شستشو با آب مقطر سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) بلافاصله در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Zamani *et al*., 2014).

آماده‌سازی عصاره آنزیمی

نمونه ضمائم پیلوریک و روده پس از خروج از فریزر، ابتدا در دمای یخچال برای مدت ۲ ساعت قرار گرفتند تا از حالت انجماد خارج شوند. سپس برای چربی‌زدایی، نمونه‌ها به طور جداگانه با نسبت ۱ به ۳ با استون سرد (۲۰ درجه سانتی‌گراد) مخلوط شدند و همگن‌سازی با دستگاه هموژنایزر برای مدت ۱ دقیقه در حضور یخ انجام شد. سپس نمونه همگن شده با کمک کاغذ صافی واتمن (شماره ۲) فیلتر شده و مواد باقیمانده روی فیلتر با استون سرد چندین مرتبه شستشو شدند تا عمل چربی‌زدایی به‌خوبی انجام شود. سپس مواد باقیمانده روی فیلتر در دمای اتاق به مدت یک شبانه روز خشک شدند (Zamani *et al*., 2014). پودر خشک شده با بافر ۵۰ میلی مولار Tris-HCl و pH ۷/۵ (حاوی ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ و ۰/۵ مولار NaCl) با نسبت ۱ به ۱۰ 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 (Zamani *et al*., 2023).

سنجش فعالیت آنزیم تریپسین

برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین از روش Erlanger و همکاران (۱۹۶۱) و از سوبسترای BAPNA[1] استفاده گردید. در این روش، ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۱۲۵۰ میکرولیتر محلول سوبسترا- بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار pH،Tris-HCl ۸ حاوی ۱۰ میلی‌مولار

[1] Nα–benzoyl-DL-argenine-ρ-nitroanilide-HCL (BAPNA)

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

$CaCl_2$) مخلوط گردید و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۰٪ به مخلوط فوق اضافه شده و قرائت نوری در ۴۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر انجام شد. 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 تریپسین از فرمول ذیل استفاده گردید:

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

در فرمول مذکور ۸۸۰۰ بیانگر ضریب تاریکی برای پارا - نیتروآنیلین است که محصول هیدرولیز سوبسترای BAPNA به‌وسیله آنزیم تریپسین است.

سنجش پروتئین محلول

برای سنجش میزان پروتئین محلول در نمونه‌ها از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده گردید. در این روش از آلبومین سرم گاوی با غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بعنوان استاندارد استفاده شد و قرائت نوری نمونه‌ها در ۷۵۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر انجام شد.

دمای بهینه و دمای پایداری

برای تعیین دمای بهینه، ابتدا ۲۵ میکرولیتر نمونه آنزیمی با ۱۲۵۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا- بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، pH۸ ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$) ترکیب شد و برای مدت ۲۰ دقیقه در دماهای مختلف ۷۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس فعالیت آنزیم تریپسین در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین دمای پایداری، ابتدا نمونه آنزیمی در دماهای مختلف ۷۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و سپس ۲۵ میکرولیتر از نمونه با ۱۲۵۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا- بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، pH۸ ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$) مخلوط شد و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد (Zamani *et al*., 2014). فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه کنترل (بدون حرارت دهی) بر اساس فرمول ذیل به صورت درصد محاسبه گردید:

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

pH بهینه و pH پایداری

برای تعیین pH بهینه، ابتدا ۲۵ میکرولیتر نمونه آنزیمی بعد از مخلوط شدن با ۱۲۵۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا- بافر با pH مختلف (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار استات سدیم با pH ۶-۴، بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس با pH۹-۷ و بافر ۵۰ میلی مولار گلایسین با pH۱۱-۱۰؛ تمام بافرها حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$ بودند)، برای ۲۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس فعالیت آنزیم تریپسین در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه گیری شد.

برای تعیین پایداری pH، ابتدا نمونه آنزیمی با نسبت ۱ به ۱ با هر یک از بافرهای مذکور فوق ترکیب شده و سپس برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۲۵ میکرولیتر از نمونه انکوبه شده با ۱۲۵۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا- بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، pH ۸ حاوی ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$) مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد (Zamani *et al*., 2023). فعالیت نسبی

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه کنترل (بدون انکوباسیون در بافر با pH های مختلف) بر اساس فرمول ذیل محاسبه و به صورت درصد گزارش گردید:

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

یون‌های فلزی

اثر یون‌های فلزی شامل یون‌های تک ظرفیتی (Na^{+} و K^{+})، دو ظرفیتی (Ca^{2+}، Mg^{2+}، Ba^{2+}، Cu^{2+} و Zn2+) و سه ظرفیتی (Al^{3+}) در غلظت ۵ میلی‌مولار بر فعالیت آنزیم تریپسین بررسی شد (Zamani *et al.*, 2023). برای این منظور، ابتدا نمونه آنزیمی با یون‌های فلزی با نسبت ۱ به ۱ برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۲۵ میکرولیتر از مخلوط فوق با ۱۲۵۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا- بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، pH۸، ۱۰ میلی‌مولار CaCl2) ترکیب شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲۵۰ میکرولیتر اسید استیک ٪۳۰ به مخلوط مذکور اضافه شده و قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد یون فلزی بود. سپس فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمول ذیل به صورت درصد گزارش گردید:

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

بازدارنده‌های آنزیمی

ابتدا نمونه آنزیمی با نسبت ۱ به ۱ با بازدارنده‌های SBTI[1] (۰/۰۵ میلی‌مولار) و TLCK[2] (۵ میلی‌مولار) بعنوان بازدارنده‌های اختصاصی تریپسین، PMSF[3] (۱۰میلی‌مولار) بعنوان بازدارنده پروتئازهای سرین، TPCK[4] (۵ میلی‌مولار) به عنوان بازدارنده اختصاصی کیموتریپسین، پپاستاتین A[5] (۰/۰۱ میلی‌مولار) بعنوان بازدارنده اختصاصی پروتئازهای آسپارتیک، یدواستیک اسید[6] (۱ میلی‌مولار) به عنوان بازدارنده پروتئازهای سیستئین و EDTA[7] (۲ میلی‌مولار) به عنوان بازدارنده متالوپروتئازها، ترکیب شده و برای ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۲۵ میکرولیتر از مخلوط آنزیمی مذکور با ۱۲۵۰میکرولیتر محلول سوبسترا - بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، pH۸، ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$) ترکیب شد و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲۵۰ میکرولیتر اسید استیک ٪۳۰ به مخلوط مذکور اضافه شده و قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد بازدارنده بود (Zamani *et al.*, 2014). سپس فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمول ذیل به صورت درصد گزارش گردید:

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

روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

این مطالعه بر اساس طرح کاملاً تصادفی طرح ریزی گردید و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها تحت نرم افزار SPSS20 در ۳ تکرار انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف-

[1] Soybean trypsin inhibitor
[2] N-tosyl-L-Lysine Chloromethyl Keton
[3] Phenyl-methyl-sulfonyl fluorideμμμμ
[4] N-tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone
[5] Pepstatin A
[6] Iodoacetic acid
[7] Ethylenediaminetetraacetic acid

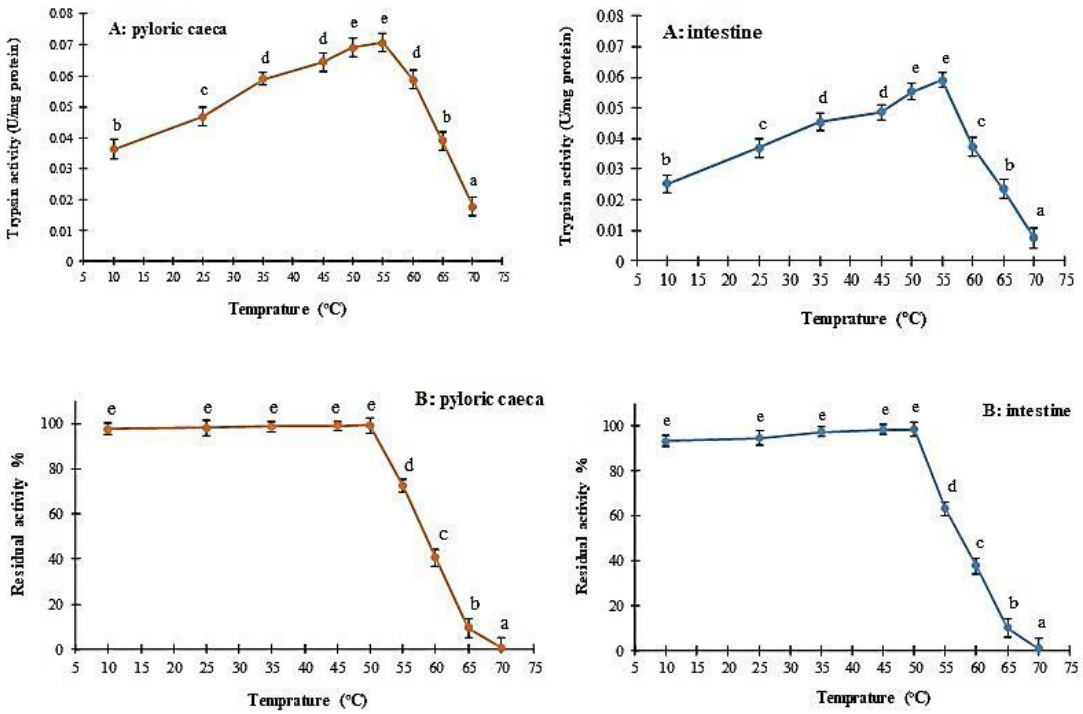
[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

اسمیرنوف بررسی شده و سپس تأثیر دما، pH، یون‌های فلزی و بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین از طریق آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) آنالیز شد و در ادامه برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها بین نمونه شاهد با شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی مورد مطالعه، از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده گردید.

نتایج

دما بهینه و پایداری دمایی

در شکل ۱، نتایج حاصل از بررسی دمای بهینه و پایداری دمایی آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده ارائه شده است. دمای بهینه آنزیم در هر دو نمونه ضمائم پیلوریک و روده برابر با ۵۵ درجه سانتی‌گراد بود به‌طوری‌که با افزایش دما در محدوده ۵۵-۱۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم افزایش یافت و در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به حداکثر خود رسید ولی در دامنه ۷۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد یک کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم مشاهده گردید (p<۰/۰۵). پایداری دمایی آنزیم تریپسین نیز نشان داد که با افزایش دما در دامنه ۵۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد برای ضمائم پیلوریک و روده حدود ۹۹ درصد فعالیت آنزیم حفظ شد درحالی‌که در دامنه ۷۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد، کاهش معنی‌داری در پایداری آنزیم در ضمائم پیلوریک و روده مشاهده شده که در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تقریباً غیرفعال گردید (p<۰/۰۵).



شکل ۱: تأثیر دما بر فعالیت آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان. A: دمای بهینه، B: دمای پایداری (± Mean (SD, n = 3, p<0.05

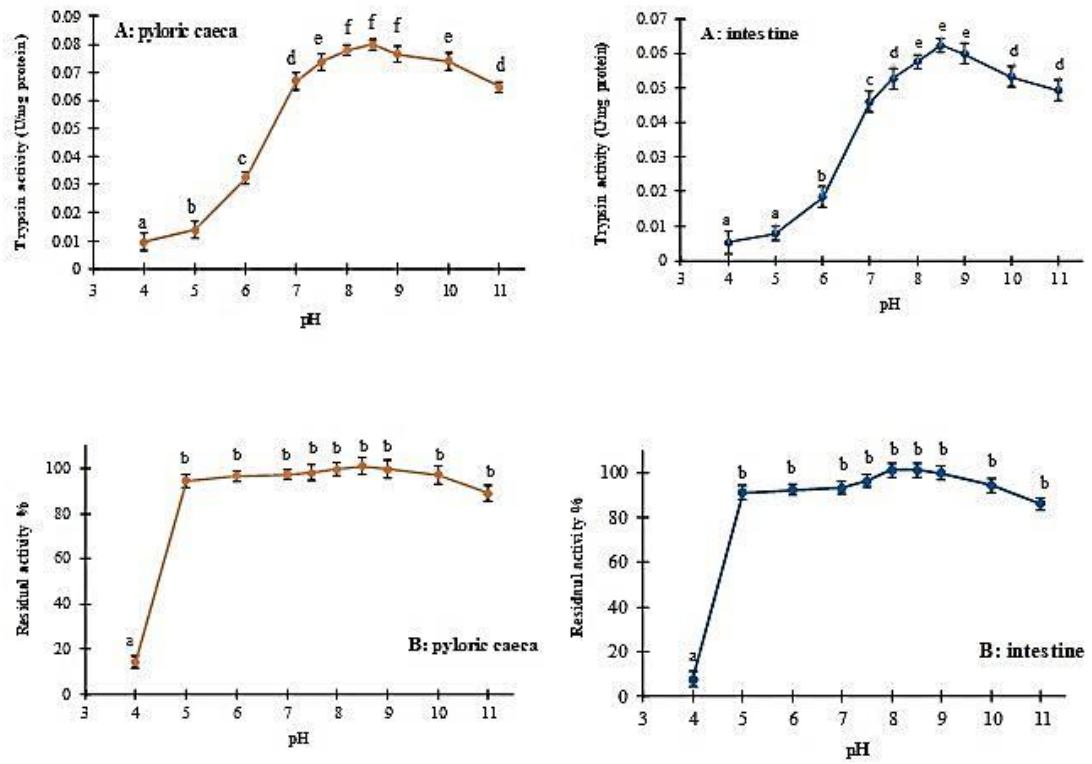
Figure 1: Effect of temperature on the trypsin activity from rainbow trout pyloric caeca and intestine. A: optimum temperature, B: thermostability (Mean ± SD, n = 3, p<0.05)

H بهینه و پایداری pH

در شکل ۲، pH بهینه و پایداری pH آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده نشان داده شده است. pH بهینه برای فعالیت آنزیم در ضمائم پیلوریک و روده برابر ۸/۵ بود به‌طوری‌که با افزایش pH در دامنه ۸/۵-۴، فعالیت آن افزایش و pH در دامنه ۱۱-۹، فعالیت کاهش یافت جایی‌که

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

در pH به‌شدت اسیدی و قلیایی (۴ و ۱۱)، کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم ثبت گردید (p<۰/۰۵). پایداری pH نیز نشان داد که آنزیم تریپسین در ضمائم پیلوریک و روده pH در دامنه ۱۱-۵ پایدار بود و تا ۹۹٪ فعالیت آن حفظ شد که در مقایسه با pH ۴ به طور معنی‌داری بالا بود (p<۰/۰۵) به‌طوری‌که در pH ۴ تقریباً ناپایدار بود و فعالیت آن به طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵).



شکل ۲: تأثیر pH بر فعالیت آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان. A: pH بهینه، B: پایداری pH (Mean ± SD, n = 3, p<0.05

Figure 2: Effect of pH on the trypsin activity from rainbow trout pyloric caeca and intestine. A: optimum pH, B: pH stability (Mean ± SD, n = 3, p<0.05).

اثر یون‌های فلزی

در جدول ۱، تأثیر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده ارائه شده است. بر اساس نتایج حاصله، یون‌های K^+ و Na^+ تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم از ضمائم پیلوریک و روده نسبت به نمونه شاهد نداشتند. یون‌های Ca^{2+} و Mg^{2+} باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد گردیدند جایی‌که بیشترین میزان فعالیت در حضور یون Mg^{2+} مشاهده شد (p<۰/۰۵) درحالی‌که در حضور یون‌های Cu^{2+}، Ba^{2+}، Zn^{2+} و Al^{3+} کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد ثبت شد جایی‌که کمترین میزان فعالیت در حضور یون Al^{3+} مشاهده شد (p<۰/۰۵).

اثر بازدارنده‌ها

در جدول ۲، نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارنده‌ها بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده ارائه شده است. بر اساس نتایج حاصله، میزان فعالیت آنزیم از ضمائم پیلوریک و روده نسبت به نمونه شاهد در حضور تمام

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

بازدارنده‌ها به‌جز EDTA و TPCK بازدارندگی معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵) درحالی‌که بین EDTA و TPCK اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در ضمائم پیلوریک و روده بین بازدارنده‌های SBTI و TLCK و بین بازدارنده‌های پپاستاین A و یدواستیک اسید، اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. بالاترین میزان بازدارندگی در ضمائم پیلوریک و روده در حضور SBTI و TLCK و سپس PMSF ثبت گردید.

جدول ۱: تأثیر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم ترپیسین از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان

Table 1: Effect of metal ions on the trypsin activity from Rainbow trout pyloric caeca and intestine

Metal ions	Concentration	Residual activity (%)	
		Pyloric caeca	*Intestine*
Control	-	100 ± 0.00 [d]	100 ± 0.00 [d]
K^+	5 mM	100 ± 1.36 [d]	100 ± 1.13 [d]
Na^+	5 mM	100 ± 1.21 [d]	100 ± 1.23 [d]
Ca^{2+}	5 mM	113.1 ± 1.66 [e]	105.2 ± 1.47 [e]
Mg^{2+}	5 mM	118.5 ± 1.25 [e]	109.6 ± 1.41 [e]
Cu^{2+}	5 mM	71.6 ± 1.58 [b]	65.4 ± 1.34 [b]
Zn^{2+}	5 mM	79.8 ± 1.27 [c]	71.9 ± 1.12 [c]
Ba^{2+}	5 mM	80.2 ± 1.76 [c]	71.2 ± 1.41 [c]
Al^{3+}	5 mM	22.3 ± 1.39 [a]	15.8 ± 0.93 [a]

(Mean ± SD, n = 3, p<0.05)حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است

Different lowercase letters in the same column show a significant difference (Mean ± SD, n = 3, p<0.05)

جدول ۲: تأثیر بازدارنده‌ها بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان

Table 2: Effect of inhibitors on the trypsin activity from Rainbow trout pyloric caeca and intestine

Inhibitors	Concentration	Inhibition (%)	
		Pyloric caeca	*Intestine*
Control	-	0.0 ± 0.00 [a]	0.0 ± 0.00 [a]
PMSF	10 mM	37.9 ± 0.22 [c]	34.5 ± 0.18 [c]
SBTI	0.05 mM	99.5 ± 0.21 [d]	99.1 ± 0.16 [d]
TLCK	5 mM	99.0 ± 0.36 [d]	99.0 ± 0.20 [d]
TPCK	5 mM	0.0 ± 0.00 [a]	0.0 ± 0.00 [a]
Pepstatine A	0.01mM	0.5 ± 0.00 [b]	0.5 ± 0.00 [b]
Iodoacetic acid	1 mM	0.5 ± 0.00 [b]	0.5 ± 0.00 [b]
EDTA	2 mM	0.0 ± 0.00 [a]	0.0 ± 0.00 [a]

(Mean ± SD, n = 3, p<0.05)حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است

Values marked with different lowercase letters in the same column are significantly different (Mean ± SD, n = 3, p<0.05)

بحث

دما و pH از شاخص‌های فیزیکوشیمیایی مؤثر بر فعالیت آنزیم‌ها بوده و هر آنزیم برای فعالیت کاتالیزوری خود دارای دما و pH بهینه است. در مطالعه حاضر، دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان ۵۵ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید که با نتایج گزارش شده در ماهی موجارا نقره‌ای (*Diapterus rhombeus*)، ماهی مرکب (*Sepia officinalis*)، لیدرجکت تک‌شاخ (*Aluterus monoceros*)، فیل ماهی (*Huso huso*) و اوزون برون (*Acipenser stellatus*)، مطابقت داشت (Silva *et al*., 2011; Balti *et al*., 2012; Zamani and Benjakul, 2016; Zamani *et al*., 2023). بررسی‌ها نشان می‌دهد دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین در محدوده ۶۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار دارد به‌طوری‌که در ماهی کپور هندی (*C.mrigala*) دمای ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد (Khangembam and Chakrabarti, 2015)، گربه ماهی (*Luphiosilurus alexandri*) دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (dos Santos *et*

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

al., 2016) ، ماهی گالیت (*Coryphaena hippurus*) دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد (dos Santos *et al*., 2020) و ماهی پیراروکو (*Arapaima gigas*) دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد (de Freitas-Júnior *et al*., 2021)، گزارش گردیده است. البته تفاوت در دمای فعالیت آنزیم می‌تواند ناشی از دمای زیستگاه ماهی، سوبسترای مورد استفاده برای سنجش فعالیت آنزیم و شرایط آزمایشی باشد (Klomklao and Benjakul, 2018). اگرچه تریپسین حاصل از ماهیان عمدتاً در دمای بالاتر از ۵۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد ناپایدار است، اما پایداری حرارتی آن در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌خوبی شناخته شده است.

دمای پایداری آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. پایداری دمایی این آنزیم با پایداری دمایی آنزیم تریپسین در ماهی *Siniperca chuatsi*، *Balistes capticus*، ماهی کپور هندی (*C.mrigala*)، گربه ماهی (*L.alexandri*)، ماهی تون باله‌دراز (*Thunnus alalunga*)، ماهی گالیت (*C.hippurus*) فیل ماهی (*H.huso*) و اوزون برون (*A.stellatus*) مشابهت داشت (Lu *et al*., 2008; Jellouli *et al*., 2009; Khangembam and Chakrabarti, 2015; Dos Santos *et al*., 2016; Klomklao and Benjakul, 2018; dos Santos *et al*., 2020; Zamani *et al*., 2023). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد، پایداری دمایی آنزیم تریپسین در ماهیان مناطق سردسیری تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در ماهیان مناطق گرمسیری و معتدله تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد است. غیرفعال شدن آنزیم[1] در دماهای بالا احتمالاً می‌تواند به دلیل از هم گسیختگی ساختاری[2] آنزیم باشد. پایداری دمایی آنزیم تریپسین در ماهیان ارتباط مستقیمی با دمای زیستگاه ماهی دارد و می‌تواند نشان‌دهنده این واقعیت باشد که ماهیان جانورانی خونسرد هستند، البته دمای بهینه و پایداری آنزیم می‌تواند نسبت به دمای زیستگاه ماهی بالاتر باشد (Rungruangsak-Torrissen *et al*., 2006).

مقدار pH بهینه برای آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان ۸/۵ بود. در مطالعه Khantaphant و Benjakul (۲۰۱۰) در ماهی سرخو (*L.vitta*)، Kanno و همکاران (۲۰۱۰) در ماهی آزاد (*Oncorhynchus masou*)، Klomklao و Benjakul (۲۰۱۸) در ماهی تون باله دراز (*T.alalunga*) و Patil و همکاران (۲۰۲۳) در بس آسیایی (*L.calcarifer*)، چنین نتایجی گزارش گردید. pH بهینه فعالیت آنزیم تریپسین در ماهی کپور هندی (*C.mrigala*) و ماهی گالیت (*C.hippurus*) برابر ۸ (Khangembam and Chakrabarti, 2015; dos Santos *et al*., 2020) در گربه ماهی (*L.alexandri*) برابر ۹ (dos Santos *et al*., 2016) و ماهی پیراروکو (*A.gigas*) (de Freitas-Júnior *et al*., 2021) برابر ۹/۲۵ گزارش شده بود. در مطالعه Simpson (۲۰۰۰) تریپسین در ماهیان معمولاً در pH قلیایی به‌ویژه pH در دامنه ۱۰/۵-۷/۵ دارای فعالیت بهینه است. آنزیم تریپسین 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.

در مطالعه حاضر، پایداری pH آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان بر اساس دامنه بررسی شده (۱۱-۴)، ۱۱-۵ ثبت شد که با نتایج حاصل از مطالعه Jellouli و همکاران (۲۰۰۹) در ماهی تریگر خاکستری (*B.capriscus*)، Kanno و همکاران (۲۰۱۰) در ماهی آزاد ماسو (*O.masou*)، Ktari و همکاران (۲۰۱۲) در زبرا بلنی (*Salaria basilisca*)، dos Santos و همکاران (۲۰۱۶) در گربه ماهی (*L.alexandri*)، Klomklao و Benjakul (۲۰۱۸) در ماهی تون باله دراز (*T.alalunga*)، dos Santos و همکاران (۲۰۲۰) در ماهی گالیت (*C.hippurus*) و Zamani و همکاران (۲۰۲۳) در فیل‌ماهی (*H.huso*) و اوزون‌برون (*A.stellatus*)، مطابقت داشت. پایداری آنزیم در pH به‌خصوص می‌تواند با بارالکتریکی آنزیم در آن pH مرتبط باشد. در pH به‌شدت اسیدی و قلیایی، دفع الکترواستاتیک بین مولکولی قوی از طریق القاء بار الکتریکی، سبب تورم و از هم گسیختگی

[1] Inactivation
[2] Unfolding

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

ساختار آنزیم می‌شود (Khangembam and Chakrabarti, 2015). در ماهیان نسبت اسید آمینه‌های اسیدی به قلیایی در آنزیم تریپسین بالاتر از آنزیم تریپسین پستانداران است و به همین دلیل تریپسین ماهیان در pH اسیدی ناپایدار بوده و در pH قلیایی، دارای پایداری مناسبی است (Patila *et al*., 2025).

نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که بازدارنده‌های اختصاصی (SBTI و TLCK) تأثیر مهارکنندگی کاملی بر فعالیت این آنزیم داشتند، ولی سایر بازدارنده‌ها تا حدی از فعالیت آنزیم جلوگیری کردند یا اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم نداشتند. نتایج مطالعه حاضر با مطالعات انجام شده بر ماهی آزاد (*O.masou*)، ماهی سرخو (*L.vitta*) ، *Diapterus rhombeus*، زبرا بلنی (*S.basilisca*)، کپور هندی (*C.mrigala*)، تون باله دراز (*T.alalunga*)، ماهی گالیت (*C.hippurus*)، فیل‌ماهی (*H.huso*) و اوزن‌برون (*A.stellatus*) و بس آسیایی (*L. calcarifer*)، مطابقت داشت (Kanno *et al*., 2010; Khantaphant and Benjakul, 2010; Silva *et al*., 2011; Ktari *et al*., 2012; Khangembam and Chakrabarti, 2015; Klomklao and Benjakul, 2018; dos Santos *et al*., 2020; Zamani *et al*., 2023; Patil *et al*., 2023). بازدارنده SBTI پلی‌پپتیدی تک زنجیره و نوعی بازدارنده رقابتی و برگشت‌پذیر برای آنزیم تریپسین است که کمپلکسی پایدار با آنزیم ایجاد می‌کند و منجر به کاهش دسترسی آنزیم به سوبسترای واقعی می‌گردد (Senphan *et al*., 2015). بازدارنده TLCK یک بازدارنده برگشت‌ناپذیر برای آنزیم تریپسین است که از طریق تشکیل پیوند کووالانسی با اسید آمینه هیستیدین در جایگاه فعال آنزیم باعث مسدود شدن این جایگاه جهت اتصال به سوبسترا می‌شود (Eun-Sil *et al*., 1998). بازدارنده PMSF دارای اثر مهارکنندگی بر فعالیت آنزیم تریپسین بود که نشان داد، این پروتئاز می‌تواند از دسته پروتئازهای سرین باشد. پروتئازهای سرین دسته‌ای از آنزیم‌های پروتئازی هستند که در جایگاه فعال آنها اسید آمینه سرین در مرکز فعالیت کاتالیزوری قرار دارد (Garcia-Carreno *et al*., 1993).

نتایج حاصل از بررسی یون‌های فلزی نشان داد یون‌های کلسیم و منیزیم باعث افزایش فعالیت آنزیم تریپسین از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین کمان گردیدند درحالی‌که سایر یون‌های فلزی اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم داشتند یا مانند سدیم و پتاسیم اثری بر فعالیت آنزیم نشان ندادند. این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعه Lu و همکاران (۲۰۰۸) در ماهی *S. chuatsi*، Ktari و همکاران (۲۰۱۲) در ماهی زبرا بلنی (*S.basilisca*)، dos Santos و همکاران (۲۰۲۰) در ماهی گالیت (*C. hippurus*) و Zamani و همکاران (۲۰۲۳) در فیل ماهی (*H.huso*) و اوزون‌برون (*A.stellatus*)، همخوانی دارد. در ارتباط با اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم تریپسین باید اشاره نمود، آنها می‌توانند به عنوان کوفاکتور باعث افزایش فعالیت آنزیم شوند یا در برخی موارد فعالیت آنزیم را کاهش دهند به‌طوری‌که یون‌های کلسیم و منیزیم باعث افزایش فعالیت آن می‌شوند درحالی‌که برخی مانند مس از فعالیت آنزیم جلوگیری می‌کنند (Green *et al*., 1952). یون‌های فلزی می‌توانند به طور موثری 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. معمولاً توزیع بار در جایگاه فعال یک آنزیم به‌گونه‌ای است تا وضعیت گذار واکنش کاتالیز شده نسبت به سوبسترا را تثبیت نماید (Glusker *et al*., 2001). Abita و همکاران (۱۹۶۹) نشان دادند، یون کلسیم می‌تواند به N-terminal تریپسینوژن، متصل شده و بدون تغییر در ساختار آن، باعث افزایش میل ترکیبی پیوند لایزین–ایزولوسین جهت هیدولیز با تریپسین شود. البته تأثیر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین در گونه‌های مختلف ماهیان ممکن است تابع گونه ماهی و سازگاری‌های غذایی و زیست‌محیطی آن باشد (Khangembam and Chakrabarti, 2015).

از نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت، فعالیت آنزیم تریپسین موجود در عصاره خام تهیه شده از ضمائم پیلوریک و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر شاخص‌های فیزیکی

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

و شیمیایی مورد مطالعه بوده و کنترل آنها می‌تواند بر فعالیت بهینه این آنزیم پروتئازی مهم در فیزیولوژی گوارش این گونه پرورشی تاثیرگذار باشد. البته باید به این نکته نیز توجه نمود، این مطالعه در شرایط برون‌تنی برای بررسی ویژگی‌های آنزیم تریپسین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گرفته است و مطالعات آتی می‌تواند در شرایط درون‌تنی برای حصول نتایج دقیق‌تر انجام شود. همچنین در مطالعه حاضر، نقش شاخص‌های فیزیکوشیمیایی فقط بر فعالیت آنزیم تریپسین بررسی شده است. بنابراین، برای بررسی بهبود عملکرد تغذیه‌ای از نظر آنزیم‌های گوارشی، بایستی به نقش سایر آنزیم‌های دخیل در گوارش (پپسین، کیموتریپسین، آلفا-آمیلاز و لیپاز) نیز توجه کرد.

منابع

Abita, J.P., Delaage, M., Lazdunski, M. and Savrda, J., 1969. The mechanism of activation of trypsinogen: The role of the four N-terminal aspartyl residues. *European Journal of Biochemistry*, 8(3):314-324. DOI:10.1111/j.1432-1033.1969.tb00530.x

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

Bolasina, S., Pérez, A. and Yamashita, Y., 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 252(2-4):503-515. DOI:10.1016/j.aquaculture.2005.07.015

Candiotto, F.B., Freitas-Júnior, A.C.V., Neri, R.C.A., Bezerra, R.S., Rodrigues, R.V., Sampaio, L.A. and Tesser, M.B., 2017. Characterization of digestive enzymes from captive Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Brazilian Journal of Biology*, 78(2):281-288. DOI:10.1590/ 1519-6984.06616

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

dos Santos, C.W.V., da Costa Marques, M.E., de Araújo Tenório, H., de Miranda, E.C. and Pereira, H.J.V., 2016. Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 8:29-33. DOI:10.1016/j.bbrep.2016.08.003

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 dolphin fish): Purification, characterization, and application in commercial detergents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25:101584. DOI:10.1016/j.bcab.2020.101584

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

Erlanger, B.F., Kokowsky, N. and Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95(2):271-278. DOI:10.1016/0003-9861(61)90145-X

Eun-Sil, O., Jae-Hyeung, P., Deuk-Moon, C. and Chang-Bum, A., 1998. Comparative biochemical properties of proteinases from the hepatopancreas of shrimp. -I. purification of protease from the hepatopancreas of *Penaeus japonicus*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 1(2):201-208.

FAO, 2024. The state of world fisheries and aquaculture 2024 blue transformation in action. Available at: https://www.fao.org/publications/fao-flagship-publications/the-state-of-world-fisheries-and-aquaculture/en. (accessed on 02 April 2024).

Garcia-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

Gilannejad, N., Martínez-Rodríguez, G., Yúfera, M. and Moyano, F.J., 2017. Estimating the effect of different factors on the digestive bioaccessibility of protein by the Senegalese sole (*Solea senegalensis*); combination of response surface methodology and in vitro assays. *Aquaculture*, 477:28-34. DOI:10.1016/j.aquaculture.2017.04.037

Glusker, J.P., Katz, A.K. and Bock, C.W., 2001. Two-metal binding motifs in protein crystal structures. *Structural Chemistry*, 12(3):323-341. DOI:10.1023/A:1016636712985

Green, M.M., Gladner, J.A., Cunningham Jr, L.W. and Neurath, H., 1952. The effects of divalent cations on the enzymatic activities of trypsin and of α-chymotrypsin1. *Journal of the American Chemical Society*, 74(8):2122-2123. DOI:10.1021/ja01128a523

Iranian Fisheries Organization, 2024. Annual report. Ghorbanzade RA, Nazari S, (editors). Available online: http://www.fisheries.ir/site/vahed_with_shakhes_v.aspx?uc=18 (accessed on 07 October 2024).

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(3): 644-650. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.02.087

Kanno, G., Yamaguchi, T., Kishimura, H., Yamaha, E. and Saeki, H., 2010. Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh-water. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(3):637-645. DOI:10.1007/s10695-009-9336-4

Khangembam, B.K. and Chakrabarti, R., 2015. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: Purification, characterization and its potential application.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

Food chemistry, 175:386-394. 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(3):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(1-2):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

Liu, Z.Y., Wang, Z., Xu, S.Y. and Xu, L.N., 2007. Two trypsin isoforms from the intestine of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Comparative Physiology b177*, (6):655-666. DOI:10.1007/s00360-007-0163-6

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A.L. and Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1):265-275.

Lu, B.J., Zhou, L.G., Cai, Q.F., Hara, K., Maeda, A., Su, W.J. and Cao, M.J., 2008. Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chemistry*, 110(2):352-360. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.02.010

Nazdar, N., Imani, A., Noori, F. and Sarvi Moghanlou, K., 2018. Effect of silymarin supplementation on nickel oxide nanoparticle toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings: Pancreas tissue histopathology and alkaline protease activity. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42(2):353-361. DOI:10.1007/s40995-016-0052-5

Nolasco-Soria, H., 2021. Improving and standardizing protocols for alkaline protease quantification in fish. *Reviews in Aquaculture*, 13(1):43-65. DOI:10.1111/raq.12463

Patil, U., Baloch, K.A., Nile, S.H., Kim, J.T. and Benjakul, S., 2023. Trypsin from pyloric caeca of Asian seabass: Purification, characterization, and its use in the hydrolysis of acid-soluble collagen. *Foods*, 12(15): 2937. DOI:10.3390/foods12152937

Patila, U., Prashanthkumara, M.C. and Benjakula, S., 2025. Sustainable exploitation of fish visceral proteases: Molecular characteristics and diverse applications. *Science Asia*, 51S(1):1–12. DOI:10.2306/scienceasia1513-1874.2025.s003

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]

Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L.H., Berg, A. and Waagbø, R., 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(1):7-23. DOI:10.1007/s10695-005-0630-5

Senphan, T., Benjakul, S. and Kishimura, H., 2015. Purification and characterization of trypsin from hepatopancreas of Pacific white shrimp. *Journal of Food Biochemistry*, 39(4):388-397. https://doi.org/10.1111/jfbc.12147

Silva, J.F., Espósito, T.S., Marcuschi, M., Ribeiro, K., Cavalli, R.O., Oliveira, V. and Bezerra, R.S., 2011. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). *Food Chemistry*, 129(3):777-782. DOI:10.1016/j.foodchem. 2011.05.019

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. Marcel Dekker, New York, NY, USA. pp. 531–540.

Tacon, A.G., 2020. Trends in global aquaculture and aquafeed production: 2000–2017. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 28(1):43-56. DOI:10.1080/23308249.2019 .1649634

Yúfera, M. and Darias, M.J., 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268(1-4):53-63. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.04.050

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., Khajavi, M., Abedian Kenari, A., Haghbin Nazarpak, M., Solouk, A., Esmaeili, M. and Gisbert, E., 2023. Physicochemical and biochemical properties of trypsin-like enzyme from two sturgeon species. *Animals*, 13(5):853. DOI:10.3390/ani13050853

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-29]