[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.4.6.7]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110023]

اثرات برخی از عوامل بیوشیمیایی بر فعالیت آنزیم تریپسین روده و ضمائم پیلوریک کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) برای جلوگیری از پدیده هضم دیواره شکمی در محیط *in vitro*

عباس زمانی[۱]؛ مسعود رضائی[۲]* و رسول مدنی[۳]

rezai_ma@modares.ac.ir

۱و۲- دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس نور، صندوق پستی: ۳۵٦-٦٤٤١٤

۳- موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، صندوق پستی: ۱۵۵۸-۱۱۳٦۵

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۰

چکیده

در این تحقیق عوامل بیوشیمیایی موثر در فعالیت آنزیم تریپسین روده و ضمائم پیلوریک که در پدیده هضم دیواره شکمی (Belly Bursting) در ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) نقش دارد، مورد مطالعه قرار گرفتند. بررسی عوامل دما، pH، عناصر فلزی و بازدارنده‌ها نشان داد که آنزیم تریپسین در دامنه دمایی بین ۷۰- ۴ درجه سانتیگراد، بیشترین فعالیت را در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد داشت و توانست پایداری خود را تا دمای ۵۵ درجه سانتیگراد نیز حفظ نماید. بررسی فعالیت آنزیم تریپسین در دامنه pH ۴ تا ۱۱ نشان داد که آنزیم تریپسین بالاترین فعالیت را در pH ۸/۵ داشت و بالاترین پایداری را نیز در این pH نشان داد. اثر عناصر فلزی بررسی شده در این تحقیق نیز آشکار نمود که $CaCl_2$، $MgCl_2$ و $MnCl_2$ اثر افزایشی و عناصر $CuCl_2$، $ZnCl_2$ و $Al_2(SO4)_3$ اثر کاهشی بر فعالیت آنزیم تریپسین از خود نشان دادند. بازدارنده‌های SBTI، PMSF، TLCK و ρ-aminobenzamidine نیز اثر بازدارندگی روی فعالیت آنزیم تریپسین روده و ضمائم پیلوریک نشان دادند و از بین آنها SBTI و TLCK که دو بازدارنده اختصاصی برای آنزیم تریپسین هستند بطور معنی‌داری از فعالیت آنزیم جلوگیری نمودند. نتایج این بررسی‌ها در محیط *in vitro* نشان داد که استفاده از دمای پایین (۴ درجه سانتیگراد)، pH اسیدی، عناصر $CuCl_2$، $ZnCl_2$ و $Al_2(SO4)_3$ و بازدارنده‌های SBTI و TLCK می‌توانند از فعالیت آنزیم تریپسین در روده و ضمائم پیلوریک و از هضم دیواره شکمی ناشی از فعالیت آنزیم تریپسین جلوگیری نمایند.

لغات کلیدی: تغذیه، دستگاه گوارش، دیواره شکمی، ترکیبات بازدارنده

مقدمه

با توجه به رشد جمعیت جهان و نیاز به ذخیره‌سازی و انتقال مناسب غذا (مانند ماهیان) از یک مکان به مکان دیگر، حفاظت از آنها به منظور افزایش مدت ماندگاری و حفظ ترکیبات مغذی، طعم و بافت آنها ضروری می‌باشد (Ghaly *et al*, 2010). کیلکا ماهیان (*Clupeidae*) یکی از مهمترین ذخایر ماهیان دریای خزر بشمار می‌روند که به علت داشتن ترکیبات ارزشمند غذایی برای مصارف متنوعی از جمله تهیه آرد ماهی، کنسرو، ماریناد، انواع محصولات خمیری و غیره قابل استفاده می‌باشد (رضایی و همکاران، ۱۳۸۵). کیلکا ماهیان دریای خزر متعلق به جنس *Clupeonella* بوده و شامل سه گونهٔ کیلکای معمولی (*C. cultriventris caspia*)، کیلکای آنچوی (*C. engrauliformis*) و کیلکای چشم درشت (*C .grimmi*) می‌باشند که در بین این گونه‌ها، ماهی کیلکای معمولی بیش از ۹۰ درصد صید را بخود اختصاص داده است (سازمان شیلات ایران، ۱۳۸۹؛ Karimzadeh *et al*., 2010). یکی از مهمترین مشکلاتی که درکیلکا ماهیان صید شده مانند سایر ماهیان کوچک پلاژیک مشاهده می‌شود بروز پدیده هضم دیواره شکمی (Belly Burst) است که یکی از انواع خود هضمی آنزیمی (Enzymatic Autolysis) بوده و باعث تجزیه عضلات ناحیه شکمی می‌شود (FAO, 2005; Kishimura *et al.*, 2005). این نوع خود هضمی بروز پدیده‌هایی مثل نرم‌شدگی و تخریب دیواره بافت شکمی و خارج شدن خونابه حاوی پروتئین و چربی به خارج از بدن را بدنبال دارد و در نتیجه ورود میکروبها به داخل بدن تسهیل شده و با رشد آنها زمینه برای ایجاد فساد میکروبی فراهم می‌شود و در نهایت منجر به افت کیفی ماهیان و فرآورده‌های حاصل از آنها می‌گردد (Ghaly *et al.*, 2010). رهاسازی آنزیم‌های پروتئاز گوارشی مخصوصاً تریپسین از روده و ضمائم پیلوریک به عضلات ناحیه شکمی، مهمترین عاملی است که باعث ایجاد این پدیده می‌شود (Castillo-Yanez *et al.*, 2005). آنزیم تریپسین یکی از مهمترین آنزیمهای گروه پروتئاز سرین بوده که بصورت یک پیش آنزیم توسط سلولهای پانکراس تولید می‌شود و فعالیت آندوپپتیدازی (Endopeptidase) دارد که زنجیره پروتئینی را از سمت گروه کربوکسیل جائیکه اسید آمینه آرژنین و لایزین قرار دارد را شکسته و نقش مهمی در فرآیندهای زیستی مانند هضم مواد غذایی و فعال کردن زیموژنهای (Zymogene) تریپسین و همچنین سایر زیموژن‌های آنزیمهای پانکراتیک دارد (Souza *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011). آنزیم تریپسین یک فاکتور افزایش دهنده هیدرولیز پروتئین است بطوریکه اضافه نمودن عصاره طحال تون هوور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) که حاوی تریپسین است در هیدرولیز پروتئین‌های عضله ساردین برای تولید سس ماهی تاثیر بالایی داشته است (Klomklao *et al*., 2006; Khantaphant & Benjakul, 2008). بنابراین مشاهده می‌شود که آنزیم تریپسین نقش بسیار مهمی در شکست و هیدرولیز پروتئین‌ها ایفا می‌کند (Khantaphant & Bnejakul, 2010; Esposito *et al*, 2009; Ali *et al*, 2009; Ktari *et al*., 2012). بنابراین می‌توان با شناسایی شرایط عملکرد آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی از پدیده هضم دیواره شکمی توسط این آنزیم در هنگام حمل ماهیان صید شده جلوگیری کرد و در نتیجه از فساد میکروبی و کاهش کیفیت آنها جلوگیری نمود. در این تحقیق سعی شده است عوامل بیوشیمیایی مؤثر در فعالیت آنزیم تریپسین شامل دما، pH، یونهای فلزی و بازدارنده‌ها (Inhibitors) بعنوان یکی از آنزیم‌های مهم در پدیده خود هضمی ماهی کیلکای معمولی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

ماهی کیلکای معمولی مورد نیاز در این مطالعه از صیدگاه شهرستان بابلسر در تیر ماه ۱۳۸۹ تهیه گردید. ماهیان بعد از صید در داخل یک ظرف یونولیتی با نسبت ۱ به ۲ با یخ مخلوط گردیده و در فاصله زمانی ۴۵ دقیقه به آزمایشگاه محصولات فرآورده‌های شیلاتی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور منتقل شدند. بعد از انتقال ماهیان به آزمایشگاه، اندام‌های حاوی آنزیم تریپسین شامل ضمائم پیلوریک (حاوی پانکراس) و روده از ۲۰۰ نمونه در حضور یخ جدا شده و بطور جداگانه در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Khantaphant & Benjakul, 2010). وزن متوسط و طول کل ماهیان برتیب ۱/۷۵±۹/۵ گرم و ۰/۶۷±۱۱/۶۴سانتیمتر بودند.

نمونه‌های ضمائم پیلوریک و روده پس از خروج از فریزر برای مدت ۲ ساعت در دمای یخچال (۴ درجه سانتیگراد) قرار گرفتند تا از حالت انجماد خارج شوند. سپس عمل چربی‌زدایی

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.4.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110023]

روی آنها صورت گرفت. برای این منظور نمونه‌ها را تعیین حجم کرده و با استون سرد (۲۰- درجه سانتیگراد) با نسبت ۱ به ۳ مخلوط نموده و برای مدت ۱ دقیقه عمل یکنواخت‌سازی با هموژنایزر (HeidolpH Diax 900, Sigma Co., USA) و یخ انجام شد. سپس نمونه یکنواخت شده بوسیله کاغذ صافی (Whatmangrade No. 2, (Lawrence, USA) فیلتر شده و مواد باقیمانده روی فیلتر چندین مرتبه با استون سرد شسته شدند تا عمل چربی‌زدایی بخوبی انجام شود. سپس مواد روی فیلتر برای مدت یک شبانه‌روز در دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک شوند (El-Beltagy *et al.*, 2005). پودر خشک شده حاصل از نمونه ضمائم پیلوریک و روده با بافر استخراج (۵۰ میلی‌مولار تریس-HCl، pH ۷/۵ حاوی ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ و ۰/۵ مولار NaCl) با نسبت ۱ به ۵۰ ترکیب شده و برای مدت ۳ ساعت در دمای یخچال ۴ درجه سانتیگراد روی همزن مغناطیسی به آرامی مخلوط شدند. سپس مخلوط حاصله برای مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید (Mable program IEC Model B-22M floor centrifuge). سپس محلول رویی (Supernatant) بعنوان عصاره خام آنزیمی برای سنجش فعالیت تریپسین در نظرگرفته شد (Khantaphant & Benjakul, 2010).

برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین از روش Erlanger و همکاران (۱۹۶۲) و از سوبسترای BAPNA (Nα–benzoyl-DL-argenine-ρ-nitroanilide-HCL) استفاده گردید. ابتدا عصاره آنزیمی با سوبسترای BAPNA مخلوط شده و برای ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردید. سپس اسید استیک ۳۰ درصد اضافه و قرائت نوری در ۴۱۰ نانومتر انجام شد.

برای سنجش میزان پروتئین محلول از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده گردید. در این روش از آلبومین سرم گاوی با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بعنوان استاندارد استفاده شد.

برای تعیین دمای بهینه، عصاره آنزیمی بعد از مخلوط شدن با محلول سوبسترا- بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر۵۰ میلی مولار تریس-HCl، pH ۸ حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$) مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵ و ۷۰ درجه سانتیگراد برای مدت ۳۰ دقیقه در حالت انکوباسیون قرار گرفت. در ادامه نمونه حرارت دیده با محلول سوبسترا- بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر۵۰ میلی‌مولار تریس-HCl، pH ۸ حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$) مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در حالت انکوباسیون قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد (Erlanger *et al*, 1961; Khantaphant & Benjakul, 2010). فعالیت نسبی آنزیم تریپسین نیز از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه شاهد محاسبه و بصورت درصد گزارش گردید.

برای تعیین pH بهینه، عصاره آنزیمی بعد از مخلوط شدن با محلول سوبسترا- بافر با pHهای مختلف (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار استات سدیم با pH ۴ تا ۶، بافر ۵۰ میلی مولار تریس با pH ۷ تا ۹ و بافر گلایسین با pH ۱۰ تا ۱۱؛ تمام بافرها حاوی۱۰ میلی مولار $CaCl_2$ بودند) برای ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به حالت انکوباسیون قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد (Erlanger *et al*, 1961; Khantaphant & Benjakul, 2010).

برای تعیین پایداری pH، عصاره آنزیمی بعد از مخلوط شدن با بافرهای مختلف (بافر ۵۰ میلی مولار استات سدیم با pH ۴ تا ۶، بافر ۵۰ میلی مولار تریس با pH ۷ تا ۹ و بافر گلایسین با pH ۱۰ تا ۱۱ حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$) برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به حالت انکوباسیون قرار گرفت. سپس نمونه انکوبه شده با محلول سوبسترا – بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر۵۰ میلی مولار تریس- HCl، pH ۸ حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$) مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد. فعالیت نسبی آنزیم تریپسین نیز از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه شاهد محاسبه و بصورت درصد گزارش گردید (Erlanger *et al*, 1961; Khantaphant & Benjakul, 2010).

اثر یونهای فلزی NaCl، KCl، $CaCl_2$، $MgCl_2$، $CuCl_2$، $Zn(CH3COOH)_2$، $MnCl_2$، $BaCl_2$، $CoCl_2$، $FeSO_4$ و $Al_2(SO_4)_3$ با غلظت‌های ۲ و ۵ میلی مولار بر پایداری آنزیم

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.4.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110023]

تریپسین تعیین شد. برای این منظور، ابتدا عصاره آنزیمی با عناصر فلزی با غلظت‌های مذکور برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس مخلوط حاصل از انکوباسیون با محلول سوبسترا - بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس- HCl، pH ۸ و ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$) مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد (Erlanger *et al*, 1961; Khantaphant & Benjakul, 2010) روش سنجش نمونه شاهد نیز مانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد یون فلزی بود. سپس فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه شاهد محاسبه و بصورت درصد گزارش گردید.

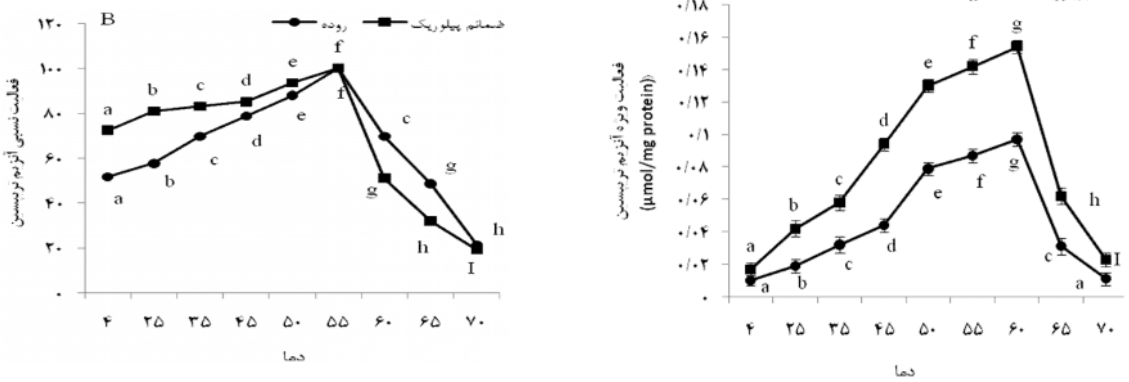
اثر بازدارنده‌های Soybean trypsin inhibitor (SBTI) (۰/۰۵ میلی‌مولار)، phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (۱۰میلی‌مولار)، N-ρ-tosyl-L-lysine-chloromethylketone (TLCK) (۵ میلی‌مولار) و P-Aminobenzamidine (۵ میلی مولار) بر فعالیت آنزیم تریپسین مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، ابتدا عصاره آنزیمی با بازدارنده‌ها برای ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس مخلوط حاصله از انکوباسیون با محلول سوبسترا- بافر (۱میلی مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس-HCl، pH ۸ و ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$) مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد.

روش سنجش نمونه شاهد نیز مانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد بازدارنده بود. سپس فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه شاهد محاسبه و بصورت درصد گزارش گردید (Erlanger *et al*, 1961; Khantaphant & Benjakul, 2010).

برای مقایسه اثر پارامترهای بیوشیمیایی بر فعالیت آنزیم تریپسین روده و ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی و همچنین رسم نمودارها از نرم‌افزارهای SPSS 17 و Excel استفاده گردید. برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده گردید و میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند. تمام ارزیابی‌ها نیز در ۳ تکرار انجام گرفت.

نتایج

اثر دما بر فعالیت آنزیم تریپسین حاصل از روده و ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی در نمودار ۱ نشان داده شده است. ارزیابی دمای بهینه برای فعالیت آنزیم تریپسین در روده و ضمائم پیلوریک مشخص نمود که افزایش دما از ۴ تا ۶۰ درجه سانتیگراد باعث افزایش فعالیت آنزیم تریپسین گردید بطوریکه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به بیشترین میزان خود رسید ($P<0.05$). از دمای ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد یک کاهش شدید در فعالیت آنزیم تریپسین مشاهده گردید (نمودار ۱الف). دمای پایداری آنزیم تریپسین نیز نشان داد که با افزایش دما از ۴ تا ۵۵ درجه سانتیگراد این آنزیم پایداری خود را حفظ نمود ($P< 0.05$) ولی از ۵۵ تا ۷۰ درجه سانتیگراد پایداری خود را از دست داده و تقریبا غیر فعال گردید (نمودار ۱ب).



نمودار ۱: دمای بهینه (A) و دمای پایداری (B) فعالیت آنزیم تریپسین در روده و ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی اختلاف بین دماهایی که دارای حرف مشترک نیستند معنی‌دار می‌باشد (۰/۰۵ = α، ۳ = n، میانگین ±انحراف معیار).

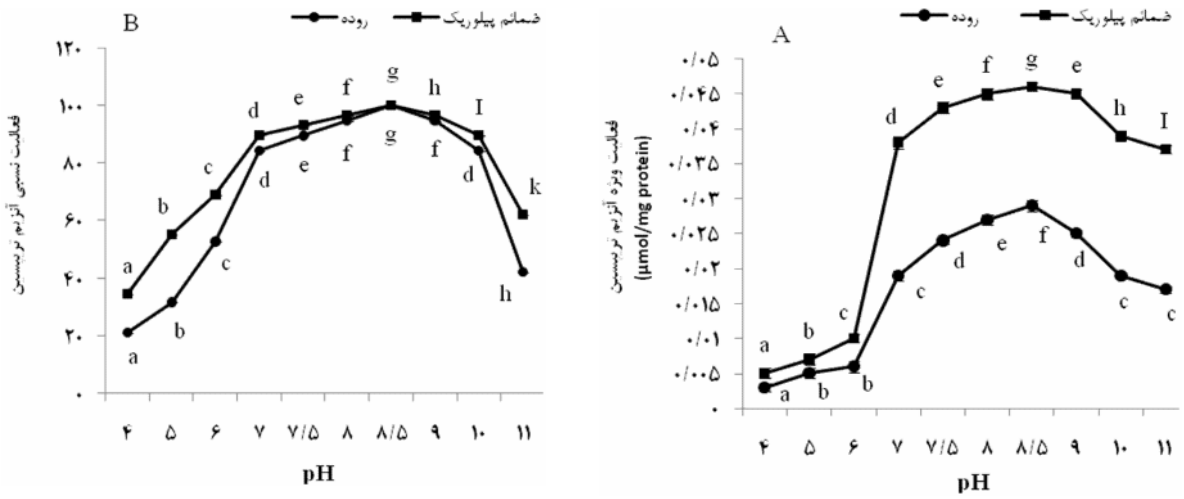
[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.4.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110023]

اثر pH بر فعالیت آنزیم تریپسین حاصل از روده و ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی در نمودار ۲ نشان داده شده است. pH بهینه برای فعالیت آنزیم تریپسین از روده و ضمائم پیلوریک نشان داد که این آنزیم بیشترین فعالیت خود را در pH ۸/۵ داشت ($P<0.05$) و در سایر pHهای بررسی شده فعالیت آنزیم تریپسین کاهش یافت. هر چند که در pHهای ۴، ۵، ۶ و ۱۱ میزان فعالیت آنزیم بسیار کمتر از دیگر pHهای ارزیابی شده بود (نمودار A۲). پایداری pH برای آنزیم تریپسین از روده و ضمائم پیلوریک نیز در نمودار B۲ نشان داده است. نتایج بررسی pH بر پایداری آنزیم تریپسین نشان داد که این آنزیم در pH ۸/۵ بالاترین پایداری را داشت ($P<0.05$) ولی در pHهای پایین (۵- ۴) و pHهای بالا (۱۱) پایداری خود را از دست داد و غیرفعال گردید.

جداول ۱ و ۲ بترتیب اثر یونهای فلزی را بر فعالیت آنزیم تریپسین حاصل از ضمائم پیلوریک و روده ماهی کیلکای معمولی را نشان می دهد. عناصر KCL و NaCl در غلظت‌های ۲ و ۵ میلی‌مولار در مقایسه با گروه شاهد تغییری معنی داری در فعالیت نسبی آنزیم تریپسین در روده و ضمائم پیلوریک ایجاد نکردند ($P>0.05$). عناصر $CaCl_2$، $MgCl_2$ و $MnCl_2$ با افزایش غلظت از ۲ به ۵ میلی‌مولار باعث افزایش فعالیت نسبی آنزیم تریپسین گردیدند بطوریکه $CaCl_2$ افزایش معنی‌داری را در مقایسه با $MgCl_2$ و $MnCl_2$ در فعالیت نسبی آنزیم تریپسین باعث گردید ($P<0.05$). زمانیکه غلظت سایر یونهای فلزی مورد بررسی در این تحقیق از ۲ به ۵ میلی‌مولار افزایش یافت، باعث کاهش فعالیت نسبی آنزیم تریپسین در روده و ضمائم پیلوریک گردید که در بین آنها عناصر $CuCl_2$، $Zn(CH3COOH)_2$ و $Al_2(SO4)_3$ بیشترین تاثیر را در غیرفعال‌سازی آنزیم تریپسین داشتند ولی $Al_2(SO4)_3$ نسبت به سایرین اثر کاهشی معنی‌داری را بر فعالیت آنزیم تریپسین نشان داد ($P<0.05$).

اثر بازدارنده‌های SBTI، PMSF، TLCK و ρ-Aminobenzamidine بر فعالیت آنزیم تریپسین در جدول ۳ آمده است. بررسی‌ها نشان دادند که بازدارنده‌های SBTI و TLCK بطور معنی‌داری باعث غیرفعال شدن کامل آنزیم تریپسین روده در مقایسه با PMSF و ρ-Aminobenzamidine شدند ($P<0.05$).

بازدارنده‌های ρ-Aminobenzamidine وPMSF اثر کمتری در غیرفعال‌سازی آنزیم تریپسین روده داشتند هر چند که ρ-Aminobenzamidine در غیرفعال‌سازی آنزیم تریپسین اختلاف معنی‌داری را با PMSF نشان داد ($P<0.05$). در ضمائم پیلوریک، TLCK و SBTI اثر بالایی در غیرفعال شدن آنزیم تریپسین داشتند ولی ρ-Aminobenzamidine و PMSF اثر کمتری را از خود نشان دادند. اثر TLCK در غیرفعال‌سازی آنزیم تریپسین بطور معنی‌داری بیشتر از سایر بازدارنده ها بود ($P<0.05$).



نمودار۲: pH بهینه (A) و پایداری pH (B) فعالیت آنزیم تریپسین در روده و ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی
اختلاف بین pHهایی که دارای حرف مشترک نیستند معنی‌دار می‌باشد (α = ۰/۰۵، n = ۳، میانگین ±انحراف معیار)

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.4.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110023]

جدول ۱: اثر برخی عناصر فلزی بر فعالیت نسبی آنزیم تریپسین (درصد) از ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی

عناصر فلزی	غلظت (میلی‌مولار)	فعالیت نسبی آنزیم تریپسین در ضمائم پیلوریک (درصد)	عناصر فلزی	غلظت (میلی‌مولار)	فعالیت نسبی آنزیم تریپسین در ضمائم پیلوریک (درصد)
شاهد	-	۱۰۰ ^{a}	$Zn (CH3COOH)_2$	۲	۸۵ /۷±۱/۷ ^{f}
KCL	۲	۱۰۰±۱/۱ ^{a}		۵	۷۰±۱/٤ ^{e}
	۵	۱۰۰±۱/۵ ^{a}	MnCl2	۲	۸۵/۷±۱/۵ ^{f}
NaCl	۲	۱۰۰±۱/۳ ^{a}		۵	۹۰±۱/۸ ^{g}
	۵	۱۰۰±۱/٤ ^{a}	$BaCl_2$	۲	۱۰۰±۱/۵ ^{a}
CaCl2	۲	۱۰۰±۱/٦ ^{a}		۵	۸۰±۱/٦ ^{h}
	۵	۱۲۰±۲/۵ ^{b}	$CoCl_2$	۲	۸۵/۷±۱/۹ ^{f}
MgCl2	۲	۹۸/۵±۱/۱ ^{c}		۵	۸۰±۱/۳ ^{h}
	۵	۱۱۰±۱/٦ ^{d}	$FeSO_4$	۲	۱۰۰±۱/٦ ^{a}
CuCl2	۲	۱۰۰±۱/۱ ^{a}		۵	۹۰±۲/۵ ^{g}
	۵	۷۰±۱/۳ ^{e}	$Al_2(SO4)_3$	۲	۸۵/۷±۱/۹ ^{f}
				۵	۷۵±۱/۷ ^{I}

*اختلاف بین آندسته از عناصری که دارای حرف مشترک نیستند معنی‌دار می‌باشد (۰/۰۵ = α، ۳ = n، میانگین ±انحراف معیار)

جدول۲: اثر برخی عناصر فلزی بر فعالیت نسبی آنزیم تریپسین (درصد) از روده ماهی کیلکای معمولی

عناصر فلزی	غلظت (میلی‌مولار)	فعالیت نسبی آنزیم تریپسین در روده (درصد)	عناصر فلزی	غلظت (میلی‌مولار)	فعالیت نسبی آنزیم تریپسین در روده (درصد)
شاهد	-	۱۰۰ ^{a}	Zn $(CH3COOH)_2$	۲	۷۲/۵±۱/۹ ^{h}
KCL	۲	۱۰۰±۱/٤ ^{a}		۵	۵۳/۳±۲/۳ ^{g}
	۵	۱۰۰±۱/۱ ^{a}	MnCl2	۲	۷۵±۱/٦ ^{I}
NaCl	۲	۱۰۰±۱/۸ ^{a}		۵	۸۳/۳±۱/٤ ^{k}
	۵	۱۰۰±۱/۲ ^{a}	$BaCl_2$	۲	۹۵±۲/۱ ^{a}
CaCl2	۲	۱۰۷/۵±۲/۱ ^{b}		۵	٦٦/٦±۱/۷ ^{m}
	۵	۱۲۰±۱/۸ ^{c}	$CoCl_2$	۲	۷۲/۵±۱/۱ ^{h}
MgCl2	۲	۱۰۵±۱/٦ ^{d}		۵	٦٦/٦±۱/۵ ^{m}
	۵	۱۱٦/٦±۱/٦ ^{e}	$FeSO_4$	۲	۹۲/۵±۱/۱ ^{n}
CuCl2	۲	۸۷/۵±۲/۱ ^{f}		۵	۸۳/۳±۲/۱ ^{k}
	۵	۵۳/۳±۱/۲ ^{g}	$Al_2(SO4)_3$	۲	۷۵±۱/٦ ^{I}
				۵	۵۵±۱/۳ ^{p}

*اختلاف بین بازدارنده‌هایی که دارای حرف مشترک نیستند معنی‌دار می‌باشد (۰/۰۵ = α، ۳ = n، **±انحراف معیار**)

جدول۳: فعالیت باقیمانده آنزیم تریپسین روده و ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی بعد از انکوباسیون با بازدارنده‌ها

انواع بازدارنده	فعالیت باقیمانده آنزیم تریپسین ضمائم پیلوریک (درصد)	فعالیت باقیمانده آنزیم تریپسین روده (درصد)
شاهد	۱۰۰ ^{f}	۱۰۰ ^{f}
PMSF	٦٤/۱±۰/٤۰ ^{a}	٦٤/۸±۰/۳۰ ^{a}
SBTI	۸/٤±۰/۳٦ ^{b}	۰ ^{b}
TLCK	٤/۲±۰/۲۸ ^{c}	۰ ^{b}
ρ-Aminobenzamidine	۵٦/۸±۰/۲٦ ^{d}	۵۰/۳±۰/۲۵ ^{c}

*اختلاف بین آندسته از عناصری که دارای حرف مشترک نیستند معنی‌دار می‌باشد (۰/۰۵ = α، ۳ = n، میانگین **±انحراف معیار**)

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.4.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110023]

بحث

فرآیند فساد در ماهیان معمولا تحت تاثیر ۳ پدیده خود هضمی آنزیمی، اکسیداسیون و رشد میکروبی قرار دارد. در ماهیان فساد در نتیجه خود هضمی آنزیمی در مدت زمان کوتاهی بعد از صید آغاز شده و منجر به تخریب مولکولهای بدن و ایجاد تغییرات شیمیایی و بیولوژیک در ماهیان می‌شود که می تواند طعم، مزه و کیفیت بافت عضله را کاهش دهد و حتی زمینه را برای فساد میکروبی و اکسیداسیونی فراهم نماید (FAO, 2005). در نتیجه این تغییرات، کیفیت ماهی و فرآورده‌های حاصل از آنها و در نتیجه مدت ماندگاری آنها کاهش می‌یابد. کنترل و کاهش فعالیت پروتئازهای گوارشی مخصوصاً آنزیم تریپسین می‌تواند مانعی برای بروز این تغییرات باشد (Berkel *et al*., 2004; Adebowale *et al*., 2008). بررسی عوامل موثر در فعالیت آنزیم تریپسین روده و ضمائم پیلوریک در ماهی کیلکای معمولی نشان داد که می توان با شناسایی و کنترل آنها تا حدود زیادی از بروز پدیده هضم دیواره شکمی جلوگیری کرد.

بررسی فاکتور دمای بهینه و پایداری دمایی آنزیم تریپسین در روده و ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی نشان داد که به ترتیب در دماهای ۶۰ و ۵۵ درجه سانتیگراد بالاترین فعالیت را دارد و این شرایط دمایی می‌تواند بیشترین تاثیر را در فرایند هضم دیواره شکمی توسط این آنزیم داشته باشد. لذا استفاده از شرایط دمایی پایین نزدیک به صفر درجه یا حتی انجماد می‌تواند در جلوگیری از بروز این پدیده موثر باشد. بررسی روی آنزیم تریپسین در ماهی آنچوی *Engraulis japonica* (Kishimura *et al*., 2005) و ساردین *Sardinops sagax caerulea* (Castillo-Yanez *et al*., 2005) و ماهی تون *Katsuwonus pelamis* (Klomklao *et al*., 2009) نشان داد که آنزیم تریپسین در این ماهیان در دماهای بالا بیشترین فعالیت را دارد و در دماهای پایین از فعالیت آن به مقدار زیادی کاسته می شود.

فاکتور pH بهینه و پایداری pH نیز نشان داد که آنزیم تریپسین روده و ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی در pH ۸/۵ دارای بیشترین فعالیت بوده و در سایر pHها بخصوص pH ۴ تا ۵ دارای کمترین فعالیت می‌باشد. این نتایج در ماهیان آنچوی *Engraulis japonica* ، ساردین *Sardinops sagax caerulea* و تون *Katsuwonus pelamis* و سرخو *Lutjanus vita* (Khantaphant & Benjakul, 2010) نیز گزارش گردیده بود. بنابراین pH پایین می‌تواند در کاهش فعالیت آنزیم و حتی غیرفعال‌سازی آن نقش داشته باشد. اضافه نمودن برخی اسیدها مانند اسید لاکتیک، اسید استیک یا اسید پروپیونیک در محیط ماهیان صید شده جهت پایین آوردن pH می‌تواند در کنترل هضم دیواره شکمی موثر باشد (Ghaly *et al*., 2010).

عناصر فلزی مورد بررسی نیز نشان دادند که در غلظتهای ۲ و ۵ میلی‌مولار در افزایش و کاهش فعالیت آنزیم تریپسین نقش دارند. عناصر KCL و NaCl تاثیری در فعالیت آنزیم نداشتند. این نتایج در ماهیان *Siniperca chuatsi* (Lu *et al*., 2008)، *Lithognathus mormyrus* (Ali *et al*., 2009) و *Salaria basilisca* (Ktari *et al*., 2012)گزارش گردید. عناصر $CaCl_2$، $MgCl_2$ و $MnCl_2$ نیز باعث افزایش فعالیت آنزیم تریپسین گردیدند. Ktari و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که استفاده از $CaCl_2$ و $MnCl_2$ در غلظت ۵ میلی مولار باعث افزایش فعالیت آنزیم تریپسین در ماهی *Salaria basilisca* گردید. Lu و همکاران (۲۰۰۸) نیز نشان دادند که $CaCl_2$ و $MgCl_2$ در غلظت ۵ میلی مولار در افزایش فعالیت آنزیم تریپسین در ماهی *Siniperca chuatsi* نقش دارند. عناصر $CuCl_2$، Zn $(CH3COOH)_2$ و $Al_2(SO4)_3$ باعث کاهش فعالیت آنزیم تریپسین از روده و ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی گردیدند. این نتایج توسط Lu و همکاران (۲۰۰۸) در ماهی *Siniperca chuatsi* نیز بدست آمد و عناصر مذکور باعث کاهش فعالیت آنزیم تریپسین گردیدند. Wang و همکاران (۲۰۱۰) در هیبرید تیلاپیا (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) و Ktari و همکاران (۲۰۱۲) در ماهی *Salaria basilisca* نیز گزارش نمودند که عناصر Cu^{2+}، Zn^{2+} و Al^{3+} فعالیت آنزیم تریپسین را کاهش می‌دهند. برخی محققین نیز استفاده از محلول کلرید سدیم ۱۰ درصد (Sen, 2005) و ۲۵ درصد (Siringan *et al*., 2006) را در کنترل پدیده هضم دیواره شکمی در میگو و *Stolephorus indicus* موثر می‌دانند. البته استفاده از آب دریا برای حمل ماهیان Refrigerated Sea Water (RCF) بدلیل داشتن عناصر فلزی متعدد می‌تواند موثر باشد ولی حضور برخی فلزات اثر افزایشی بر فعالیت آنزیم تریپسین دارد که باید به این نکته توجه نمود.

ترکیبات PMSF، SBTI، TLCK و ρ-aminobenzamidine بعنوان بازدارنده‌های اختصاصی آنزیم تریپسین محسوب می‌شوند ولی در گونه‌های مختلف اثر بازدارندگی متفاوتی دارند که می‌تواند با محیط زندگی و مسائل ژنتیکی ماهیان در ارتباط باشد (Garcia Carenno, 1992; Lu *et al*., 2008). اثر بازدارنده های PMSF، SBTI، TLCK و ρ-aminobenzamidine بر

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.4.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110023]

فعالیت آنزیم تریپسین در روده و ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی نشان داد که این بازدارنده‌ها می‌توانند از فعالیت آنزیم تریپسین جلوگیری نمایند. چنین نتایجی در سایر ماهیان مانند *Balistes capriscus*، *Salaria basilisca*، *Siniperca chuatsi* (Jellouli *et al.*, 2009) و *Diapterus rhombeus* (Silva *et al.*, 2011) نیز گزارش گردید. در بین این بازدارنده‌ها، SBTI و TLCK دارای اثر بازدارندگی بالایی بودند. استخراج نسبی یا تخلیص کامل بازدارنده‌های تریپسین بویژه از منابع گیاهی مانند سویا (SBTI)، لوبیا و برخی دانه بقولات (Legume seeds) و استفاده از آنها در جلوگیری از فعالیت آنزیم تریپسین می‌تواند موثر باشد زیرا از منابع گیاهی تهیه شده و اثر سوء در ماهیان تحت تیمار ایجاد نمی‌کنند (Benjakul *et al.*, 2000; Klomklao *et al.*, 2011).

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان بیان نمود که استفاده از دمای پائین (۴ درجه سانتیگراد)، pH اسیدی، برخی عناصر فلزی و بازدارنده‌هایی مانند SBTI ودیگر بازدارنده‌های بدست آمده از منابع گیاهی می‌توانند در کنترل پدیده خود هضمی در کیلکای معمولی دریای خزر موثر باشد و از فساد آنزیمی و در نتیجه فساد میکروبی و اکسیداسیون جلوگیری نمود.

منابع

رضایی، م.؛ سحری، م.ع. و معینی، س.، ۱۳۸۵. ارزیابی کیفی چربی ماهی کیلکای آنچوی طی نگهداری و انجماد در دماهای مختلف. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال دهم، شماره چهارم (ب)، صفحات ۴۳۵ تا ۴۴۴.

سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۸۹. ۶۰ صفحه.

Adebowale B.A., Dongo L.N., Jayeola C.O. and Orisajo S.B., 2008. Comparative quality assessment of fish (*Clarias gariepnius*) smoked with cocoa pod husk and three other different smoking materials. Journal of Food Technology, 6(1):5-8.

Ali N.E., Hmidet N., Bougatef A., Nasri R. and Nasri M., 2009. A Laundry Detergent-Stable alkaline Trypsin from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: Purification and Characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57:10943–10950.

Benjakul S., Visessanguan W. and ThumMaratwasik P., 2000. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some thai legume seeds. Journal of Food Biochemistry, 24:107-127.

Berkel B.M., Boogaard B.V. and Heijnen C., 2004. Preservation of Fish and Meat. Agromisa Foundation, Wageningen, The Netherlands, pp.78-80.

Castillo-Yanez, F.J., Pacheco-Aguilar R., Garcia-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.

El-Beltagy A.E., El-Adawy T.A., Rahma E.H. and El-Bedawey A.A., 2005. Purification and characterization of an alkaline protease from the viscera of bolti fish (*Tilapia nilotica*). Journal of Food Biochemistry, 29: 445–458.

Erlanger B.F., Kokowski N. and Cohen W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archive Biochemistry and Biophysics, 95:271–278.

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.

FAO, 2005. Post-harvest changes in fish. *In*: FAO - Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

Garcia-Carenno F.L., 1992. Protease inhibition in theory and practice. Biotechnology education, 3(4):145-150.

Ghaly A.E., Dave D., Budge S. and Brooks M.S., 2010. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: Review. American Journal of Applied Sciences, 7(7):859-877.

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

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.4.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110023]

temperature: Purification and Characterization. Food Chemistry, 116:644–650.

Karimzadeh G., Gabrielyan B. and Fazli H., 2010. Population dynamics and biological characteristics of kilka species (Pisces: Clupeidae) in the southeastern coast of the Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 9(3):422-433.

Khantaphant S. and Benjakul S., 2008. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. Comparative Biochemistry and Physiology, 151B:410–419.

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.

Kishimura H., Hayashi K., Miyashita Y. and Nonami Y., 2005. Characteristics of two trypsin isozymes from the viscera of Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). Journal of Food Biochemistry, 29:459–469.

Klomklao S, Benjakul S., Kishimura H. and Chaijan, M., 2011. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). Food Chemistry, 129:1348–1354.

Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. And Simpson B.K., 2006. Effects of the addition of spleen of Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) on the liquefaction and characteristics of fish sauce made from sardine (*Sardinella gibbosa*). Food Chemistry, 98:440-452.

Klomklao S., Kishimura H., Nonami Y. and Benjakul S., 2009. Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Food Chemistry, 115:155–162.

Ktari N., Ben Khaled H., Nasri R., Jellouli K, Ghorbel S. and Nasri M., 2012. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, haracterisation and potential application as a detergent additive. Food Chemistry,130:467–474.

Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L. and Randall R. J., 1951. Protein measurement with the folin pH enol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193:265–275.

Lu B.J., Zhou L.G., Cai Q.F., Hara K., Maeda A., Su W.J. and Cao M.J., 2008. Purification and characterization of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). Food Chemistry, 110:352–360.

Sen D.P., 2005. Advances in Fish Processing Technology. Allied Publisher Private Limited, Mumbai, India. 448P.

Silva J.F., Esposito T.S., Marcuschi M., Ribeiro K., Cavalli R.O., Oliveira V. and Bezerra R.S., 2011. Purification and partial characterization of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). Food Chemistry, 129:777–782.

Siringan P., Raksakulthai N. and Yongsawatdigul J., 2006. Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stoleph orus indicus*). Food Chemistry. 98:678–684.

Souza A.A.G., Amaral I.P.G., Santo A.R.E., Carvalho L.B., Jr. Bezerra, R.S., 2007. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). Food Chemistry, 100:1429–1434.

Wang Q., Gao Z.X., Zhang N., Shi Y., Xie X.L. and Chen Q.X., 2010. Purification and characterization of trypsin from the intestine of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58:655–659.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.4.6.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110023]

In-vitro effects of biochemical factors on trypsin activity from intestine and pyloric caeca of common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) for inhibition of belly bursting

Zamani A.[(1)]; Rezaei M.*[(2)] and Madani R.[(3)]

rezai_ma@modares.ac.ir

1,2- Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, P.O.BOX: 64414-356 Noor, Iran

3- Razi Vaccine and Serum Research Institute, P.O.BOX: 11365-1558 Karaj, Iran

Received: October 2011 Accepted: February 2012

Keywords: Feeding, Digestion system, Ventral keel, Inhibitor components

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1390.20.4.6.7]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110023]

Abstract

The *in-vitro* effects of biochemical factors on trypsin activity from intestine and pyloric caeca of common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) was evaluated. Trypsin is known to cause belly bursting in common kilka. The assessments showed that in a range of 4-70°C, trypsin from pyloric caeca and intestine of common kilka had the maximum activity and the satiability at 60 and 55°C, respectively. The pH assessments indicated that maximum activity and stability for trypsin were at 8.5 at pH range of 4-11. The effects of metal ions on trypsin activity revealed that $CaCl_2$, $MgCl_2$ and $MnCl_2$ increased trypsin activity while $CuCl_2$ ،$ZnCl_2$ and $Al_2(SO4)_3$ decreased its activity. The effect of inhibitors on trypsin activity also showed that SBTI and TLCK (specific inhibitors for trypsin) significantly inhibited trypsin activity. This study suggests that belly bursting in common kilka can be prevented by trypsin inactivation through application of low temperature (4°C), acidic pH, metals of $CuCl_2$, $ZnCl_2$ and $Al_2(SO4)_3$ and inhibitors of SBTI and TLCK.

*Corresponding author