تغـذیه و بیـوشیمی آبزیـان
سال اول، شماره اول،
تابستان ۱۳۹۳

استخراج آنزیم لیپاز از روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و بررسی اثر بازدارنده‌ها و فلزات بر فعالیت آن

نرگس انوشه[۱]، سید ولی حسینی[۱]، رسول مدنی*[۲]، عباس زمانی[۳]
۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۲- بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج
۳- گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه ملایر، ملایر

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱۵

چکیده
آبزیان از جمله منابع مهم جهت استخراج ترکیبات با ارزشی مانند آنزیم می‌باشند. در این پـژوهش آنـزیم لیپـاز از روده مـاهی قزل‌آلای رنگین کمان استخراج شد و مورد بررسی قرار گرفت. جهت استخراج این آنزیم، چربی‌زدایی چندین بار با استون انجام شد سپس برای رهاسازی آنزیم از آمونیوم سولفات (با اشباعیت ۶۰ درصد) استفاده گردیـد و پـس از آن جهـت تغلـیظ نمونـه، اولترافیلتراسیون انجام گرفت. تخلیص نهایی آنزیم نیز با عبور نمونه از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس جـی-۷۵ انجام شد. پس از استخراج، اثر دو بازدارنده فنیل متیل سولفونیل فلوراید و اتیلن دیامین تترا استیک اسید بر فعالیت لیپاز مورد بررسی قرار گرفت. سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از سوبسترای پارانیتروفنیل پالمیتات انجام شد. نتایج نشـان داد کـه فنیـل متیل سولفونیل فلوراید و اتیلن دیامین تترا استیک اسید اثر بازدارندگی معنی‌داری بر فعالیت آنزیم لیپاز تخلـیص شـده دارنـد ($P<۰/۰۵$) یون‌های $CaCl_2$، $MgCl_2$ و $MnCl_2$ بطـور معنـی‌داری فعالیـت آنـزیـم لیپـاز را افـزایش ($P<۰/۰۵$) و KCl و NaCl نیز به طور معنی داری فعالیت را کاهش دادند ($P<۰/۰۵$). بنـابراین در مـورد اسـتفاده از لیپـاز روده قـزل‌آلای رنگـین کمان به عنوان افزودنی در صنایع مرتبط، از این بازدارنده‌ها و فلزات می‌توان جهت بازداشتن یا افزایش فعالیـت آنـزیم اسـتفاده کرد.

کلمات کلیدی: اثر بازدارندگی، فعالیت آنزیم، لیپاز، فلزات، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

* نویسنده مسئول: mr_madani@yahoo.com

مقدمه

امروزه آنزیم لیپاز جایگاه مهمی در بین بیوکاتالیست‌ها دارد. قابلیت آبکافت تری گلیسریدها به این آنزیم‌ها این امکان را داده است که در طیف وسیعی از سوبسترا مورد استفاده قرار گیرند. سوبسترای اصلی این آنزیم، تری اسیل و گلیسرول‌های کم محلول در آب است. تحت شرایط طبیعی آن‌ها پیوندهای استری بین فاز سوبسترای غیرمحلول و فاز مایع را آبکافت می‌کنند. در غیاب آب، واکنش منجر به استریفیکاسیون و تشکیل گلیسریدها از اسیدهای چرب و گلیسرول می‌شود (Jaeger and Eggert, 2002) آنزیم لیپاز بطور وسیعی در طبیعت وجود دارد و در اغلب گونه‌های حیوانی، گیاهی، باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها یافت می‌شود. لیپازها کاربردهای گسترده‌ای دارند و تری‌گلیسریدها را به اسیدهای چرب و گلیسرول‌ها آبکافت می‌کنند (Litthauer et al. 2010). لیپازها بطور گسترده‌ای در فرآوری چربی‌ها و روغن‌ها، شوینده‌ها، فرآوری غذا، ساخت مواد دارویی و شیمیایی، ساخت کاغذ و تولید مواد آرایشی کاربرد دارند (Rubin and Dennis, 1997a, b; Kazlauskas and Bornscheuer, 1998). این آنزیم می‌تواند تجزیه فاضلاب حاوی چربی را تسریع بخشد (Masse et al. 2001). بسیاری از لیپازهای میکروبیِ صنعتی از قارچ‌ها و باکتری‌ها مشتق می‌شوند.

با توجه به شرایط محیطی مختلف آبزیان و سازگاری آن‌ها با محیط اطراف خود، همچنین وجود تنوع گونه‌ای و به دنبال آن وجود تنوع ژنتیکی، شرایط منحصر به فردی برای آنزیم‌های موجود در آبزیان در مقایسه با پستانداران و گیاهان فراهم شده است که از این میان می‌توان به داشتن فعالیت بالا در دما و pH های مختلف اشاره نمود (Klomklao, 2008). در مقایسه با دیگر آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند پروتئازها و کربوهیدرازها، لیپازها به نسبت کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و در این رابطه لیپازهای موجودات آبزی نسبت به لیپازهای مشابه در پستانداران، گیاهان و منابع میکروبی کمتر شناخته شده‌اند و تحقیقات کمتری نیز روی آن‌ها صورت گرفته است. ضایعات ماهی مانند سر، امعاء و احشاء، پوست، فلس‌ها و به ویژه اندام‌های گوارشی همراه با غده‌ها منابعی با پتانسیل قوی برای آنزیم‌هایی مانند لیپاز و مواد بیوشیمیایی متعدد می‌باشند. زوائد پیلوریک، معده، پانکراس و روده به عنوان اندام‌های گوارشی در ماهی، منابع آنزیم‌های لیپولیتیک ناشناخته هستند که می‌توانند ویژگی‌های بی‌نظیری داشته باشند. اگرچه مطالعاتی که روی تخلیص لیپازها از بافت ماهی معطوف شده‌اند، محدودیت‌های زیادی را آشکار می‌کنند (Kurtovic et al. 2009) با توجه به مطالب گفته شده، به نظر می‌رسد که مطالعات اخیر بر لیپازهای گوارشی موجودات آبزی متمرکز شده‌اند. اخیرا حضور فعالیت لیپاز در *Scophthalmus maximus* (Izquierdo and Henderson, 1998)، *Pagrus major* (Iijima et al. 1998) *Mugil cephalus* (Aryee et al. 2007)، *Cirrhinus reba* (Islam et al. 2009)، *Sardinops sagax caerulea* (Noriega-Rodriguez et al. 2009)، *Sardinella aurita* (Smichi et al. 2010)، *Oncorhynchus tshawytscha* و *Macruronus novaezelandiae* (Kurtovic et al. 2010) و *Penaeus vannamei* (Rivera-Perez et al. 2010) بررسی شده است.

ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در کشور ما به فراوانی تولید می‌شود و سالانه حجم زیادی از ضایعات این آبزی دور ریخته می‌شود و باعث آلودگی می‌گردد. جداسازی ترکیبات زیست فعالی مانند آنزیم از این ضایعات تا حد زیادی از آلودگی و تخریب محیط زیست جلوگیری می‌کند، همچنین این ترکیبات در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی کاربرد بسیاری دارد. هدف از انجام این تحقیق تخلیص آنزیم لیپاز از روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و بررسی اثر بازدارنده‌ها و فلزات بر فعالیت این آنزیم است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه

پانزده عدد ماهی قزل‌آلای زنده در وزن بازاری (میانگین وزن ۵۰ ± ۹۰۰ گرم) به صورت تصادفی انتخاب و به آزمایشگاه بیوشیمی بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج منتقل شد. روده ماهیان در حضور یخ جداسازی شد. نمونه‌های جداسازی شده، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تا زمان

انجام آزمایش نگهداری شدند (Aryee et al. 2007). نمونه‌ها بعد از خروج از فریزر به مدت ۲ ساعت در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد تا از حالت انجماد خارج شود. سپس عمل چربی‌زدایی نمونه با استفاده از استون سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) به نسبت ۱ به ۳ انجام شد. نمونه چربی‌زدایی شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ (Lawrence, Kansas, USA) فیلتر شد. سپس مواد روی فیلتر به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک گردد (Aryee et al. 2007). پودر خشک شده به نسبت ۱ به ۱۰ با بافر استخراج (۲۵ میلی‌مولار تریس-اسیدکلریدریک با pH ۷/۸ شامل ۵ میلی‌مولار بنزامیدین-اسیدکلریدریک، ۱ میلی‌مولار اتیلن دیامین تترا استیک اسید و ۱۰ درصد گلیسرول) مخلوط و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. بعد از آن، در ۸۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ (IEC Model B-22M program Mable floor centrifuge) انجام شد. سپس محلول رویی به‌عنوان عصاره خام آنزیمی در نظر گرفته شد.

عصاره خام آنزیمی تا حصول اشباعیت ۶۰ درصد با آمونیوم سولفات (Sigma, St. Louis, MO, USA) مخلوط و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سپس در ۸۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ انجام شد. پس از آن، رسوب حاصل جمع‌آوری و با بافر استخراج مخلوط شد و به مدت یک شب در مجاور بافر استخراج در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، عمل دیالیز درون کیسه‌های دیالیز (12 KD, Sigma, St. Louis, MO, USA) بر روی همزن مغناطیسی انجام شد تا یون‌های سولفات آمونیوم حذف شود. بعد از آن، در ۸۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ انجام شد. پس از آن اولترافیلتراسیون (30 kDa MWCO, Am icon Co. Ltd., Bedford, MA, USA) انجام گرفت تا نمونه تغلیظ گردد (Aryee et al. 2007). ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون جی- ۷۵ (Sigma, St. Louis, MO, USA) برای تخلیص آماده‌سازی و با بافر (۵۰ میلی‌مولار تریس-اسید کلریدریک با pH ۸/۵) شستشو گردید. نمونه تغلیظ شده حاصل از اولترافیلتراسیون درون ستون ریخته شد و با استفاده از بافر (۵۰ میلی‌مولار تریس-اسید کلریدریک با pH ۸/۵) مواد درون ستون شستشو شد تا آنزیم مورد نظر جداسازی و از ستون خارج شود (Islam et al. 2008).

سنجش فعالیت آنزیم

جهت سنجش فعالیت آنزیم، محلول سوبسترا به این ترتیب ساخته شد که ۱/۶۵ میلی‌مولار سوبسترای پارانیتروفنیل پالمیتات (Sigma, St. Louis, MO, USA) در ایزوپروپانول حل شد. یک میلی‌لیتر از محلول سوبسترا به ۹ میلی‌لیتر از بافر (۵۰ میلی‌مولار تریس-اسیدکلریدریک با pH ۸ شامل ۰/۴ درصد توئین و ۰/۱ درصد صمغ عربی) اضافه شد و سپس این محلول با نمونه آنزیمی مخلوط شد (Kordel et al. 1991). پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر انجام و سپس فعالیت آنزیم بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز (واحد در میلی‌گرم پروتئین)} = \frac{\text{حجم مخلوط واکنش (میلی لیتر)} \times ۱۰۰۰ \times \text{میزان جذب در ۴۱۰ نانومتر}}{\text{میزان پروتئین (میلی گرم در میلی لیتر)} \times \text{زمان واکنش (دقیقه)} \times ۱۷۵۰۰}$$

در این فرمول ۱۷۵۰۰ بیانگر ضریب تاریکی برای پارا-نیتروفنیل می‌باشد که محصول هیدرولیز سوبسترای نیتروفنیل پالمیتات توسط آنزیم لیپاز است. از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) برای سنجش پروتئین محلول استفاده شد.

اثر بازدارنده‌ها

برای تعیین اثر بازدارنده‌ها، ابتدا بازدارنده‌های فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) با غلظت ۲میلی‌مولار و

اتیلن دیامین تترا استیک اسید (EDTA) با غلظت ۵ میلی‌مولار با نمونه آنزیمی مخلوط و برای ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت، سپس نمونه حاوی بازدارنده با محلول سوبسترا- بافر مخلوط و برای ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. میزان بازدارندگی از طریق فرمول زیر محاسبه شد (Aryee et al. 2007):

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در نمونه حاوی بازدارنده}}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در نمونه شاهد}}$$

اثر یون‌های فلزی

برای بررسی اثر یون‌های فلزی ابتدا یون‌های NaCl، KCl، $CaCl_2$، $MgCl_2$ و $MnCl_2$ در غلظت ۵ میلی‌مولار با نمونه آنزیمی برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت پس از آن، نمونه آنزیمی انکوبه شده، با محلول سوبسترا- بافر مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد (Aryee et al. 2007). فعالیت نسبی از طریق شد فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{فعالیت نسبی (٪)} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در نمونه حاوی یون فلزی}}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در نمونه شاهد}} \times ۱۰۰$$

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 17 انجام شد. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و برای بررسی همگنی از آزمون Levene استفاده شد. جهت مقایسه تیمارهای مختلف از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن (در سطح ۵٪) استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel 2007 استفاده گردید.

نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده، بازدارنده‌های فنیل متیل سولفونیل فلوراید و اتیلن دیامین تترا استیک اسید به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم لیپاز تخلیص شده را کاهش دادند ($P<۰/۰۵$). نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارندگی این بازدارنده‌ها بر فعالیت نسبی آنزیم لیپاز روده قزل‌آلای رنگین کمان در جدول ۱ و میزان فعالیت و پروتئین آنزیم در مراحل مختلف تخلیص در جدول ۲ نشان داده شده است. یون‌های فلزی $CaCl_2$، $MgCl_2$ و $MnCl_2$ به طور معنی داری باعث افزایش فعالیت آنزیم شدند ($P<۰/۰۵$) ولی یون‌های KCl و NaCl اثر کاهشی معنی‌داری را نشان دادند ($P<۰/۰۵$). اثر یون‌های فلزی بر فعالیت نسبی آنزیم لیپاز از روده قزل‌آلای رنگین کمان در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱- اثر بازدارندگی (٪) بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم لیپاز از روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان.

بازدارنده	درصد بازدارندگی (± انحراف معیار)
شاهد	۱۰۰ ± ۰/۰[a]
PMSF	۵۴/۷ ± ۱/۱[b]
EDTA	۵۳/۳ ± ۰/۹[b]

حروف کوچک لاتین نشانگر اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد. معنی داری در سطح ۵٪ گزارش شده است.

جدول ۲- میزان و فعالیت پروتئین و آنزیم لیپاز از روده قزل‌آلای رنگین کمان.

مرحله تخلیص	پروتئین (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	فعالیت آنزیم (واحد در میلی‌لیتر)
عصاره خام	۱۳/۵	۲۸/۷
اولترافیلتراسیون	۲/۱۱	۱/۶۸
ژل فیلتراسیون	۰/۵۳	۶/۱۷

جدول ۳- اثر یون‌های فلزی بر فعالیت نسبی آنزیم لیپاز (٪) از ماهی قزل‌آلای رنگین کمان.

یون فلزی	فعالیت نسبی
شاهد	۱۰۰ ± ۰/۰[d]
KCL	۹۳/۴ ± ۱/۱[e]
NaCl	۸۱/۵ ± ۰/۹[f]
$CaCl_2$	۱۱۰± ۱/۲[c]
$MgCl_2$	۱۱۴ ± ۱/۱[b]
$MnCl_2$	۱۷۸ ± ۱/۳[a]

حروف کوچک لاتین نشانگر اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد. معنی داری در سطح ۵٪ گزارش شده است.

بحث

در این پژوهش آنزیم لیپاز از روده قزل‌آلای رنگین کمان تخلیص و اثر دو بازدارنده فنیل متیل سولفونیل فلوراید و اتیلن دیامین تترا استیک اسید بر فعالیت آنزیم لیپاز استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت که هر دو بازدارنده فعالیت آنزیم را کاهش داد. استفاده از benzamidine-HCl در بافر استخراج، به این دلیل است که این ماده بازدارنده پروتئازها است و فعالیت پروتئولیتیکی را در طول تخلیص به حداقل می‌رساند. عمل دیالیز قبل از انتقال نمونه به ستون کروماتوگرافی، جهت حذف پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلودالتون که ممکن است با تشکیل باند با آنزیم مورد نظر درگیر شوند، انجام شد (Kurtovic et al. 2010). سولفات آمونیوم تا حدی ساختار آنزیم را تغییر داده و موجب کاهش بازده و میزان تخلیص می‌شود، که با انجام ستون گذاری این مشکل تا حد زیادی حل می‌شود. PMSF بر فعالیت آنزیم لیپاز تخلیص شده از ماهیان آزاد چینوک *Oncorhynchus tshawytscha* و New Zealand Hoki (*Macruronus novaezelandiae*) نیز اثر کاهشی داشته است (Kurtovic et al. 2010). در تحقیقی که توسط Aryee و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد نتایج نشان داد که ۱۰ میلی‌مولار PMSF بطور کامل از فعالیت آنزیم لیپاز استخراج شده از ماهی *Mugil cephalus* جلوگیری می‌کند. PMSF یک بازدارنده سرین پروتئاز می‌باشد. این ترکیب باعث کاهش فعالیت لیپازهای گوارشی استخراج شده از دو ماهی آزاد چینوک و New Zealand Hoki شد، با افزایش غلظت این بازدارنده، اثر آن نیز افزایش یافت. بنابراین با توجه به این نتایج این ترکیب نمی‌تواند برای حفاظت از لیپاز از هیدرولیز پروتئاز در طول تخلیص مورد استفاده قرار گیرد (Kurtovic et al. 2010). آنزیم لیپاز جدا شد. از باکتری *Pseudomonas luteola* با طیف وسیعی از غلظت‌های PMSF مورد آزمایش قرار گرفت و اثر مهارکنندگی تا غلظت ۵ میلی‌مولار تشخیص داده شد، انتظار می‌رود که این ترکیب از فعالیت لیپاز جلوگیری کند چرا که لیپاز در بخش سه‌گانه کاتالیزوری خود دارای

سرین بوده و این ترکیب بازدارنده سرین پروتئاز می‌باشد (Litthauer et al. 2002). زمانی که عصاره آنزیم لیپاز آلکالو-ترموفیل تولید شده از باکتری *Bacillus thermoleovorans* در حضور PMSF برای یک ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد، فعالیت آنزیم به‌شدت کاهش یافت که پیشنهاد شد حضور باقی‌مانده سرین در سه‌گانه کاتالیزوری جایگاه فعال، عامل این کاهش می‌باشد (Castro-Ochoa et al. 2005). فعالیت لیپاز ترموفیل جدا شده از باکتری *Bacillus thermoleovorans* نیز در حضور PMSF کاهش یافت (Lee et al. 1999). با توجه به اینکه PMSF بازدارنده سرین پروتئاز است بنابراین کاهش فعالیت آنزیم لیپاز در حضور ترکیب PMSF به دلیل وجود سرین در سه گانه کاتالیزوری جایگاه فعال لیپاز می‌باشد که یک نقش کلیدی را در مکانیسم کاتالیزی ایفا می‌کند. این نتیجه با توجه به وجود یک سه‌گانه کاتالیزوری در سرین پروتئازها و لیپازها، تعجب‌آور نیست (Winkler and Gubernator, 1994). یک میلی‌مولار EDTA از فعالیت لیپاز تخلیص شده از عضله پشتی ماهی *Cirrhinus reba* جلوگیری کرد (Islam et al. 2009). این نتیجه توسط Lima و همکاران (۲۰۰۴) در مورد آنزیم لیپاز *Penicillium aurantiogriseum* بدست آمد. اثر بازدارندگی EDTA ممکن است به دلیل حذف یون‌های فلزی قرار گرفته در نزدیکی یا بر روی جایگاه فعال آنزیم باشد (Islam et al. 2009). کاهش میزان فعالیت آنزیم تا قبل از ستون‌گذاری نیز به دلیل اضافه کردن آمونیوم سولفات می‌باشد، چراکه این ترکیب تا حدی ساختار آنزیم را تغییر داده و موجب کاهش فعالیت می‌شود. عمل دیالیز قبل از انتقال نمونه به ستون کروماتوگرافی، برای حذف پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلودالتون که ممکن است با تشکیل باند با آنزیم مورد نظر درگیر شوند، انجام شد (Kurtovic et al. 2010). براساس نتایج بدست آمده، یون‌های کلسیم، منیزیم و منگنز، فعالیت آنزیم لیپاز استخراج شده را افزایش دادند. درک نقش مهارکننده‌های آنزیم لیپاز ممکن است درک بهتری از مکانیسم فعالیت آن فراهم سازد (Marguet et al. 1994). طی تحقیقی که بر روی استخراج آنزیم لیپاز از باکتری *Bacillus coagulans* انجام شد مشاهده گردید که یون‌های K^+ و Mg^+ باعث بهبود فعالیت آنزیم می‌شوند، یون Mn^{2+} از فعالیت آنزیم جلوگیری می‌کند و یون سدیم تاثیری بر فعالیت آنزیم ندارد (Kumar et al. 2005). ۱۰ میلی مولار یون منیزیم باعث افزایش فعالیت لیپاز استخراج شده از امعاء و احشای کفال خاکستری شد (Aryee et al. 2007). فعالیت لیپازِ تخلیص شده از باکتری *Bacillus thermoleovorans* نیز در حضور یون کلسیم افزایش یافت (Castro-Ochoa et al. 2005). یون کلسیم نقش متفاوتی را در فعالیت لیپاز انجام می‌دهد. دو لیپاز از ماهی کفال خاکستری (*Liza parsia*) استخراج شد و اثر یون کلسیم بر فعالیت این دو آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت هر دو لیپاز در حضور غلظت پایین یون کلسیم، به طور جزئی افزایش و در غلظت‌های بالای این یون به طور جزئی کاهش یافت (Islam et al. 2008). افزایش فعالیت آنزیم در اثر یون کلسیم، به اتصال یون‌های‌کلسیم به اسیدهای چرب آزاد و ثبات ساختار آنزیم به واسطه اتصال یون‌های کلسیم به لیپاز و اتصال جایگاه فعال به دامنه فرعی دوم پروتئین و پایداری ساختار سوم آنزیم نسبت داده شده است (Kim et al. 2000). به نظر می‌رسد نقش اصلی یون کلسیم، حذف اسیدهای چرب رهاسازی شده است، اما اثر کاتالیکی کلسیم بر لیپاز جدا شده از *Humicola lanuginosa*، حذف اسیدهای چرب از مرز مشترک است (Lima et al. 2004). احتمالا یون کلسیم دفع الکترواستاتیک ایجاد شده بین آنزیم و سوبسترا را جبران می‌کند (Islam et al. 2009). یون منگنز فعالیت لیپاز را در اکثر موارد افزایش می‌دهد. این نتیجه توسط Aryee و همکاران (۲۰۰۷) و Lima و همکاران (۲۰۰۴) گزارش شده است. این نتیجه از این نظر حائز اهمیت می‌باشد که ممکن است یون منگنز بیش از یون کلسیم در روش بهینه سازی لیپاز استفاده شود (Kurtovic et al. 2010). پیشنهاد شده است که اثر یون‌های فلزی می‌تواند به تغییر در حلالیت و رفتار اسیدهای چرب یونیزه در مرز مشترک، و تغییر در ویژگی‌های کاتالیزوری آنزیم به خودی خود نسبت داده شود (Lesuisse et al. 1993). به طور کلی بسته به نوع ماهی و بافتی که آنزیم از آن جداسازی می‌شود، ویژگی‌های آنزیم و پایداری آن در برابر عوامل مختلف مانند فلزات، بازدارنده‌ها، دما و pH متفاوت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل و کارکنان موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی کرج و دوستان گرامی سرکار خانم مهندس نگار گلچین و آقایان مهندس بهنام فرجامی، مهندس سعید بحرودی و سید ساسان نجفی به سبب همکاری در انجام مراحل تحقیق قدردانی می‌شود.

منابع

Aryee, A.N.A., Simpson, B., Villalonnga, R. 2007. Lipase fraction from the viscera of grey mullet (*Mugil cephalus*) Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. Enzyme and Microbial Technology 40: 394-402.

Castro-Ochoa, L.D., Rodriguez-Gomez, C., Valerio-Alfaro, G., Ros, R.O. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. Enzyme and Microbial Technology 37: 648-654.

Iijima, N., Tanka, S., Ota, Y. 1998. Purification and characterization of bile salt activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. Fish Physiology and Biochemistry 18: 59-69.

Islam, M.A., Absar, N., Bhuiyan, A.S. 2008. Isolation, purification and characterization of lipase from Grey mullet (*Liza parsia* Hamilton, 1822). Asian Journal of Biochemistry 3: 243-255.

Islam, M.A., Parveen, F., Hossain, K., Khatun, S., Karim, R., Kim, G.S., Absar, N., Haque, S., 2009. Purification and biochemical characterization of lipase from the dorsal part of *Cirrhinus reba*. Thia Journal of Agricultural Science 42: 71-80.

Izquierdo, M.S., Henderson, R.J. 1998. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays. Fish Physiology and Biochemistry 19: 153-162.

Jaeger, K., Eggart, T. 2002. Lipases for biotechnology. Current Opinion on Biotechnology 13: 390-397.

Kazlauskas, R.J., Bornscheuer, U.T. 1998. Biotransformations with lipases. In: Rehm H.J., Pihler, G, Stadler, A., Kelly, P.J.W., (eds.). Biotechnology 37-192.

Kim, M.H., Kim, H.K., Lee, J.K., Park, S.Y., Oh, T.K. 2000. Thermo stable lipase of *Bacillus stearothermophilus*: high level production, purification, and calcium-dependent thermo stability. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 64: 280-286.

Klomklao, S. 2008. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin Journal of Science and Technology 30: 37-46.

Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg D., Schmid, R. 1991. Extracellular lipase of Pseudomonas sp. Strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. Journal of Bacteriology 173: 4836-4841.

Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S., Gupta, R. 2005. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic Bacillus coagulans BTS-3. Protein Expression and Purification 41: 38-44.

Kurtovic, I., Marshall, S.N., Zhao, X., Simpson, B.K. 2010. Purification and properties of digestive lipases from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and New Zealand hoki (*Macruronus novaezelandiae*). Fish Physiology and Biochemistry 36: 1041-1060.

Lee, D.W., Koh, Y.S., Kim, K.J., Kim, B.C., Choi, H.J., Kim, D.S. 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus*

thermoleovorans ID-1. FEMS Microbiology Letters 179: 393-400.

Lesuisse, E., Schanck, K., Colson, C. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. European Journal of Biochemistry 216: 155-160.

Lima, V.M.G., Krieger, N., Mitchell, D.A., Fontana J.D. 2004. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. Biochemical Engineering Journal 18: 65-71.

Litthauer, D., Ginster, A., Skein, E.V.E. 2002. *Pseudomonas luteola* lipase: A new member of the 320-residue pseudomonas lipase family. Enzyme and Microbial Technology 30: 209-215.

Lowry, O.H., Rosebiough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folinphenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Marguet, F., Cudrey, C., Verger, R., Buono, G. 1994. Digestive lipase: inactivation by phosphonates. Biochimica et Biophysica Acta 1210: 157-166.

Masse, L., Kennedy, K.J., Chou, S.P. 2001. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 76: 629-635.

Noriega-Rodriguez, J.A., Gamez-Meza, N., Alanis-Villa, A., Medina-Juarez, L.A., Tejeda-Mansir, A., Angulo-Guerrero, O., Garcia, H.S. 2009. Extraction and fractionation of lipolytic enzyme from viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). International Journal of Food Science and Technology 44: 1223-1228.

Rivera-Perez, C., Garcia-Carreno, F.L., Saborowski, R. 2010. Purification and biochemical characterization of digestive lipase in whiteleg shrimp. Marine Biotechnology 13: 284-295.

Rubin, B., Dennis, E.A. 1997a. Lipases: Part A. Biotechnology Methods in Enzymology. New York: Academic Press, 408 p.

Rubin, B., Dennis, E.A.1997b. Lipases: Part B. Enzyme Characterization and Utilization Methods in Enzymology. New York: Academic Press, 563 p.

Smichi, N., Fendri, A., Chaabouni, R., Ben Rebah, F., Gargouri, Y., Miled, N. 2010. Purification and biochemical characterization of and acid-stable lipase from the pyloric caeca of Sardine (*Sardinella aurita*). Applied Biochemistry and Biotechnology 162: 1483-1496.

Winkler, F.K., Gubernator, K. 1994. Structure and mechanism of human pancreatic lipase. In: Wooley P, Petersen SB (eds) Lipases-their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press, Cambridge, 139-157.

Extraction of lipase from the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and effects of inhibitors and metals on its activity

Narges Anoosheh[1], Seyed Vali Hosseini[1], Rasool Madani[2]*, Abbas Zamani[3]
1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2- Department of Biotechnology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran
3- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Iran

Received 1 September 2013; accepted 4 February 2014

Abstract
Aquatic animals are important resources for extraction of valuable compounds such as enzymes. In this study, lipase was extracted from the intestine of rainbow trout. Samples were defatted with acetone several times; ammonium sulphate (60%) was used for precipitation followed by ultrafiltration for concentrating the samples. The final purification of the enzyme was performed by passing of the samples through G-75 column chromatography. After extraction, effects of two inhibitors were investigated on the activity of the enzyme. The enzyme activity was assayed by p-nitrophenyl palmitate as a substrate. The results showed that Ethylenediaminetetraacetic acid and Phenylmethylsulfonyl fluoride had significant inhibitory effects on the lipase activity ($P<0.05$). $MnCl_2$, $CaCl_2$ and $MgCl_2$ significantly increased the lipase activity ($P<0.05$), while KCl and NaCl decreased the activity ($P<0.05$). So when intestinal lipase of rainbow trout is used as an additive in related industries, these inhibitors can be used for inhibiting enzyme activity.

Keywords: Inhibitory effect, Enzyme activity, Lipase, Metals, Rainbow trout

*Corresponding author: mr_madani@yahoo.com