



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian  
Aquaculture Society

## Aquatic Animals Nutrition

Vol. 11, No. 3, 2025, pages: 1-15  
DOI: 10.22124/janb.2025.31285.1296



### RESEARCH PAPER

### OPEN ACCESS

## Evaluation of the trypsin activity extracted from the pyloric caeca and intestine of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) under some physical and chemical factors

Abbas Zamani

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

Received 19 May 2025   Revised 12 September 2025   Accepted 14 September 2025   Published online 09 August 2026

### KEYWORDS   ABSTRACT

Intestine

Pyloric caeca

Siberian

sturgeon

Trypsin

**Introduction:** The ability of fish to digest food particles depends on the presence of digestive enzymes in the gastrointestinal tract. In gastric fish species, proteolytic enzymes especially pepsin, trypsin, and chymotrypsin appear to play a very important role in catalyzing hydrolysis process of certain peptide bonds. Trypsin, as a serineprotease, complete the acid predigestion of protein delivered to the stomach in combination with other alkaline proteases and peptidases where specifically cleaves at the carboxylic side of lysine and arginine residues. Therefore, trypsin activity could be a sensitive and reliable indicator of nutritional and physiological status of fish at different stages of growth. The aim of this work was to study the effect of some physicochemical factors on the activity of extracted trypsin from pyloric caeca and intestine of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*).

**Materials and Methods:** The collected fish viscera from 10 samples ( $5 \pm 0.4$  kg) were transported to the laboratory and after separating the pyloric caeca and intestine, those samples were washed with cold distilled water (4 °C), pooled and then homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer. After centrifugation at 4 °C, the resulting supernatant from each sample was collected and finally, the physicochemical factors including optimum temperature, thermostability, optimum pH, pH stability, inhibitors and metal ions were evaluated on the extracted trypsin according to the standard protocols. Data obtained from the experimental assessments was analyses by a One-Way ANOVA and the comparison of means was carried out by Duncan's multiple range tests with a statistical significance at  $P < 0.05$ .

**Results and Discussion:** According to the results, optimum temperature of the trypsin from pyloric caeca and intestine was recorded at 55 °C. Similar optimum temperature was recorded for trypsins in silver mojarra, unicorn leatherjacket, beluga and sevruga. 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. The stability of the trypsin was well preserved at temperatures of up to 50 °C. The results of thermostability were in accordance with those of mandarin fish, mrigal carp, common dolphin fish, beluga and sevruga. In general, thermostability of the trypsin enzyme might vary by some factors such as fish species and experimental conditions. The optimum pH of trypsin from both samples was recorded at 8.0 and the results were similar to data reported from trypsin in other species such as mrigal carp and common dolphinfish. The pH stability of trypsin from both samples was highly preserved at pH values comprised between 7.0 and 11.0. Similar results were reported for trypsins from grey triggerfish, zebra blenny, catfish, common dolphin fish, beluga and sevruga. 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. Trypsins are mainly known to be more activity within a range of pH values comprised between 7.5 and 10.5. The inhibitors SBTI, TLCK, PMSF, TPCK, pepstatin A, iodoacetic acid, and EDTA significantly inhibited the enzyme activity, whereas SBTI and TLCK had a completely inhibitory effect on the enzymatic activity ( $P < 0.05$ ). The sensitivity of protease enzymes to various inhibitors is a valuable tool for their proper functional characterization. Our findings were in agreement with data reported in the brownstripe red snapper, silver mojarra, zebra blenny, mrigal carp, Asian seabass, beluga and sevruga. The enzyme activity was significantly increased in the presence of  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Mg}^{+2}$  and decreased by  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ , and  $\text{Al}^{+3}$  ( $P < 0.05$ ). Our results were in agreement with data reported in mandarin fish, zebra blenny, common dolphin fish, beluga and sevruga. 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.

**Conclusion:** Based on the obtained results, the extracted trypsin activity from Siberian sturgeon pyloric caeca and intestine was significantly affected by the evaluated physicochemical factors that can be effective on the optimal activity of the enzyme in the digestive physiology of the fish.

\*Corresponding author: a.zamani@malayeru.ac.ir





"مقاله پژوهشی"

## ارزیابی فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از ضامئ پیلوریک و روده تاسماهی سیری (*Acipenser baerii*) تحت تأثیر برخی عوامل فیزیکی و شیمیایی

عباس زمانی

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

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۵/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۶/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۹

### کلمات کلیدی

### چکیده

در ماهیان دارای معده، پپسین، تریپسین و کیموتریپسین مهمترین آنزیم‌های پروتئازی هستند، جایی که تریپسین همراه با دیگر پروتئازها و پپتیدازهای قلیایی، هضم اسیدی پروتئین انجام شده در معده را تکمیل می‌کند. بنابراین، فعالیت آنزیم تریپسین می‌تواند به عنوان یک شاخص ارزشمند برای بررسی وضعیت تغذیه‌ای ماهی تلقی شود. هدف از این مطالعه، بررسی اثر برخی عوامل فیزیکی و شیمیایی بر فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سیری (*Acipenser baerii*) بود. امعاء و احشای ماهی بعد از انتقال به آزمایشگاه و جداسازی زوائد باب‌المعدی و روده، در بافر ۵۰mM HCl همگن شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس، مایع رویی به دست آمده برای بررسی فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی شامل دمای بهینه، پایداری دمایی، pH بهینه، پایداری pH، بازدارنده‌ها و یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم استخراج شده استفاده شد. یافته‌ها نشان داد که دما و pH بهینه فعالیت آنزیم استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده به ترتیب ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۸ بود و در دمای ۵۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۷-۱۱ نیز پایدار بود. بازدارنده‌های EDTA، TPCK، PMSF، TLCK، SBTI، پپاستاتین A، یدواستیک اسید و به طور معنی‌دار از فعالیت آنزیم جلوگیری کردند، جایی که SBTI و TLCK اثر مهارکنندگی کاملی بر فعالیت آنزیم داشتند ( $P < 0.05$ ). فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده در حضور یون‌های  $Ca^{2+}$  و  $Mg^{2+}$  افزایش معنی‌دار و در حضور یون‌های  $Cu^{2+}$ ،  $Ba^{2+}$ ،  $Zn^{2+}$  و  $Al^{3+}$  کاهش معنی‌دار داشت ( $P < 0.05$ ). بر اساس نتایج به دست آمده، فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سیری به طور معنی‌دار تحت تأثیر فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی مورد مطالعه قرار داشت که ممکن است بر فعالیت بهینه این آنزیم در فیزیولوژی گوارش تاسماهی سیری مؤثر باشد.

## مقدمه

امروزه، ماهیان خاویاری به دلایل مختلف، مانند صید بی‌رویه برای تولید گوشت و خاویار، آلودگی آب و تخریب زیستگاه‌های طبیعی به عنوان یک گروه آسیب‌پذیر<sup>۱</sup> از گونه‌های ماهیان مطرح بوده و از این رو، در سال‌های اخیر، مطالعات بر بازسازی ذخایر و پرورش تجاری آنها متمرکز شده است. پرورش تجاری ماهیان خاویاری در ایران در حدود دو دهه قدمت دارد و بر اساس سالنامه آماری سازمان شیلات ایران میزان تولید این ماهیان در فاصله سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۲ از ۲۵۱۶ تن به ۴۷۸۷ تن افزایش یافته است که افزایش ۹۰ درصدی را نشان می‌دهد (Ghorbani Vaghei et al. 2022; Iranian Fisheries Organization, 2024). در میان گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری، تاسماهی سبیری (*Acipenser baerii*) به دلیل رشد سریع، مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، سازگاری بالا در روش‌های پرورش متراکم و چرخه تولید مثل نسبتاً کوتاه، آن را به گونه‌ای مناسب برای آبی‌پروری تبدیل می‌کند. پرورش این گونه در دهه ۱۹۷۰ در اتحاد جماهیر شوروی سابق آغاز شد و سپس در کشورهای دیگر مانند فرانسه، اسپانیا، بلژیک، مجارستان، آلمان، چین و آمریکا گسترش یافت. در ایران نیز تاسماهی سبیری همراه با فیل ماهی اصلی ترین گونه‌های تاسماهیان پرورشی محسوب می‌شوند (Ghorbani Vaghei et al. 2022).

یکی از جنبه‌های مهم در صنعت پرورش ماهیان خاویاری که بر میزان تولید و پرورش پایدار آن تأثیرگذار است، توسعه جیره‌های غذایی برای افزایش رشد و کیفیت محصول است. با وجود این، توانایی ماهی در هضم غذا عمدتاً به وجود آنزیم‌های گوارشی در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش مربوط می‌شود. آنزیم‌های گوارشی، قابلیت هضم در موجود زنده مورد مطالعه را منعکس می‌کنند و بنابراین، وضعیت تغذیه‌ای را در مراحل مختلف رشد نشان می‌دهند (Kolkovski, 2001; Yúfera and Darias, 2007). لذا، بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی به عنوان یک روش بیوشیمیایی، می‌تواند در تولید اطلاعات ارزشمند برای درک فیزیولوژی گوارش در ماهی نقش ایفا کند و در تعریف نیاز ماهی به مواد مغذی انرژی‌زا شامل

پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها مؤثر باشد (Bolasina et al. 2006). در میان این مواد مغذی، پروتئین‌ها دارای نقش کلیدی در رشد ماهی هستند که در ساخت یاخته‌های ماهیچه‌ای و اندام‌ها نقش دارند. این مواد مغذی در طیف وسیعی وجود دارند و ارزش غذایی آن‌ها به ترکیب اسید آمینه آن‌ها بستگی دارد. استفاده از پروتئین‌های غذایی به طیف گسترده‌ای از ویژگی‌های عملکردی، بیوشیمیایی و ژنتیکی خاص گونه ماهی مانند سن، عوامل محیطی (pH، اکسیژن محلول و سطح آمونیاک)، اسید آمینه پروتئین غذایی، سطح انرژی قابل هضم و قابل استفاده در جیره غذایی و وجود عوامل ضد تغذیه‌ای و موارد دیگر بستگی دارد (Zamani et al. 2023).

هضم پروتئین در دستگاه گوارش توسط چند آنزیم پروتئاز با عملکردهای خاص روی 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 دیگر پروتئازها و پپتیدازهای قلیایی مانند کیموتریپسین، آمینوپپتیدازها و کربوکسی‌پپتیدازها، هضم اسیدی انجام شده در معده را تکمیل کرده 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 همچنین، یک نشانگر زیستی مفید برای وضعیت تغذیه‌ای و فیزیولوژیک استفاده شده است (Nazdar et al. 2018). طبق بررسی‌های انجام شده در گونه‌های مختلف ماهی، تریپسین در فعال‌سازی تریپسینوژن و دیگر زایمون‌ها در روده شرکت می‌کند و نقش مؤثری در تجزیه پروتئین جیره غذایی در ماهیان گوشتخوار تا ۵۰-۴۰٪ را دارد (Nolasco-Soria, 2021). علاوه بر این، بررسی فعالیت این سرینوپروتئاز در طراحی پروتکل‌های مربوط به قابلیت هضم مواد تشکیل‌دهنده خوراک و فرموله کردن خوراک‌هایی با قابلیت هضم بالا در گونه‌های ماهیان پرورشی در محیط آزمایشگاه (*in vitro*) ضروری است

### آماده‌سازی عصاره آنزیمی

نمونه زوائد باب‌المعدی 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 به نسبت ۱ به ۳ با استون سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) مخلوط، 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 میلی‌مولار تریس-HCl و pH ۷/۵ (حاوی ۱۰ میلی‌مولار  $\text{CaCl}_2$  و ۰/۵ مولار NaCl) به 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  $14000g$  سانتریفیوژ شد و محلول رویی به عنوان عصاره خام آنزیمی در نظر گرفته شد (Zamani and Benjakul, 2016).

### سنجش فعالیت آنزیم تریپسین

برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین از روش Erlanger و همکاران (۱۹۶۱) و از سوبسترای BAPNA ( $\text{Na}^+$ -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide-HCL) استفاده شد. در این روش، ۲۵  $\mu\text{L}$  عصاره آنزیمی با ۱۲۵۰  $\mu\text{L}$  محلول سوبسترا-بافر (۱ میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس-HCl، pH ۸ حاوی ۱۰ میلی‌مولار  $\text{CaCl}_2$ ) مخلوط، و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۲۵۰  $\mu\text{L}$  اسید استیک ۳۰٪ به مخلوط فوق اضافه، و قرائت نوری در ۴۱۰ nm توسط اسپکتروفوتومتر انجام شد. نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی تهیه شد، با این تفاوت که به جای نمونه آنزیمی از آب مقطر استفاده شد. برای محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین از فرمول زیر استفاده شد:

(Gilannejad et al. 2017). از این رو، درک بهتر ویژگی‌های آنزیم تریپسین می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در مورد تجزیه پروتئین در دستگاه گوارش ماهی ارائه کند. خواص فیزیکوشیمیایی آنزیم تریپسین زوائد باب‌المعدی و روده ماهیان مختلف از جمله کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idellus*)، کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*)، تک‌خار (*Aluterus monoceros*)، کفشک (*Paralichthys orbignyanus*)، فیل ماهی (*Huso huso*) و ازون برون (*Acipenser stellatus*) مطالعه شده است (Liu et al. 2007; Zamani et al. 2014; Zamani and Benjakul, 2016; Candiottio et al. 2017; Zamani et al. 2023). در ماهیان خاویاری فعالیت آنزیم تریپسین عمدتاً در طی دوره رشد لاروی بررسی شده (Ostaszewska et al. 2011; Camacho et al. 2011; Asgari et al. 2013; Ghasemi et al. 2020) و مطالعات در زمینه بررسی خواص فیزیکوشیمیایی آن بسیار اندک بوده که می‌توان به مطالعه Zamani و همکاران (۲۰۲۳) اشاره کرد که خواص فیزیکوشیمیایی آنزیم تریپسین را در روده فیل ماهی و ازون برون مطالعه کردند. هدف از مطالعه حاضر، تعیین دما و pH بهینه، دما و pH پایداری و همچنین، بررسی اثر یون‌های فلزی و بازدارنده‌ها بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سبیری پرورشی است تا اطلاعات ارزشمندی در خصوص ظرفیت گوارشی ناشی از فعالیت این آنزیم در شرایط برون‌تنی (*In vitro*) حاصل شود.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه نمونه از ماهی

در این مطالعه، امعاء و احشای ۱۰ عدد تاسماهی سبیری پرورشی با میانگین وزن  $0.4 \pm 0.5$  کیلوگرم از مزرعه پرورشی در استان مازندران تهیه، و سپس در داخل یک ظرف یونولیتی با نسبت ۱ به ۲ با یخ مخلوط، و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس زوائد باب‌المعدی و روده 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).

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

دماهای مختلف شامل ۱۰، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۵، ۹۵ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس فعالیت آنزیم تریپسین در طول موج ۴۱۰ nm اندازه‌گیری شد. برای تعیین دمای پایداری، ابتدا نمونه آنزیمی در دماهای مختلف شامل ۱۰، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۲۵  $\mu\text{L}$  از این نمونه با ۱۲۵۰  $\mu\text{L}$  از محلول سوپسترا-بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس HCl، pH ۸، ۱۰ میلی مولار  $\text{CaCl}_2$ ) مخلوط، و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ nm انجام شد (Zamani and Benjakul, 2016). فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه کنترل (بدون حرارت‌دهی) بر اساس فرمول زیر به صورت درصد محاسبه شد:

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

فوق ترکیب شده و سپس برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۲۵  $\mu\text{L}$  از نمونه گرمخانه‌گذاری شده با ۱۲۵۰  $\mu\text{L}$  از محلول سوپسترا-بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس HCl، pH ۸، حاوی ۱۰ میلی مولار  $\text{CaCl}_2$ ) مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ nm انجام شد (Zamani et al. 2023). فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه کنترل (بدون گرمخانه‌گذاری در بافر با pHهای مختلف) بر اساس فرمول زیر محاسبه و به صورت درصد گزارش شد:

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

در این فرمول ۸۸۰۰ بیانگر ضریب تاریکی برای پارانیتروانیلین است که محصول هیدرولیز سوپسترای BAPNA توسط آنزیم تریپسین است.

### سنجش پروتئین محلول

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

### دمای بهینه و دمای پایداری

برای تعیین دمای بهینه، ابتدا ۲۵  $\mu\text{L}$  نمونه آنزیمی با ۱۲۵۰  $\mu\text{L}$  از محلول سوپسترا-بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس HCl، pH ۸، ۱۰ میلی مولار  $\text{CaCl}_2$ ) ترکیب شد و برای مدت ۲۰ دقیقه در

### pH بهینه و پایداری pH

برای تعیین pH بهینه، ابتدا ۲۵  $\mu\text{L}$  نمونه آنزیمی بعد از مخلوط شدن با ۱۲۵۰  $\mu\text{L}$  از محلول سوپسترا-بافر با pHهای مختلف (۱ میلی مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار استات سدیم با pH ۴-۶، بافر ۵۰ میلی مولار تریس با pH ۷-۹ و بافر ۵۰ میلی مولار گلیسین با pH ۱۰-۱۱؛ تمام بافرها حاوی ۱۰ میلی مولار  $\text{CaCl}_2$  بودند) برای ۲۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس فعالیت آنزیم تریپسین در طول موج ۴۱۰ nm اندازه‌گیری شد. برای تعیین پایداری pH، ابتدا نمونه آنزیمی به نسبت ۱ به ۱ با هر یک از بافرهای

اثر یون‌های فلزی شامل یون‌های تک ظرفیتی ( $\text{Na}^+$ ) و دو ظرفیتی ( $\text{K}^+$ ،  $\text{Ca}^{+2}$ ،  $\text{Mg}^{+2}$ ،  $\text{Ba}^{+2}$ ،  $\text{Cu}^{+2}$  و  $\text{Zn}^{+2}$ )

یون‌های فلزی



گرفت. سپس  $250 \mu\text{L}$  اسید استیک  $30\%$  به مخلوط فوق اضافه، و قرائت نوری در طول موج  $410 \text{ nm}$  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 زیر به صورت درصد گزارش شد:

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

آنزیمی فوق با  $1250 \mu\text{L}$  محلول سوبسترا-بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر  $50$  میلی مولار تریس- $\text{HCl}$ ،  $8 \text{ pH}$   $10$  میلی مولار  $\text{CaCl}_2$ ) ترکیب شده و برای مدت  $20$  دقیقه در دمای  $55$  درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس،  $250 \mu\text{L}$  اسید استیک  $30\%$  به مخلوط فوق اضافه شده و قرائت نوری در طول موج  $410 \text{ nm}$  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 زیر به صورت درصد گزارش شد:

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

### دما بهینه و پایداری دمایی

نتایج حاصل از بررسی دمای بهینه و پایداری دمایی آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد بابالمعدی و روده تاسماهی سبیری در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد دمای بهینه آنزیم در هر دو نمونه زوائد بابالمعدی و روده برابر با  $55$  درجه سانتی گراد بود، به طوری که با افزایش دما از  $10$  تا  $55$  درجه سانتی گراد فعالیت آنزیم افزایش یافت و در  $55$  درجه سانتی گراد به بیشینه خود رسید ولی از  $60$  تا  $70$  درجه سانتی گراد یک کاهش معنی دار در فعالیت آنزیم مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). پایداری دمایی آنزیم تریپسین نیز نشان داد که با افزایش

و سه ظرفیتی ( $\text{Al}^{+3}$ ) در غلظت  $5 \text{ mM}$  بر فعالیت آنزیم تریپسین بررسی شد (Zamani et al. 2014). برای این منظور، ابتدا نمونه آنزیمی با یون های فلزی با نسبت ۱ به ۱ برای مدت  $30$  دقیقه در دمای اتاق گرمخانه گذاری شد. سپس  $250 \mu\text{L}$  از مخلوط فوق با  $1250 \mu\text{L}$  از محلول سوبسترا-بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر  $50$  میلی مولار تریس- $\text{HCl}$ ،  $8 \text{ pH}$   $10$  میلی مولار  $\text{CaCl}_2$ ) ترکیب شده و برای مدت  $20$  دقیقه در دمای  $55^\circ\text{C}$  قرار

### بازدارنده های آنزیمی

ابتدا نمونه آنزیمی با نسبت ۱ به ۱ با بازدارنده های  $^2\text{SBTI}$  ( $0.05 \text{ mM}$ ) و  $^3\text{TLCK}$  ( $5 \text{ mM}$ ) به عنوان بازدارنده های اختصاصی تریپسین،  $^4\text{PMSF}$  ( $10 \text{ mM}$ ) به عنوان بازدارنده پروتئازهای سرین،  $^5\text{TPCK}$  ( $5 \text{ mM}$ ) به عنوان بازدارنده اختصاصی کیموتریپسین، پیپاستاتین  $^6\text{A}$  ( $0.1 \text{ mM}$ ) به عنوان بازدارنده اختصاصی پروتئازهای آسپارتیک، یدواسیتیک اسید  $^7$  ( $1 \text{ mM}$ ) به عنوان پروتئازهای سیستئین و  $^8\text{EDTA}$  ( $2 \text{ mM}$ ) به عنوان بازدارنده متالوپروتئازها ترکیب شد و برای  $15$  دقیقه در دمای اتاق گرمخانه گذاری شد. سپس  $250 \mu\text{L}$  از مخلوط

### آنالیز آماری

در این تحقیق، ابتدا نرمال بودن داده ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد و سپس تأثیر دما،  $\text{pH}$ ، یون های فلزی و بازدارنده ها بر فعالیت آنزیم تریپسین از طریق آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) تحت نرم افزار SPSS20 سنجش شد و برای تعیین معنی دار بودن اختلاف میانگین ها بین نمونه شاهد با شاخص های فیزیکوشیمیایی مورد مطالعه از آزمون دانکن در سطح  $5\%$  استفاده شد. تمام ارزیابی ها نیز در ۳ تکرار انجام شد.

### نتایج

<sup>0</sup> Pepstatin A

<sup>1</sup> Iodoacetic acid

<sup>2</sup> Ethylenediaminetetraacetic acid

<sup>3</sup> Soybean trypsin inhibitor

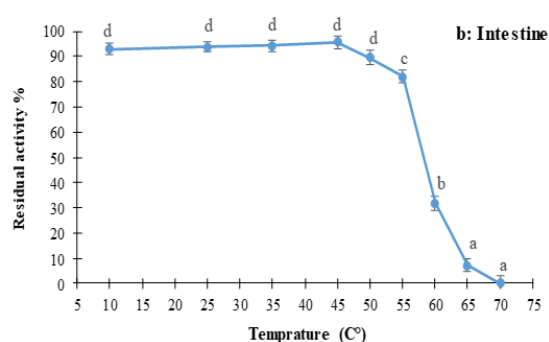
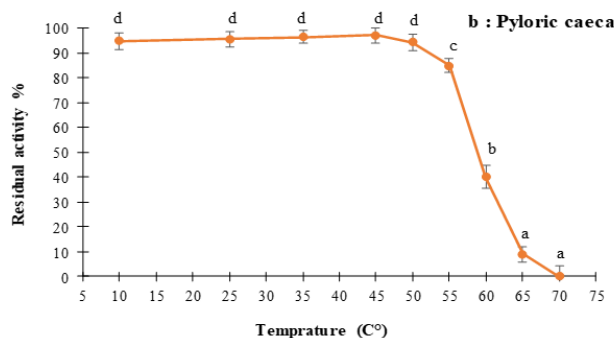
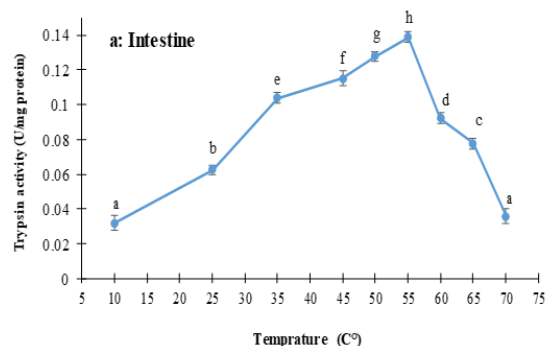
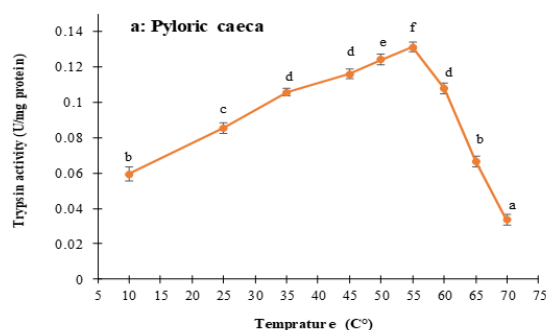
<sup>4</sup> N-tosyl-L-Lysine Chloromethyl Ketone

<sup>5</sup> Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride

<sup>6</sup> N-tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone

در پایداری آنزیم در ضمائم پیلوریک و روده مشاهده شد که در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تقریباً غیرفعال شد ( $P < 0.05$ ).

دما از ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای زوائد باب‌المعدی و روده به ترتیب حدود ۹۵٪ و ۹۰٪ فعالیت آنزیم حفظ شد، در حالی که از ۵۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد کاهش معنی‌دار



شکل ۱ تأثیر دما بر فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از ضمائم پیلوریک و روده تاسماهی سیبری (*A. baerii*). a: دمای بهینه، b: دمای پایداری (Mean  $\pm$  SD, n = 3,  $P < 0.05$ ).

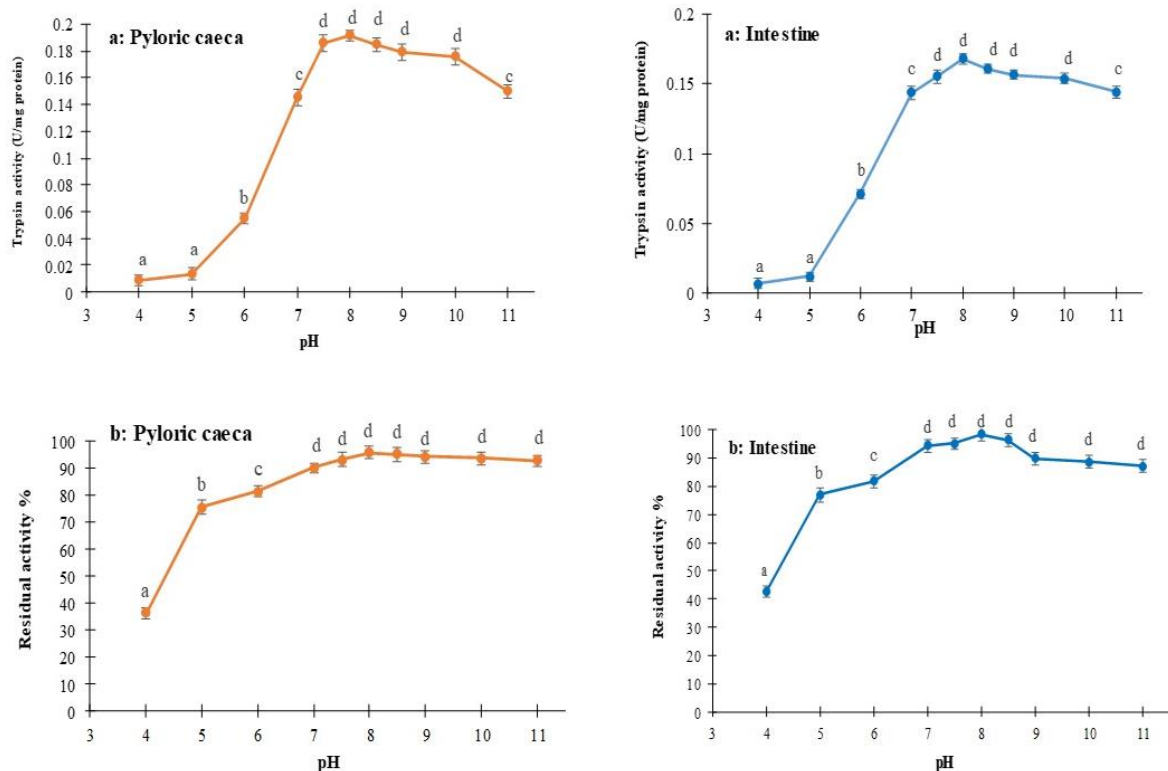
**Figure 1** The effect of temperature on the trypsin activity extracted from Siberian sturgeon (*A. baerii*) pyloric caeca and intestine. a: optimum temperature, b: thermostability (Mean  $\pm$  SD, n = 3,  $P < 0.05$ ).

باب‌المعدی از pH ۷ تا ۱۱ پایدار بود و تا ۹۳٪ فعالیت آن حفظ شد که در مقایسه با دیگر pH ها به طور معنی‌دار بالا بود ( $P < 0.05$ )، در حالی که در pH به شدت اسیدی (۴) تقریباً ناپایدار بود و فعالیت آن به طور معنی‌دار کاهش پیدا کرد ( $P < 0.05$ ). در روده نیز فعالیت آنزیم در محدوده pH ۷ تا ۱۱ پایدار بود و تا ۸۷٪ فعالیت آن حفظ شد که در مقایسه با دیگر pH ها به طور معنی‌دار بالا بود ( $P < 0.05$ )، در حالی که در pH به شدت اسیدی (۴) تقریباً ناپایدار بود و فعالیت آن به طور معنی‌دار کاهش پیدا کرد ( $P < 0.05$ ).

### pH بهینه و پایداری pH

pH بهینه و پایداری pH آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سیبری در شکل ۲ نشان داده شده است. pH بهینه برای فعالیت آنزیم در زوائد باب‌المعدی و روده برابر ۸ بود، به طوری که با افزایش pH از ۴ تا ۸، فعالیت آن افزایش و از pH ۸/۵ تا ۱۱ کاهش یافت، به طوری که در pH به شدت اسیدی و قلیایی (۴ و ۱۱) کاهش معنی‌دار در فعالیت آنزیم ثبت شد ( $P < 0.05$ ). پایداری pH نیز نشان داد که آنزیم تریپسین در زوائد





شکل ۲ تأثیر pH بر فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از ضمائم پیلوریک و روده تاسماهی سیبری (*A. baerii*). a: pH بهینه، b: پایداری pH (Mean  $\pm$  SD, n = 3, P<0.05).

Figure 2 The effect of pH on the trypsin activity extracted from Siberian sturgeon (*A. baerii*) pyloric caeca and intestine. a: optimum pH, b: pH stability (Mean  $\pm$  SD, n = 3, P<0.05).

#### اثر بازدارنده‌ها

نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارنده‌ها بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سیبری در جدول ۲ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد در حضور تمام بازدارنده‌های مورد آزمایش کاهش معنی‌دار داشت ( $P < 0.05$ )، به طوری که در زوائد باب‌المعدی و روده بین بازدارنده‌های TPCK و SBTI و بین بازدارنده‌های TPCK و یدواستیک اسید و در روده بین بازدارنده‌های TPCK، پپاستاتین A و یدواستیک اسید اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). بالاترین میزان بازدارندگی در زوائد باب‌المعدی و روده در حضور TLCK و کمترین میزان آن در زوائد باب‌المعدی و روده به ترتیب در حضور TPCK و یدواستیک اسید ثبت شد.

#### اثر یون‌های فلزی

نتایج حاصل از بررسی اثر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سیبری در جدول ۱ نشان داده شده است. یون‌های  $Na^+$  و  $K^+$  تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد نشان ندادند ( $P > 0.05$ ). یون‌های  $Ca^{2+}$  و  $Mg^{2+}$  باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد شدند ( $P < 0.05$ )؛ در حالی که در حضور یون‌های  $Al^{3+}$ ،  $Zn^{2+}$ ،  $Ba^{2+}$ ،  $Cu^{2+}$  کاهش معنی‌دار در فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد و کمترین میزان فعالیت در حضور یون  $Al^{3+}$  ثبت شد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۱ تأثیر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از ضمائم پیلوریک و روده تاسماهی سیبری (*A. baerii*)

**Table 1 The effect of metal ions on the trypsin activity extracted from Siberian sturgeon (*A. baerii*) pyloric caeca and intestine**

| Metal ions       | Concentration | Residual activity (%)     |                           |
|------------------|---------------|---------------------------|---------------------------|
|                  |               | Pyloric caeca             | Intestine                 |
| Control          | -             | 100 ± 0.00 <sup>d</sup>   | 100 ± 0.00 <sup>d</sup>   |
| K <sup>+</sup>   | 5 mM          | 98.3 ± 1.01 <sup>d</sup>  | 98.5 ± 0.93 <sup>d</sup>  |
| Na <sup>+</sup>  | 5 mM          | 99.0 ± 1.16 <sup>d</sup>  | 99.9 ± 1.01 <sup>d</sup>  |
| Ca <sup>+2</sup> | 5 mM          | 113.0 ± 1.03 <sup>e</sup> | 109.3 ± 1.13 <sup>e</sup> |
| Mg <sup>+2</sup> | 5 mM          | 109.0 ± 1.10 <sup>e</sup> | 105.3 ± 1.05 <sup>e</sup> |
| Cu <sup>+2</sup> | 5 mM          | 67.6 ± 1.04 <sup>b</sup>  | 65.7 ± 1.10 <sup>b</sup>  |
| Zn <sup>+2</sup> | 5 mM          | 74.5 ± 0.98 <sup>c</sup>  | 64.83 ± 1.23 <sup>c</sup> |
| Ba <sup>+2</sup> | 5 mM          | 61.2 ± 1.15 <sup>b</sup>  | 54.5 ± 1.05 <sup>b</sup>  |
| Al <sup>+3</sup> | 5 mM          | 43.3 ± 0.98 <sup>a</sup>  | 34.5 ± 0.93 <sup>a</sup>  |

حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است (میانگین ± انحراف معیار؛ n = ۳؛ P < ۰/۰۵).  
Different superscript letters in each column indicate significant difference (Mean ± SD, n = 3, P < 0.05).

جدول ۲ تأثیر بازدارنده‌ها بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سیبری (*A. baerii*)

**Table 2 The effect of inhibitors on the trypsin activity extracted from Siberian sturgeon (*A. baerii*) pyloric caeca and intestine**

| Inhibitors      | Concentration | Inhibition (%)           |                          |
|-----------------|---------------|--------------------------|--------------------------|
|                 |               | Pyloric caeca            | Intestine                |
| Control         | -             | 0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.0 ± 0.00 <sup>a</sup>  |
| PMSF            | 10 mM         | 40.5 ± 0.95 <sup>e</sup> | 39.5 ± 1.05 <sup>d</sup> |
| SBTI            | 0.05 mM       | 98.5 ± 1.03 <sup>f</sup> | 99.0 ± 1.06 <sup>e</sup> |
| TLCK            | 5 mM          | 99.5 ± 0.82 <sup>f</sup> | 99.8 ± 0.92 <sup>e</sup> |
| TPCK            | 5 mM          | 0.5 ± 0.08 <sup>b</sup>  | 0.8 ± 0.07 <sup>b</sup>  |
| Pepstatine A    | 0.01mM        | 0.9 ± 0.09 <sup>c</sup>  | 0.8 ± 0.06 <sup>b</sup>  |
| Iodoacetic acid | 1 mM          | 0.65 ± 0.03 <sup>b</sup> | 0.74 ± 0.05 <sup>b</sup> |
| EDTA            | 2 mM          | 24.7 ± 0.96 <sup>d</sup> | 23.2 ± 0.93 <sup>c</sup> |

حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است (میانگین ± انحراف معیار؛ n = ۳؛ P < ۰/۰۵).  
Different superscript letters in each column indicate significant difference (Mean ± SD, n = 3, P < 0.05).

## بحث

دما و pH از عوامل مؤثر بر فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌ها بوده و هر آنزیم برای فعالیت خود دارای دما و pH بهینه است. در این مطالعه، دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سیبری ۵۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد که با نتایج گزارش شده در ماهی موجارا نقره‌ای (*Diapterus rhombeus*)، ماهی مرکب (*Sepia officinalis*)، ماهی تک‌خار و فیل ماهی و ازون (Silva et al. 2011; Balti et al. 2012; Zamani and Benjakul, 2016;

Zamani et al. 2023). بررسی‌ها نشان می‌دهد که دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین در محدوده ۳۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار دارد، به طوری که در ماهی کپور هندی (*Cirrhinus mrigala*) دمای ۳۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد (Khangembam and Chakrabarti, 2015)، گربه ماهی (*Luphiosilurus alexandri*) دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (Dos Santos et al. 2016)، ماهی گالیت (*Coryphaena hippurus*) دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد (dos Santos et al. 2020) و ماهی پیراروکو (*Arapaima gigas*) دمای ۴۵ درجه

برابر ۹ (Dos Santos et al. 2016)، ماهی تون باله دراز برابر ۸/۵ (Klomklao and Benjakul, 2018) و ماهی پیراروکو برابر ۹/۲۵ (de Freitas-Júnior et al. 2021) گزارش شد. بر اساس مطالعه Simpson (۲۰۰۰) تریپسین در ماهیان معمولاً در pH قلیایی به ویژه pH بین ۷/۵ تا ۱۰/۵ دارای فعالیت بهینه است. آنزیم تریپسین متعلق به گروه پروتئازهای قلیایی است و تحت شرایط اسیدی ساختار و توزیع بار الکتریکی آن تغییر کرده و آنزیم نمی‌تواند به طور صحیح به سوبسترا متصل شود.

پایداری pH آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سبیری در محدوده ۷-۱۱ بود که با نتایج حاصل از مطالعه Jellouli و همکاران (۲۰۰۹) در ماهی تریگر خاکستری، Ktari و همکاران (۲۰۱۲) در زبرا بلنی (Dos Santos, *Salaria basilisca*) و همکاران (۲۰۱۶) در گربه ماهی، Klomklao و Benjakul (۲۰۱۸) در ماهی تون باله دراز، dos Santos و همکاران (۲۰۲۰) در ماهی گالیت و همکاران (۲۰۲۳) در فیل ماهی و ازون‌برون مطابقت داشت. پایداری آنزیم در pH به ویژه ممکن است با بارالکتریکی آنزیم در آن pH مرتبط باشد. در pH های به شدت اسیدی و قلیایی، دفع الکترواستاتیک بین مولکولی قوی از طریق القای بار الکتریکی سبب تورم و از هم گسیختگی 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 های اسیدی، ناپایدار و در pH های قلیایی دارای پایداری مناسب است.

نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سبیری نشان داد بازدارنده‌های اختصاصی (TLCK و SBTI) تأثیر مهارکنندگی کاملی بر فعالیت این آنزیم داشتند، ولی دیگر بازدارنده‌ها تا حدی از فعالیت آنزیم جلوگیری کرده و یا اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم نداشتند. نتایج این مطالعه با مطالعات انجام شده در ماهی سرخو، موجارا نقره‌ای، زبرا بلنی، کپور هندی، تون باله دراز، ماهی گالیت، فیل ماهی و ازون‌برون و باس آسیایی (Khangtaphant and Benjakul, 2010; Silva et al. 2011; Ktari

سانتی‌گرا (de Freitas-Júnior et al. 2021) گزارش شده است. البته تفاوت در دمای فعالیت آنزیم می‌تواند ناشی از دمای زیستگاه ماهی، سوبسترای مورد استفاده برای سنجش فعالیت آنزیم و همچنین شرایط آزمایشی باشد (Klomklao and Benjakul, 2018). اگرچه تریپسین حاصل از ماهیان عمدتاً در دمای بالاتر از ۴۰-۵۰ درجه سانتی‌گرا ناپایدار است، اما پایداری حرارتی آن در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گرا به خوبی شناخته شده است.

دمای پایداری آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سبیری تا ۵۰ درجه سانتی‌گرا بود. پایداری دمایی این آنزیم با پایداری دمایی آنزیم تریپسین در ماهی ماندارین (*Siniperca chuatsi*)، ماهی تریگر خاکستری (*Balistes capticus*)، ماهی کپور هندی، گربه ماهی، ماهی تون باله دراز (*Thunnus alalunga*)، ماهی گالیت، فیل ماهی و ازون‌برون 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 که پایداری دمایی آنزیم تریپسین در ماهیان مناطق سردسیری تا ۴۰ درجه سانتی‌گرا و در ماهیان مناطق گرمسیری و معتدله تا ۵۰ درجه سانتی‌گرا است. غیرفعال شدن آنزیم در دماهای بالا احتمالاً ممکن است به دلیل از هم گسیختگی ساختاری آنزیم باشد. پایداری دمایی آنزیم تریپسین در ماهیان ارتباط مستقیمی با دمای زیستگاه ماهی دارد و ممکن است نشان دهنده این واقعیت باشد که ماهیان جانورانی خونسرد هستند. البته دمای بهینه و پایداری آنزیم ممکن است نسبت به دمای زیستگاه ماهی بالاتر باشد (Rungruangsak-Torrissen, 2007).

مقدار pH بهینه برای آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سبیری ۸ بود. چنین نتایجی توسط Khantaphant و Benjakul (۲۰۱۰) در ماهی سرخو (*Lutjanus vitta*)، Khangembam و Chakrabarti (۲۰۱۵) در ماهی کپور هندی و dos Santos و همکاران (۲۰۲۰) در ماهی گالیت گزارش شد. pH بهینه فعالیت آنزیم تریپسین در سرخو برابر ۸/۵ (Khantaphant and Benjakul, 2010)، گربه ماهی

آن می‌شوند، در حالی که برخی مانند مس از فعالیت آنزیم جلوگیری می‌کنند (Green et al. 1952). یون‌های فلزی می‌توانند به طور مؤثری از طریق تغییر جریان الکترون در یک سوپسترا یا آنزیم واکنش کاتالیز شده را کنترل کرده و با توجه به گروه‌های عامل موجود در جایگاه فعال آنزیم در اتصال آن به سوپسترا نقش داشته باشند. معمولاً توزیع بار در جایگاه فعال یک آنزیم به گونه‌ای است تا وضعیت گذار واکنش کاتالیز شده نسبت به سوپسترا را تثبیت کند (Glusker et al. 1999). Abita و همکاران (۱۹۶۹) نشان دادند که یون کلسیم می‌تواند به N-terminal تریپسینوزن متصل شده و بدون تغییر در ساختار آن، باعث افزایش میل ترکیبی پیوند لایزین-ایزولوسین برای هیدولیز با تریپسین می‌شود. البته تأثیر یون‌های فلزی بر میزان فعالیت آنزیم تریپسین در گونه‌های مختلف ماهیان ممکن است تابع گونه ماهی و همچنین سازگاری‌های غذایی و زیست محیطی آن باشد (Khangembam and Chakrabarti, 2015).

از یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که عوامل فیزیکی‌وشیمیایی مورد مطالعه در این تحقیق، به ویژه یون‌های فلزی و بازدارنده‌های آنزیمی، بر فعالیت آنزیم تریپسین حاصل از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سبیری در شرایط برون‌تنی تأثیرگذار بوده و می‌توان با کنترل این عوامل باعث بهبود عملکرد فعالیت آنزیم تریپسین در فیزیولوژی گوارش این گونه پرورشی شد. از طرفی ذکر این نکته نیز ضروری است که برای دستیابی به نتایج بهتر در خصوص بهبود عملکرد تغذیه‌ای در بحث گوارش پروتئین‌ها، بررسی شرایط فعالیت دیگر آنزیم‌های پروتئازی به ویژه پپسین و کیموتریپسین می‌تواند مؤثر باشد.

#### منابع

- Abita, J.P., Delaage, M., Lazdunski, M., Savrda, J. 1969. The mechanism of activation of trypsinogen: The role of the four N-Terminal aspartyl residues. *European Journal of Biochemistry* 8: 314-324. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00530.x
- Asgari, R., Rafiee, G., Eagderi, S., Noori, F., Agh, N., Poorbagher, H., Gisbert, E. 2013. Ontogeny of the digestive enzyme activities in hatchery produced Beluga (*Huso huso*). *Aquaculture* 416: 33-40. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.08.014
- Balti, R., Bougherra, F., Bougatef, A., Hayet, B.K., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Guillochon, D., Nasri, M. 2012. Chymotrypsin from the 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 برگشت پذیر برای آنزیم تریپسین است که کمپلکسی پایدار با آنزیم ایجاد کرده و منجر به کاهش دسترسی آنزیم به سوپسترای واقعی می‌شود (Senphan et al. 2015). بازدارنده TLCK یک بازدارنده برگشت ناپذیر برای آنزیم تریپسین است که از طریق تشکیل پیوند کووالانسی با اسید آمینه هیستیدین در جایگاه فعال آنزیم باعث مسدود شدن این جایگاه برای اتصال به سوپسترا 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 که یون‌های کلسیم و منیزیم باعث افزایش فعالیت آنزیم تریپسین استخراج شده از زوائد باب‌المعدی و روده تاسماهی سبیری شدند، در حالی که دیگر یون‌های فلزی اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم داشتند و یا مانند سدیم و پتاسیم تأثیری بر فعالیت آنزیم نشان ندادند. این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعه Lu و همکاران (۲۰۰۸) در ماهی ماندارین، Ktari و همکاران (۲۰۱۲) در ماهی زبرای بلنی، dos Santos و همکاران (۲۰۲۰) در ماهی گالی و Zamani و همکاران (۲۰۲۳) در فیل ماهی و ازون‌برون همخوانی دارد. در باره اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم تریپسین باید اشاره کرد که آنها می‌توانند به عنوان کوفاکتور باعث افزایش فعالیت آنزیم شده و یا در برخی موارد فعالیت آنزیم را کاهش دهند، به طوری که یون‌های کلسیم و منیزیم باعث افزایش فعالیت

- hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates: Purification and biochemical characterisation. *Food Chemistry* 130: 475-484. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.019
- Bolasina, S., Pérez, A., Yamashita, Y. 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 252: 503-515. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.07.015
- Camacho, S., Carmona, R., Llorente, J.I., Sanz, A., García-Gallego, M., Domezain, A., Dominguez, N., Ostos-Garrido, M.V. 2011. Stomach development in the sturgeon *Acipenser naccarii*: Histoenzymatic and ultrastructural analysis. *Journal of Applied Ichthyology* 27: 693-700. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2010.01581.x
- Candiotto, F.B., Freitas-Júnior, A.C.V., Neri, R.C.A., Bezerra, R.S., Rodrigues, R.V., Sampaio, L.A., Tesser, M.B. 2017. Characterization of digestive enzymes from captive Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Brazilian Journal of Biology* 78: 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., 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., 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., Pereira, H.J.V. 2020. Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish): Purification, characterization, and application in commercial detergents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 25: 101584. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101584
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95: 271-278. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X
- Eun-Sil, O., Jae-Hyeung, P., Deuk-Moon, C., 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: 201-208.
- Garcia-Carreno, F.L., Dimes, L.E., Haard, N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214: 65-69. DOI: 10.1006/abio.1993.1457
- Ghasemi, N., Imani, A., Noori, F., Shahrooz, R. 2020. Ontogeny of digestive tract of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) from hatching to juvenile stage: Digestive enzymes activity, stomach and proximal intestine. *Aquaculture* 519: 734751. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734751
- Ghorbani Vaghei, R., Mohseni, M., Alipour, A., Pajand, Z., Hosseinnia, E. 2022. An overview of sturgeon culture in concrete tanks, recirculating aquaculture system, cage and earthen pond. *Sturgeon Extension Journal* 5: 1-12.
- Gilannejad, N., Martínez-Rodríguez, G., Yúfera, M., 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., Bock, C.W. 2001. Two-metal binding motifs in protein crystal structures. *Structural Chemistry* 12: 323-341. DOI: 10.1023/A:1016636712985
- Green, M.M., Gladner, J.A., Cunningham Jr, L.W., Neurath, H., 1952. The effects of divalent cations on the enzymatic activities of trypsin and of  $\alpha$ -chymotrypsin. *Journal of the American Chemical Society* 74: 2122-2123. DOI: 10.1021/ja01128a523
- Iranian Fisheries Organization. 2024. Annual report. Ghorbanzade, R.A., Nazari, S. (editors). Available online: [http://www.fisheries.ir/site/vahed\\_with\\_shakhes\\_v.aspx?uc=18](http://www.fisheries.ir/site/vahed_with_shakhes_v.aspx?uc=18).
- Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Balti, R., Barkia, A., Nasri, M., 2009. New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: purification and characterization. *Food Chemistry* 116: 644-650. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.087
- Khangembam, B.K., Chakrabarti, R. 2015. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: purification, characterization and its potential application. *Food chemistry* 175: 386-394. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.140
- Khantaphant, S., Benjakul, S. 2010. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry* 120: 658-664. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.098
- Klomklao, S., Benjakul, S. 2018. Two trypsin isoforms from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) liver: Purification and physicochemical and biochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 107: 1864-1870. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.059
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200: 181-201. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00700-1
- Ktari, N., Khaled, H.B., Nasri, R., Jellouli, K., Ghorbel, S., Nasri, M. 2012. Trypsin from zebra blenny (*Salarias basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. *Food Chemistry* 130: 467-474. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.015
- Liu, Z.Y., Wang, Z., Xu, S.Y., Xu, L.N., 2007. Two trypsin isoforms from the intestine of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Comparative Physiology* 177B: 655-666. DOI: 10.1007/s00360-007-0163-6
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A.L., Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lu, B.J., Zhou, L.G., Cai, Q.F., Hara, K., Maeda, A., Su, W.J., Cao, M.J. 2008. Purification and characterization of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chemistry* 110: 352-360. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.02.010
- Nazdar, N., Imani, A., Noori, F., 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: 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: 43-65. DOI: 10.1111/raq.12463
- Ostaszewska, T., Kolman, R., Kamaszewski, M., Wiszniewski, G., Adamek, D., Duda, A. 2011. Morphological changes in digestive tract of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* during organogenesis.



- International Aquatic Research 3: 101-105.
- Patil, U., Baloch, K.A., Nile, S.H., Kim, J.T., Benjakul, S. 2023. Trypsin from pyloric caeca of Asian seabass: Purification, characterization, and its use in the hydrolysis of acid-soluble collagen. *Foods* 12: 2937. DOI: 10.3390/foods12152937
- Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L.H., Berg, A., Waagbø, R. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish physiology and Biochemistry* 32: 7-23. DOI: 10.1007/s10695-005-0630-5
- Rungruangsak-Torrissen, K.R.I.S.N.A. 2007. Digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on diets with krill meal as an alternative protein source. *Journal of Food Biochemistry* 31: 509-540. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2007.00127.x
- Senphan, T., Benjakul, S., Kishimura, H. 2015. Purification and Characterization of Trypsin from Hepatopancreas of Pacific White Shrimp. *Journal of Food Biochemistry* 39: 388-397. DOI: 10.1111/jfbc.12147
- Silva, J.F., Espósito, T.S., Marcuschi, M., Ribeiro, K., Cavalli, R.O., Oliveira, V., 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. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.019
- Simpson, B.K. 2000. Digestive proteinases from marine animals. In: *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*; Haard, N.F., Simpson, B.K. (Eds.). Marcel Dekker: New York, NY, USA, 531-540.
- Yúfera, M., Darias, M.J. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268: 53-63. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.050
- Zamani, A., 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: 962-969. DOI: 10.1002/jsfa.7172
- Zamani, A., Khajavi, M., Abedian Kenari, A., Haghbin Nazarpak, M., Solouk, A., Esmaeili, M., Gisbert, E. 2023. Physicochemical and biochemical properties of trypsin-like enzyme from two sturgeon species. *Animals* 13: 853. DOI: 10.3390/ani13050853
- Zamani, A., Rezaei, M., Madani, R., 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: 237-252. DOI: 10.1080/10498850.2012.712630