فصلنامه علمی ـ پژوهشی
دورهٔ ٤، شمارهٔ ٤، زمستان ١٣٩٤، صفحه ٥١- ٦٣

تأثیر برخی از عوامل شیمیایی بر فعالیت آنزیم‌های سرینوپروتئیناز تریپسین و کیموتریپسین در بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر (*Salmo trutta* caspius)

عباس زمانی

استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، همدان، ایران

دریافت : ١٣٩٤/٠٦/٠٥ پذیرش : ١٧/ ١٣٩٤/٠٩

نویسنده مسئول مقاله: a.zamani@malayeru.ac.ir

چکیده:

اثر یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها، عوامل اکسیدکننده و مهارکننده‌های آنزیمی بر فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر بررسی شد. یون‌های K^+ و Na^+ نسبت به نمونه شاهد اثر معناداری بر کاهش فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین نداشت($p>0/05$). یون‌های Ca^{2+}و Mg^{2+}سبب افزایش معنادار و یون‌های Mn^{2+}، Cu^{2+}، Ba^{2+}، Co^{2+}، Zn^{2+}، Fe^{2+} و Al^{3+} باعث کاهش معنادار فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین شدند($p<0/05$). سورفاکتانت‌های ساپونین و اسید تاروکولیک باعث افزایش معنادار در فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین نسبت به شاهد شدند($p<0/05$)، ولی سدیم کولات افزایش معناداری را بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین نشان نداد ($p>0/05$). عوامل اکسیدکننده پراکسیدهیدروژن و سدیم پربورات باعث کاهش معنادار فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین گردید ($p<0/05$). فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین نسبت به شاهد در حضور مهارکننده‌های SBTI، PMSF و پاراآمینوبنزآمیدین کاهش معناداری داشت ($p<0/05$). مهارکننده‌های TPCK، پپاستاتین A، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول بر روی فعالیت آنزیم تریپسین در مقایسه با شاهد کاهش معناداری نداشتند($p>0/05$). فعالیت آنزیم کیموتریپسین در حضور مهارکننده‌های TPCK، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول کاهش معناداراشت ($p<0/05$). فعالیت آنزیم تریپسین در حضور مهارکننده TLCKکاهشیمعنادار نشان داد ($p<0/05$). اثر مهارکننده‌های TLCK و پپاستاتین A روی فعالیت آنزیم کیموتریپسین در مقایسه با شاهد کاهش معناداری نداشت ($p>0/05$). نتایج نشان داد فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر تحت‌تأثیر عوامل شیمیایی ارزیابی شده در حداقل غلظت‌شان بود.

کلید واژگان: بچه ماهی نورس، آزاد دریای خزر، عوامل شیمیایی، کیموتریپسین

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]

مقدمه

زیست بوم‌های آبی همواره با مشکلات ناشی از آلاینده‌ها مواجه هستند که از منابع مختلفی مانند فاضلاب‌های صنعتی، پساب کشاورزی و فاضلاب شهری در بیشتر مواقع بدون هیچ تصفیه‌ای به آب‌ها رها می‌شوند. این آلاینده‌ها در تبادل اکسیژن لایه‌های سطحی آب مانع ایجاد کرده و باعث بروز اختلال در موجودات آبزی از جمله ماهیان می‌شوند (Shahsavani et al., 2003; Naji et al., 2009).از آنجایی‌که آب‌های سطحی و زیرزمینی یکی از مهم‌ترین منابع تأمین‌کننده آب مورد نیاز سیستم‌های پرورش ماهی هستند، از این‌رو آلودگی این منابع می‌تواند تهدیدی جدی برای آینده تکثیر و پرورش آبزیان در ایران باشد(Banaee et al., 2012). محیطزیست ماهیان وشرایط حاکم برآن نظیرفصل،مواد غذایی،آلودگی وصیدبرمقادیر متابولیت‌هاتأثیرمی‌گذارد(Heydari et al., 2013). امروزه با توجه به آلودگی آب‌ها به انواع ترکیبات شیمیایی و نقش آنها در آبزی‌پروری، بررسی تأثیر این ترکیبات بر شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک از جمله آنزیم‌های گوارشی مهم ارزیابی می‌شود، به‌طوری‌که متداول‌ترین عوامل بیوشیمیایی موردبررسی درمطالعات آبزیان،آنزیم‌هاوپروتئین‌های درگیردرمتابولیسمسمزدایی این ترکیبات هستند (Ghovati et al., 2012;Shokohi et al., 2013).از مهم‌ترین این ترکیبات می‌توان به یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها[1]، عوامل اکسیدکننده و همچنین مهارکننده‌های آنزیمی اشاره کرد.یون‌های فلزی می‌توانند به‌عنوان الکتروفیل یا نوکلئوفیل و از طریق پیوندهای کئوردینانس، آنزیم و سوبسترا را به یکدیگر نزدیک کنند، ولی ویژگی یون‌ها بیشتر بستگی به توانایی آنها در اصلاح ساختار آبی آنزیم‌ها دارد و می‌تواند محیط هیدراتاسیون آنزیم و فعالیت کاتالیزوری آن را تحت تأثیر قرار دهد(Glusker et al., 1999).اغلب پساب خروجی از صنایع،فاضلاب خانگی وآلودگی‌های نفتی،حاوی مخلوطی ازموادآلی،معدنی،کربوهیدرات،فلزهای سنگین وغیرهاست. ازمیان انواع منابع آلاینده،فلزهای سنگین به‌دلیل اثرسمی درمحیطوایجادپدیده تجمع زیستی درآبزیان مختلف ودرنتیجه تأثیرآنهادرزنجیره غذایی آبزیان،ازاهمیت ویژه‌ای برخورداراست(Faslebahar et al., 2009).سورفاکتانت‌ها یا عوامل فعال سطحی معمولاً ترکیباتی آلی و آمفیفیلیک[2] هستند که باعث کاهش کشش سطحی آب شده و می‌توانند ویژگی‌های ذاتی آنزیم‌ها مانند ساختار دوم و سوم را با اتصال به آنزیم تحت تأثیر قرار داده و در نتیجه بر توانایی کاتالیزوری آنها تأثیرگذار باشند (Rosen and Kunjappu., 2012).این ترکیبات بیشتر در شوینده‌ها استفاده می‌شوند که شامل شوینده‌های آنیونی، کاتیونی و خنثی هستند (Heydari et al., 2013). عوامل اکسیدکننده ترکیباتی هستند که می‌توانند با گروه‌های تیول در آنزیم‌ها واکنش نشان داده و با جذب الکترون باعث اکسیدشدن آنها شوند. بسیاری از عوامل اکسیدکننده قوی با تشکیل رادیکال‌های آزاد باعث اکسیدشدن آنزیم‌ها می‌شوند که این واکنش ابتدا با جذب اتم هیدروژن موجود در کربن آلفا صورت گرفته و منجر به دناتوره شدن پروتئین می‌شود (Rubingh, 1996;Finnegan et al., 2010).مهارکننده‌ها آنزیمی نیز مولکول‌هایی هستند که با آنزیم واکنش نشان داده و مانع عملکرد طبیعی آن می‌شوند و در محیط‌های آبی و در برخی مواد غذایی وجود دارند.در بین آنزیم‌های گوارشی بدن ماهیان، سرینوپروتئینازهای[3] روده به‌ویژه تریپسین و کیموتریپسین

1. Surfactant : surface active agent

2.Amphiphilic

1. Serinoproteinases

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]

از نقش مؤثرتری در گوارش ترکیبات پروتئینی و هضم آنها برخوردارند. در جایگاه فعال این آنزیم‌ها اسید آمینه سرین به همراه اسید آمینه هیستیدین و آسپارتیک نقش اصلی فعالیت کاتالیزوری را بر عهده دارد(Garcia-Carenno,1992). میزان فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند تحت تأثیر عوامل شیمیایی قرار گیرد و بر میزان گوارش پروتئین‌ها تأثیرگذار باشد.

ماهی آزاد دریای خزر(S. trutta caspius)از جمله ماهیان مهاجر به آب شیرین[1]است که برای تخم‌ریزی به رودخانه‌هایی مانند تنکابن و سردابه‌رود مهاجرت می‌کند(Zamani et al., 2009). امروزه دلایل متعددی از جمله افزایش میزان ترکیبات شیمیایی در محیط‌های آبی و استفاده از این منابع آبی در تکثیر و پرورش ماهی آزاد دریای خزر می‌تواند بر میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین و قابلیت گوارش مواد پروتئینی به‌ویژه در مراحل آغازین رشد این گونه مهم و نادر دریای خزر تأثیرگذار باشد. هدف از این مطالعه، بررسی نقش یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها، عوامل اکسیدکننده و مهارکننده‌های آنزیمی بر فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در بچه ماهیان نورس آزاد دریای خزراست که حساسیت بیشتری به این ترکیبات دارند.

مواد و روش‌ها

نمونه ماهی

در این تحقیق تعداد ٦٠عدد بچه ماهی سالم نورس آزاد دریای خزربا وزن ١٠٠ میلی‌گرم که کیسه زرده آنها کاملاً جذب شده بود، ازجاده دوهزار تنکابن تهیه شد. بچه ماهیان پس از تفریخ در تراف پرورش یافته و زمانی‌که از نظر فیزیولوژیک آماده دریافت غذا و هضم آن بودند،برای تهیه عصاره آنزیمی استفاده شدند. برای جداسازی بچه ماهیان سالم از بچه ماهیان معیوب از استریومیکروسکوپ استفاده گردید.

تهیه عصاره آنزیمی

برای تهیه عصاره آنزیمی، نمونه بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر در بافر٥٠ میلی‌مولار تریس- HCl، ٧/٥ pHحاوی١٠میلی‌مولار $CaCl_2$و ٠/٥مولار NaCl با نسبت ١ به ٥٠ به‌مدت ١ دقیقه با وجود یخ با دستگاه هموژنایرز، همگن شد وسوسپانسیون به‌دست آمده برای مدت ٤٥ دقیقه در دمای ٤°Cدر١٤٠٠٠gسانتریفیوژگردید. سپس محلول رویی به‌عنوان عصاره خام آنزیمی برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب گردید (Khantaphant and Benjakul, 2010).

سنجش فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین

برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین از روش Erlangerو همکاران(١٩٦١) استفاده گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین از سوبسترای BAPNA(Nα–benzoyl-DL-argenine-ρ-nitroanilide-HCL) و برای سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین از سوبسترای SAAPNA(N-Succinyl-AlaAla-Pro-phe-ρ-nitroanilide-HCL)استفاده گردید. جذب ρ-nitroanilide رها شده در طول موج ٤١٠ نانومتر قرائت شد.

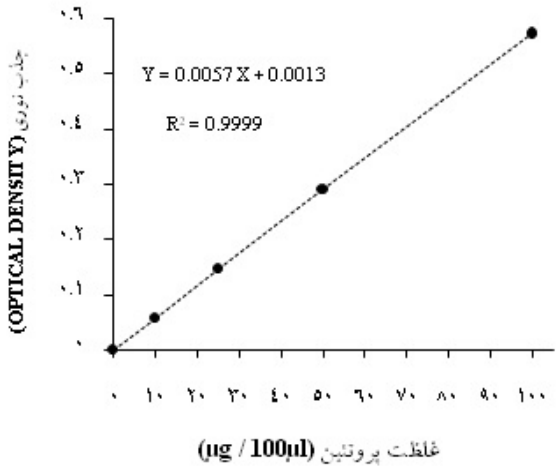
سنجش میزان پروتئین محلول

برای سنجش میزان پروتئین محلول از روش Lowry و همکاران (١٩٥١) استفاده گردید. در این روش از آلبومین سرم گاوی با غلظت١mg / ml به‌عنوان استاندارد استفاده شد (شکل ١).

2.Anadromous

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]



شکل ١ منحنی استاندارد BSA با غلظت ١ mg/ml. [محور X: غلظت پروتئین(µg / 100µl)؛محور Y: جذب نوری (Optical Density)]

اثر یون‌های فلزی

اثر یون‌های فلزی کلرید سدیم(NaCl)، کلرید پتاسیم(KCl)، کلرید کلسیم($CaCl_2$)، کلرید منیزیم($MgCl_2$)، کلرید مس ($CuCl_2$)، استات روی($Zn(CH3COOH)_2$)، کلرید منگنز($MnCl_2$)، کلرید باریم($BaCl_2$)، کلرید کبالت($CoCl_2$)، سولفات آهن ($FeSO_4$) و سولفات آلومینیوم($Al_2(SO_4)_3$)در غلظت۲mMبر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین تعیین شد(Lu et al., 2008; Jellouli et al., 2009) . برای این منظور، ابتدا نمونه آنزیمی با یون‌های فلزی با غلظت مذکور برای مدت۳۰دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس مخلوط حاصل از انکوباسیون با محلول سوبسترا- بافر (١میلی‌مولار BAPNA در بافر٥٠ میلی‌مولار تریس- HCl، ٨ pH٢٠ میلی‌مولار$CaCl_2$ برای تریپسین و ٠/١ میلی‌مولار SAAPNA در بافر٥٠ میلی‌مولار تریس- HCl، ٨ pH٢٠ میلی‌مولار$CaCl_2$ برای کیموتریپسین) مخلوط شده و برای مدت٢٠ دقیقه در دمای ٣٧°C قرارگرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ٤١٠nm انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد یون فلزی بود. سپس فعالیت نسبی آنزیم تریپسین و کیموتریسپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها به فعالیت نمونه شاهد براساس فرمول زیر به‌صورت درصدگزارش گردید:

$$\text{فعالیت نسبی}(\%) = \frac{\text{فعالیت اختصاصی یونهای فلزی در حضوز آنزیم}}{\text{فعالیت اختصاصی درآنزیم نمونه شاهد}} \times ١٠٠$$

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]

اثر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده

برای بررسی اثر این ترکیبات، ۲۰ میکرولیتر از نمونه آنزیمی با ۲۰ میکرولیتر از سورفاکتانت‌های ساپونین[1]، اسید تاروکولیک[2] و سدیم کولات[3] تا حصول غلظت نهایی ۱ درصد ترکیب شد. همچنین عوامل اکسیدکننده شامل سدیم پربورات[4] با غلظت نهایی ۱ درصد و پراکسید هیدروژن[5] با غلظت نهایی ۱۵ درصد نیز با نمونه آنزیمی ترکیب شدند. سپس عمل انکوباسیون برای مدت ۱ساعت در دمای ۴۰°C انجام شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از این ترکیب انکوبه شده را برداشته و با محلول سوبسترا- بافر (۱میلی مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس- HCl، ۸ pH ۲۰ میلی مولار $CaCl_2$ برای تریپسین و ۰/۱ میلی مولار SAAPNA در بافر ۵۰ میلی مولار تریس- HCl، ۸ pH ۲۰ میلی مولار $CaCl_2$ برای کیموتریپسین)مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰nm انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد فاقد این ترکیبات بود و از آب مقطر استفاده گردید (Jellouli et al., 2009; Erlanger et al., 1961). سپس فعالیت نسبی آنزیم تریپسین و کیموتریسپسین از طریق نسبت فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمول زیر بصورت درصدگزارش گردید:

$$\text{فعالیت نسبی (\%)} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی درآنزیم حضور سورفاکتانت ها و عوامل اکسیدکننده}}{\text{فعالیت آنزیماختصاصی در نمونه شاهد}} \times ۱۰۰$$

اثر مهارکننده‌های آنزیمی

اثر مهارکننده‌های SBTI[6] (۰/۰۵ mM) و TLCK[7] (۵ mM) به‌عنوان بازدارنده‌های اختصاصی تریپسین، PMSF[8] (۱۰mM) و پاراآمینوبنزآمیدین[9] (۵mM) به‌عنوان مهارکننده‌های پروتئازهای سرین، TPCK[10] (۵mM) به‌عنوان مهارکننده اختصاصی کیموتریپسین، پپاستاتین A[11] (۰/۰۱mM) به‌عنوان مهارکننده اختصاصی پروتئازهای آسپارتیک، یدواستیک اسید[12] (۱mM) به‌عنوان مهارکننده پروتئازهای سیستئین، EDTA[13] (۲mM) به‌عنوان مهارکننده متالوپروتئازها و بتامرکپتواتانول[14] (۵ mM) به‌عنوان یک عامل احیاکننده پیوند دی‌سولفید (S-S) بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین ارزیابی شد. برای این منظور، ابتدا نمونه آنزیمی با مهارکننده‌ها برای ۱۵ دقیقه دردمای اتاق انکوبه گردید. سپس مخلوط به‌دست آمده از انکوباسیون با محلول سوبسترا - بافر (۱میلی‌مولار BAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس- HCl، ۸ pH ۲۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ برای تریپسین و ۰/۱ میلی‌مولار SAAPNA در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس- HCl، ۸ pH ۲۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ برای کیموتریپسین) مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار گرفت. سپس قرائت نوری در طول موج ۴۱۰nm انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود فقط نمونه شاهد

1.Saponin
2.Taurocholic acid
3.Sodium cholate
4.Sodium perborate
5.Hydrogen peroxide

6.Soybean trypsin inhibitor
7.N-tosyl-L-Lysine Chloromethyl Keton
8.Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride
9.ρ-Aminobenzamidine
10. N-tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone
1.Pepstatin A
2.Iodoacetic acid
13.Ethylenediaminetetraacetic acid
4.ß, mercaptoethanol

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]

فاقد مهارکننده بـود (Khantaphant and Benjakul, 2010; Erlanger et al., 1961). سـپس فعالیـت نسـبی آنـزیم تریپسـین و کیموتریسپسـین از طریـق نسـبت فعالیـت اختصاصی آنزیم‌ها به فعالیت نمونه شاهد براساس فرمـول زیر به‌صورت درصدگزارش شد:

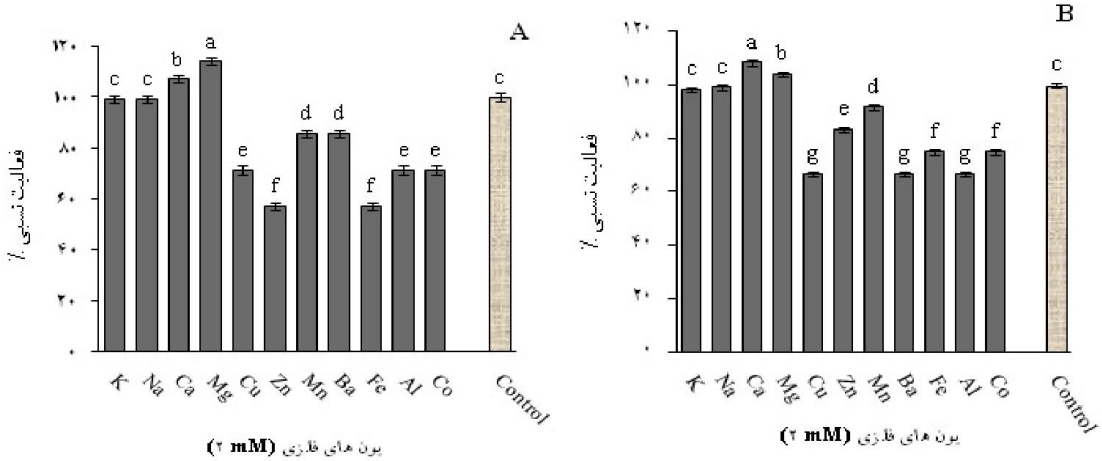
$$\text{فعالیت نسبی}(\%) = \frac{\text{فعالیت اختصاصی درآنزیم نمونه حاوی نمونه مهارکننده}}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم در نمونه شاهد}} \times ۱۰۰$$

آنالیز آماری

در این تحقیق، برای بررسی طبیعی بودن داده‌هـا از آزمـون کولموگروف- اسمیرنوف استفاده شد وبـرای بررسـی اثـر یون‌هـای فلـزی، سـورفاکتانت‌هـا، عوامـل اکسـیدکننده و مهارکننـده‌هـای آنزیمـی بـر فعالیـت آنـزیم تریپسـین و کیموتریپسین بچه ماهی نورس آزاد دریای خـزراز آزمـون تجزیـه واریـانس یـک طرفـه (ANOVA) تحـت نرم‌افزارSPSS17استفاده گردید و برای تعیین معنادار بـودن اختلاف میانگین‌ها بین نمونه شـاهد بـا یـون‌هـای فلـزی، سورفاکتانت‌ها، عوامل اکسیدکننده و مهارکننده‌های آنزیمی ازآزمـون دانکـن در سـطح ۵درصـد اسـتفاده شـد. تمـام ارزیابی‌ها نیزدر ۳ تکرار انجام گرفت.

نتایج

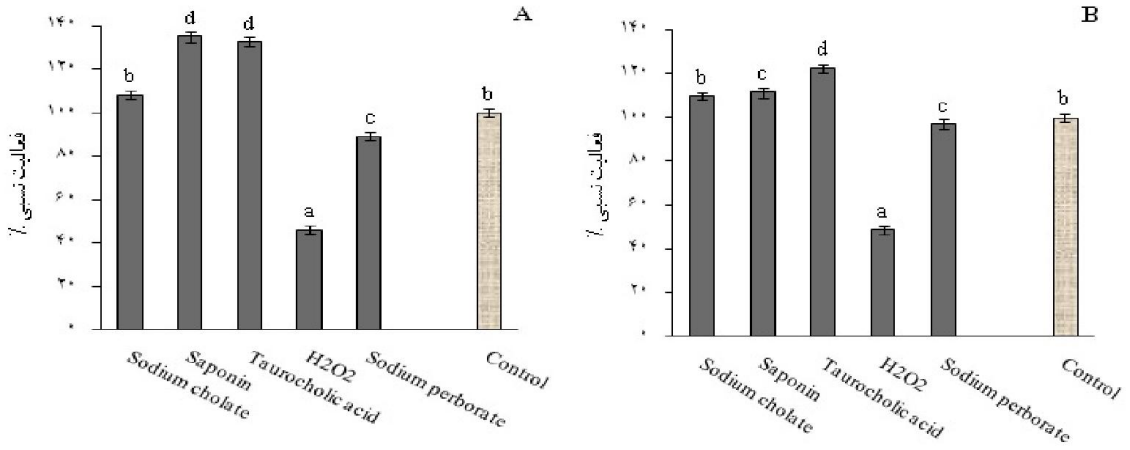
نتایج حاصل از بررسی اثر یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌هـا، عوامل اکسیدکننده و مهارکننـده‌هـای آنزیمـی بـر فعالیـت آنزیمتریپسین و کیموتریپسین بچه ماهی نورسـآزاد دریـای خزر در شکل‌های۲ تا ٤ آمده است.



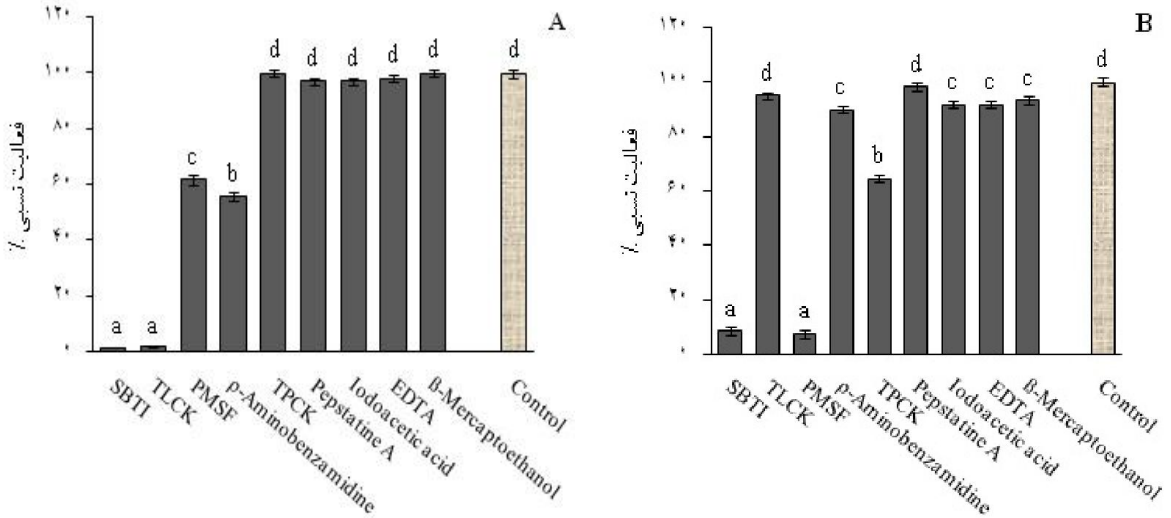
شکل ۲ اثر یون‌های فلزی با غلظت ۲ mM بر فعالیتآنزیم تریپسین(A) و کیموتریپسین(B) بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر (S. trutta caspius). حروف کوچک غیرمشترک بیانگر اختلاف معنادار در فعالیت نسبی آنزیم است(α = ۰/۰۵، n = ۳، Mn ± SD).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]



شکل ۳ اثر سورفاکتانت‌ها (سدیم کولات، ساپونین و اسید تاروکولیک با غلظت ۱ درصد) و عوامل اکسید کننده (پراکسید هیدروژن با غلظت ۱۵ درصد و سدیم پربورات با غلظت ۱ درصد) بر فعالیتآنزیم تریپسین(A) و کیموتریپسین(B) بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر (S. trutta caspius). حروف کوچک غیرمشترک بیانگر اختلاف معنادار در فعالیت نسبی آنزیم است(α= ۰/۰۵، n = ۳، Mn ± SD).



شکل ٤ اثر مهارکننده‌های آنزیمی بر فعالیتآنزیم تریپسین(A) و کیموتریپسین (B) بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر (S. trutta caspius). حروف کوچک غیرمشترک بیانگر اختلاف معنادار در فعالیت نسبی آنزیم است(α = ۰/۰۵، n = ۳، Mn ± SD).

اثـر یـون‌هـای فلـزی بـر فعالیـت آنـزیم تریپسـین و کیموتریپسین بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر در شکل ۲ (A و B) نشان داده شده است. اثر یون‌هـای K^+ و Na^+ بـر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین اختلاف معناداری را با نمونـه شـاهد نشـان ندادنـد ($p>۰/۰۵$). یـون‌هـای Ca^{2+} و Mg^{2+}باعث افزایش معناداری در فعالیت آنزیم تریپسین و

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]

کیموتریپسین نسبت به نمونه شاهد شدند (p<۰/۰۵). فعالیت آنزیم تریپسین در حضور Mg^{2+}به‌طور معناداری بیشتر از Ca^{2+} بود (p<۰/۰۵). درحالی‌که فعالیت آنزیم کیموتریپسین در حضور Ca^{2+}به‌طور معناداری بیشتر از Mg^{2+} بود (p<۰/۰۵). یون‌های Mn^{2+}، Cu^{2+}، Ba^{2+}، Co^{2+}، Fe^{2+}، Zn^{2+}و Al^{3+} باعث کاهش معناداری در فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین نسبت به نمونه شاهد شدند (p<۰/۰۵) به‌طوری‌که بین یون‌های Cu^{2+}، Co^{2+} و Al^{3+} و بین Zn^{2+} و Fe^{2+} و یون‌های Mn^{2+} و Ba^{2+}اختلاف معناداری در فعالیت آنزیم تریپسین مشاهده نشد (p>۰/۰۵). فعالیت آنزیم کیموتریپسین در حضور یون‌های Cu^{2+}، Ba^{2+}و Al^{3+} و بین یون‌های Fe^{2+}و Co^{2+} اختلاف معناداری مشاهده نگردید (p>۰/۰۵).

در شکل۳ اثر سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسیدکننده بر فعالیت آنزیم تریپسین (A) و کیموتریپسین (B) نشان داده شده است. سورفاکتانت‌های ساپونین و اسید تاروکولیک باعث افزایش معناداری در فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین نسبت به نمونه شاهد شدند (p<۰/۰۵) ولی بین ساپونین و اسید تاروکولیک اختلاف معناداری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). سدیم کولاتباعث افزایش فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین در مقایسه با نمونه شاهد گردید ولی اختلاف معناداری را نشان نداد (p>۰/۰۵). عوامل اکسیدکننده پراکسید هیدروژن و سدیم پربورات باعث کاهش معناداری در فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین نسبت به نمونه شاهد شدند (p<۰/۰۵).

اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین در شکل ٤ (A وB) نشان داده شده است. نتایج نشان داد فعالیتآنزیم تریپسین نسبت به نمونه شاهد در حضور مهارکننده‌هایSBTI، TLCK، PMSF و پارا آمینوبنزآمیدین کاهش معناداری دارد (p<۰/۰۵). به‌طوری‌که بین SBTI وTLCKاختلاف معناداری مشاهده نگردیدولی این مهارکننده‌ها نسبت بهPMSF و پارا آمینوبنزآمیدین کاهش معناداری را نشان دادند (p>۰/۰۵).مهارکننده‌های TPCK، پپاستاتینA، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول بر روی فعالیت آنزیم تریپسین در مقایسه با نمونه شاهد کاهش معناداری را نشان ندادند (p>۰/۰۵).

فعالیتآنزیم کیموتریپسین در مقایسه با نمونه شاهد در حضور مهارکننده‌هایSBTI، PMSF، پارا آمینوبنزآمیدین، TPCK، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول کاهش معناداری را نشان داد (p<۰/۰۵). به‌طوری‌که بین SBTI وPMSF و پارا آمینوبنزآمیدین، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول اختلاف معناداری مشاهده نشد (p>۰/۰۵).مهارکننده‌های TLCK و پپاستاتینAبر روی فعالیت آنزیم کیموتریپسین در مقایسه با نمونه شاهد کاهش معناداری را نشان ندادند (p>۰/۰۵).

بحث

مطالعه عوامل شیمیایی بر روی فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر نشان داد که این عوامل می‌توانند بر روی فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه تأثیرگذار باشند. یون‌های فلزی ترکیباتی هستند که توانایی تغییر جریان الکترون در یک سوبسترا یا آنزیم را داشته و به‌طور مؤثری واکنش کاتالیز شده توسط آنزیم را کنترل می‌کنند. یون‌های فلزی با اتصال به گروه‌های کربونیل و آمین زنجیره اصلی یا از طریق اتصال به زنجیره جانبی اسید آمینه به‌ویژه گروهکربوکسیلات اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک و حلقه اتم نیتروژن هیستیدین می‌توانند در انجام فعالیت کاتالیزوری آنزیم تأثیرگذار باشند. اسید آمینه‌های تریپتوفان، سیستئین، متیونین، سرین،

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]

ترئونین، تیروزین، آسپاراژین و گلوتامیناز دیگر زنجیره‌های جانبی آنزیم برای اتصال یون‌های فلزی محسوب می‌شوند. محیط الکترواستاتیک در جایگاه فعال آنزیم یک عامل عمده برای هدایت سوبسترا به جایگاه اتصال در جهت صحیح خود است که یون‌های فلزی می‌توانند در این روند شرکت کرده و در نتیجه به کنترل عملکردآنزیم کمک کنند(Glusker et al., 1999).

یون‌های فلزیکلسیم و منیزیم باعث افزایش فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین در بچه ماهی نورس آزاد دریای خزرشدند. یافته‌های مربوط به اثر کلسیم و منیزیم بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین با مطالعاتانجام شده در سه گونه از تن ماهیانشامل تن زردباله (Thunnus albacores)، هوورمسقطی(Katsuwonus pelamis)و بلوفین شمالی (Thunnus)(tonggol(Klomklaoet al., 2004)، ساردین(Sardinops melanostictus) و گرینلینگ (Pleuroprammus azonus)(Kishimura et al., 2006)، ماندارین(Siniperca chuatsi)(Lu et al., 2008)،زبرا بلنی(Salaria basilisca)(Ktari et al., 2012)، ماهی مرکب(Sepia officinalis)(Balti et al., 2012) و کیلکای معمولی (Clupeonella cultriventriscaspia)(Zamani et al., 2014) همخوانی دارد. دربارهٔ اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین باید گفت که آنها می‌توانند به‌عنوان کوفاکتور در افزایش فعالیت آنزیمی ایفای نقش کنند و یا در برخی موارد باعث کاهش فعالیت آنزیم شوند. در این بین،کاتیون‌های دو ظرفیتی نقش مؤثرتری بر فعالیت آنزیم تریپسین دارند، به‌طوری‌که یون‌های کلسیم و منیزیمباعث افزایش فعالیت آنهامی‌شوند و برخی دیگر مانند جیوه، مس، نقره وروی از فعالیت آنزیم جلوگیری می‌کنند (Green and Neurath, 1953).فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین تحت تأثیر یون‌های مس، روی، منگنز، باریم، کبالت، آهن و آلومینیوم کاهش می‌یابد. چنین نتایجی از سوی Luو همکاران(۲۰۰۸)در ماهی ماندارین(S. chuatsi)، Ali و همکاران (۲۰۰۹) در شانک مخطط (Lithognathus mormyrus)، Balti و همکاران (۲۰۱۲) در ماهی مرکب (S. officinalis)، Ktari و همکاران (۲۰۱۲) در زبرا بلنی (S.basilisca) و Zamani و همکاران (۲۰۱٤) در کیلکای معمولی (C.cultriventris caspia)نیز گزارش شد.

سورفاکتانت‌ها ترکیباتی هستند که از طریق اتصال مستقیم با آنزیم‌ها یا تغییر محیط عملکرد آنها، بر توانایی کاتالیزوری آنزیم‌ها تأثیرگذاشته به نحوی که در غلظت‌های بالا باعث دناتوره شدن آنزیم‌ها می‌شوند. ولی در غلظت‌های پایین تغییری در ساختار آنزیم ایجاد نکرده و حتی می‌توانند باعث افزایش جزئی در فعالیت آن نیز شوند. احتمالاً این امر می‌تواند به‌دلیل تجمع این ترکیبات در مکان‌هایی از آنزیم که حاوی انرژی بالایی هستند، رخ دهد. ولی در غلظت‌های بالای سورفاکتانت به‌دلیل دناتوره شدن ساختار آنزیم‌ها افت قابل توجهی در فعالیت آنها مشاهده می‌شود(Rubingh, 1996). تأثیر سورفاکتانت‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین در بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر با نتایج به‌دست آمده در ماهیان تریگر خاکستری (Balistes capticus)(Jellouli et al., 2009)،تامباکویی (Colossoma macropomum)(Esposito et al., 2009)، زبرا بلنی(S.basilisca) (Ktari et al., 2012) و کیلکای معمولی (C.cultriventris caspia)(Zamani et al., 2014) همخوانی دارد.نتایج این مطالعه نشان دادکه آنزیم تریپسین و کیموتریسپین در حضور عوامل اکسیدکننده (سدیم پربورات و پراکسید هیدروژن) ناپایدار است و از فعالیت آن کاسته می‌شود. چنین نتایجی در ماهیان تریگر خاکستری (B.capticus)(Jellouli et al.,

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]

(C.macropomum)(Esposito et al., 2009)،تامباکویی (S.basilisca) (Ktari et al., 2012)،زبرا بلنی و کیلکای معمولی (C.cultriventris caspia)(Zamani et al., 2014) نیز گزارش شد. تحقیقات نشان می‌دهندکه بسیاری از پروتئازها در حضور عوامل اکسیدکننده مانند پراکسید هیدروژن ناپایدار هستند(Jellouli et al., 2009). عوامل اکسیدکننده ترکیباتی هستند که می‌توانند با گروه‌های تیول در آنزیم‌ها و پروتئین‌ها واکنش بسیار قوی داشته باشند. بسیاری از عوامل اکسیدکننده می‌توانند با تشکیل رادیکال‌های آزاد باعث اکسیدشدن پروتئین شوند که این امر در ابتدا با جذب اتم هیدروژن موجود در کربن آلفا پروتئین صورت می‌گیرد و سرانجام منجر به دناتوره شدن آن می‌شود(Finnegan et al., 2010).

مهارکننده‌های آنزیمی ترکیباتی شبه سوبسترا بوده که می‌توانند با جایگاه فعال آنزیم واکنش داده و از اتصال سوبسترای حقیقی با آن جلوگیری کنندو باعث غیرفعال شدن آنزیم شوند (Garcia-Carenno, 1992; Zamani et al., 2014). مهارکننده‌هادرگونه‌های مختلف ماهیان اثرهای بازدارندگی متفاوتی دارندکه می‌تواندبامحیطزندگی ومسائل ژنتیکی ماهیان درارتباط باشد (Lu et al., 2008).مهارکننده‌های اختصاصی آنزیم تریپسین شامل SBTI و TLCK و مهارکننده اختصاصی آنزیم کیموتریپسین شامل TPCK و همچنین مهارکننده‌های پروتئاز سرین شامل PMSF و پاراآمینوبنزآمیدین و سایر مهارکننده‌ها شامل پپاستاتینA، یدواستیک اسید، EDTA و بتامرکپتواتانول دارای اثر مهارکنندگی روی آنزیم تریپسین و کیموتریپسین در بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر بودند. نتیجه این مطالعه با مطالعات انجام شده درماهیان ساردین مونتری(Sardinops sagax caerulea)(Castillo-Yanez et al., 2005)، آزاد چینوک (Oncorhynchus tshawytscha)(Kurtovic et al., 2006)، ساردین (Sardina pilchardus)(Bougatef et al., 2007)، سرخو (Lutjanus vitta)(Khantaphant and Benjakul, 2010)، تامباکویی (C.macropomum)(Marcuschi et al., 2010)،موجارا نقره‌ای (Diapterus rhombeus)(Silva et al., 2011)، زبرا بلنی (S.basilisca) (Krati et al., 2012)، ماهی مرکب(S. officinalis)(Balti et al., 2012) و کیلکای معمولی (C.cultriventris caspia)(Zamani et al., 2014)همخوانی داشت.با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان کرد که فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر تحت تأثیر یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها، عوامل اکسیدکننده و مهارکننده‌های آنزیمی در حداقل غلظت‌شان بوده و بنابراین توجه به مسائل زیست محیطی و کنترل آلودگی می‌تواند در رشد بهینه بچه ماهیان مؤثر باشد.

منابع

Ali, N.E.H., 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 Agriculture and Food Chemistry. 57(22): 10943–10950.

Balti,R., Bougherra,F., Bougatef,A., Hayet,B.K, Nedjar-Arroume,N ., Dhulster,P., Guillochon ,D. and Nasri, M., 2012. Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (Sepia officinalis) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates: Purification and biochemical characterization. Food Chemistry.130 (3) : 475–484.

Banaee, M., Mirvaghefi, A. R., Sureda. A., Rafiee, G. R. and Ahmadi, K., 2012. Blood Biochemical and Liver Histopathological Changes in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Following Exposure to Sub-Lethal Concentrations of Diazinon.Journal of Natural Environment, Iranian Journal of Natural Resources. 65(3): 297-313.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]

exposed to the anionic detergents. Journal of oceanography.4(14): 69-76.

Jellouli,K., Bougatef, A., Daassi, D., Balti, R., Barkia, A. and Nasri, M., 2009. New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (Balistes capticus) with high activity at low temperature: Purification and characterization. Food Chemistry. 116(3): 644-650.

Khantaphant, S. and Benjakul, S., 2010.Purification and characterization of trypsin from the pyloric Caeca of brownstripe red snapper (Lutjanus vitta).Food Chemistry. 120(3): 658-664.

Kishimura, H., Hayashi, K., Miyashita, Y. and Nonami, Y., 2006.Characterization of trypsins from the viscera of true sardine (Sardinops melanostictus) and the pyloric caeca of arabesque greenling (Pleuroprammus azonus).Food Chemistry. 97(1): 65-70.

Klomklao, S., Benjakul, S., and Visessanguan, W., 2004. Comparative studies on proteolytic activities of splenic extract from three tuna species commonly used in Thailand. Journal of Food Biochemistry.28(5): 355–372.

Ktari, N., Ben Khaled, H., Nasri, R., Jellouli, K., Ghorbel, S., and Nasri, M., 2012. Trypsin from zebra blenny (Salaria basilisca) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. Food Chemistry. 130(3): 467–474.

Kurtovic, I., Marshall, S.N., and Simpson, B.K., 2006. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha). Comparative Biochemistry and Physiology B. 143(4): 432–440.

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

Lu, B.J., Zhou, L.G., Cai, Q.F., Hara, K., Maeda, A., Su, W.J., and Cao MJ., 2008. Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of Mandarin fish (Siniperca chuatsi). Food Chemistry. 110(2): 352–360.

Marcuschi, M., Espósito, T.S., Machado, M.F.M., Hirata, I.Y., Machado, M.F.M., Silva, M.V., Carvalho, L.B., Oliveira, V., and Bezerra, R.S., 2010. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish

Bougatef, A., Souissi, N., Fakhfakh, N., Ellouz-Triki, Y., and Nasri, M., 2007. Purification and characterisation of trypsin from the viscera of sardine (Sardina pilchardus). Food Chemistry. 102(1): 343–350.

Castillo-Yanez, F., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreno, F. and Toro, M., 2005.Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine, Sardinops sagax caerulea. Comparative and Biochemistry physiologyB. 140(1): 91-98.

Erlanger, B., Kokowsky, N. and Cohen,W., 1961.The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin.Archives of 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(1): 125–130.

Faslebahar, S., Emtiazjoo M., Monavari M., Eghtesadi P. and Shahabi B., 2009.Superoxide Dismutase Enzyme, As A Biomarker Of Heavy Metals (Ni, Co, V) In Barnacle In Bahragan Area. Biological Sciences (Danesh Zisti Iran), 4(2): 9-18.

Finnegan, M., Linley, E., Denyer, S.P., McDonnell, G., Simons, C. and Maillard, J.Y., 2010. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. Journal of Antimicrobial Chemother. 65(10): 2108–2115

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

Ghovati, N., Mohammadi, S. and Mohammadi, V., 2012.Assess changes in hardness and alkalinity on the toxicity of zinc poisoning in common carp (Cyprinus carpio). Journal of Wetland Ecobiology, 2(8): 21-28.

Glusker, J.P., Katz, A.K. and Bock, C.W.,1999. Metal ions in biological systems.The Rigaku Journal.16 (2): 8-17.

Green, N.M. and Neurath, H., 1953. The effects of divalent cations on trypsin.The Journal of Biological Chemistry .204(1): 379-390.

Heydari, B., Golchinrad, A., Haghi, N. and Yavari, L., 2013. Study on physiological responses of silver carp (Hypophthalmichthys molitrix)

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]

responses of the Silver Carp (Hypophthalmicthys molitrix) under acute exposure to copper nitare.Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics. 2(2): 143-152.

Silva, J.F., Esposito, T.S., Marcuschi, M., Ribeiro, K., Cavalli, R.O., Oliveira, V., and Bezerra R.S., 2011. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (Diapterus rhombeus). Food Chemistry. 129(3): 777–782.

Zamani, A., Hajimoradloo, A., Madani, R. and Farhangi, M., 2009. Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of the endangered Caspian brown trout (Salmo caspius).**Journal of Fish Biology**.75(4): 932–937.

Zamani A, Rezaei M, Madani R and Habibi Rezaie M., 2014. Trypsin Enzyme from Viscera of Common Kilka (Clupeonella cultriventriscaspia): Purification, Characterization, and Its Compatibility with Oxidants and Surfactants. Journal of Aquatic Food Product Technology. 23: 237–252.

tambaqui (Colossoma macropomum). Biochemical and Biophysical Research Communications. 396(3): 667–673.

Naji, T., Khara, H., Rostami, M. and Nasiri Parman, E., 2009.Effect of ammonia toxicity on the liver of common carp (Cyprinus carpio).Environmental Sciences and Technology.11: 131-148.

Rosen, M.J. and Kunjappu, J.T., 2012. Surfactants and Interfacial Phenomena (4th ed.). Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons.576 p.

Rubingh, D.N.,1996. The influence of surfactants on enzyme activity.Current Opinion in Colloids & Interface Science.1(5): 598-603.

Shahsavani, D., Mehri, M., and Nazari, K., 2003.Assessment of anionic detergent (shampoo) effect on hematological parameters of Carassius auratus.Journal of Pajoohesh & Sazandegi - Animal and Aquaculture. 61: 99-103.

Shokohi, S., Abdali, S., Yousefi Jourdehi, A. and H. Negarestan., 2013.Investigation on biochemical

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 4, No. 4, Winter 2016

The effect of some chemical factors on serinoproteinases activity of trypsin and chymotrypsin in Caspian brown trout (*Salmo trutta* caspius) fry

Abbas Zamani

Assistant Professor, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources and Environmental, Malayer University, Malayer, Iran

Received : 27.01.2015 Accepted :08.12.2015

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

Abstract:

The effect of metal ions, surfactant, oxidizing agents and enzyme inhibitors was considered on trypsin and chymotrypsin activity of the Caspian brown trout fry. The results showed K^+ and Na^+ didn't significanly decrease trypsin and chymotrypsin activity ($p>0.05$). Ca^{2+} and Mg^{2+} significantly increased trypsin and chymotrypsin activity ($p<0.05$). Mn^{2+},Cu^{2+},Ba^{2+},Co^{2+},Zn^{2+},Fe^{2+} and Al^{3+} significantly decreased the activity of trypsin and chymotrypsin ($p<0.05$). Saponin and taurocholic acid significantly increased trypsin and chymotrypsin activity. Sodium cholate significantly increased chymotrypsin activity ($p<0.05$), but not the trypsin activity ($p>0.05$). Oxidizing agents, including hydrogen peroxide and sodium perborate, significantly decreased trypsin ($p<0.05$). Trypsin and chymotrypsin activity significantly decreased in the presence of SBTI, PMSF and ρ-Aminobenzamidine inhibitors ($p>0.05$). The inhibitors such as TPCK, pepstatinA, iodoacetic acid, EDTA and ß-mercaptoethanol did not significantly decrease the trypsin activity ($p>0.05$), but they significantly decreased chymotrypsin activity ($p<0.05$). Trypsin activity in the presence of TLCK showed a significant decrease ($p<0.05$), but TLCK and pepstatin A had no significant effect on chymotrypsin activity ($p>0.05$).

Keywords: Fry, Caspian brown trout, Chemical factors, Chymotrypsin

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2023-04-02]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.1.5]