

## مقایسه برخی از خصوصیات کینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) با تریپسین تجاری (Porcine)

عباس زمانی؛ گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی و محیطزیست دانشگاه ملایر، همدان  
مسعود رضائی؛ گروه فرآوری آبزیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، مازندران، نور  
رسول مدنی؛ گروه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی، البرز، کرج

### چکیده

در این تحقیق برخی از خصوصیات کینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم تریپسین کیلکای معمولی با تریپسین تجاری Porcine بررسی شد. نتایج نشان داد که دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم تریپسین کیلکای معمولی و تجاری حاصل از خوک (Porcine) به ترتیب ۶۰°C و ۸ بود. پایداری دمایی و pH فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی به ترتیب ۴۵°C و ۷-۱۰ و ۵۰°C و ۴-۱۱ بود. یون‌های فلزی  $\text{CaCl}_2$  و  $\text{MgCl}_2$  به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی را نسبت به خوک افزایش دادند ( $P < 0.05$ )، در حالی که  $\text{NaCl}$  و  $\text{KCl}$  در فعالیت آنزیم تریپسین کیلکای معمولی بی‌تأثیر بودند ( $P > 0.05$ )، اما در خوک اثر کاهشی معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0.05$ ).  $\text{MnCl}_2$  به طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی شد ( $P < 0.05$ )، در حالی که در خوک اثر کاهشی معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). مقایسه اثر بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین نشان داد که به استثنای p-aminobenzamidide، بازدارنده‌های TLCK، SBTI و PMSF تأثیر معنی‌داری در فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی و خوک نداشتند ( $P > 0.05$ )، در حالی که p-aminobenzamidide فعالیت آنزیم تریپسین در خوک را به طور معنی‌داری نسبت به کیلکای معمولی کاهش داد ( $P < 0.05$ ).  $V_{\max}$  آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی به طور معنی‌داری بالاتر ( $P < 0.05$ ) و  $k_m$  آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی به طور معنی‌داری کوچک‌تر از خوک بود ( $P < 0.05$ ). نتایج بررسی‌ها نشان داد که آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی نسبت به خوک از کارایی بالاتری برخوردار است و می‌تواند در آینده به منزله ماده افزودنی در صنایع مرتبط و تحقیقات بیوتکنولوژی به کار رود.

واژگان کلیدی: آنزیم تریپسین، تریپسین تجاری خوک، کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*).

## ۱. مقدمه

محیط‌های آبی به دلیل دارا بودن گونه‌های متعدد آبی ظرفیت بالایی برای کشف و تولید فرآورده‌های زیستی مختلف مانند آنزیم‌ها دارند. در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای روی آنزیم‌های موجود در گونه‌های کم‌مصرف آبی و ضایعات ناشی از فرآوری دیگر آبیان انجام گرفته و باعث پیدایش حوزه جدیدی برای استفاده از آنها در صنایع مختلف شده است (Shahidi and Kamil, 2001; Lu et al., 2008; Sila et al., 2012). با توجه به شرایط محیطی مختلف آبیان و سازگاری آنها با محیط اطراف خود همراه با تنوع ژنتیکی، شرایط مساعدی برای فعالیت آنزیم‌ها در آبیان در مقایسه با پستانداران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها فراهم شده است که می‌توان به داشتن فعالیت بالا در دما و pHهای مختلف اشاره کرد (Klomklao, 2008). امعا و احشای ماهی به ویژه ضمام پیلوریک منبع غنی از آنزیم‌های گوارشی به‌ویژه پروتئازهاست (Khanthaphant and Benjakul, 2010) که ترشحات غده پانکراس مانند آنزیم‌های پروتئاز وارد آن می‌شود (Deguara et al., 2003). پروتئازها نقش مهمی در رشد و بقای موجودات زنده از جمله شکست پیوندهای پپتیدی و هیدرولیز آنها ایفا می‌کنند. از مهم‌ترین آنزیم‌های پروتئولیتیک در ضمام پیلوریک آنزیم تریپسین است. این آنزیم متعلق به خانواده پروتئازهای سرین است که پیوند پپتیدی را از سمت گروه کربوکسیل، جایی که اسید آمینه لیزین و آرژنین قرار دارند، می‌شکند و در فعال‌سازی زیموژن‌های آنزیم‌های پانکراتیک نقش مهمی دارد (Simpson, 2000; Ktari et al., 2012). از مهم‌ترین کاربردهای آنزیم تریپسین می‌توان به استفاده از آن برای تولید پنیر، تولید پروتئین هیدرولیز شده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تولید سس سویا، ترد و خوش‌طعم کردن گوشت، کشت سلول و تولید پروتئین‌های نوترکیب، تشخیص دیابت و درمان آن، مواد شوینده، صنایع چرم‌سازی، هیدرولیز کازئین در شیر خشک مصرفی نوزادان به‌منزله کمک هضم و در

آزمایش‌های پروتئومیکس در مرحله طیف‌سنجی جرمی اشاره کرد (Jellouli et al., 2009; Klomklao et al., 2010). امروزه در صنایع مختلف بیشتر از تریپسین پستانداران مانند تریپسین تهیه شده از خوک (Porcine) استفاده می‌شود. به دلیل محیط‌های آبی گسترده در ایران، این ظرفیت وجود دارد که ترکیبات باارزشی نظیر آنزیم‌ها در گونه‌های متعدد آبی بررسی شود تا بتوان در آینده امکان استفاده از آنها را در صنایع مختلف ارزیابی کرد. یکی از این گونه‌ها، ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) است که به خانواده کیلکاماهیان (*Clupeidae*) تعلق دارد. این گونه از مهم‌ترین ذخایر ماهیان پلاژیک دریای خزر به شمار می‌رود و بیش از ۹۰ درصد صید ماهیان این خانواده را به خود اختصاص داده است (Karimzadeh et al., 2010; Shilat, 2010). محققان مختلفی رهاسازی مقادیر بالایی از آنزیم‌های پروتئاز گوارشی به خصوص تریپسین را از ضمام پیلوریک ماهیان گزارش کرده‌اند (Castillo-Yanez et al., 2005; Lu et al., 2008; Khanthaphant and Benjakul, 2010). ماهی کیلکای معمولی از گونه‌های کم‌مصرف خوراکی برای انسان است که بیشتر برای تولید پودر ماهی استفاده می‌شود، اما به دلیل دارا بودن آنزیم تریپسین در قسمت امعا و احشا می‌توان از آن در صنایعی مانند صنایع غذایی، دارویی، چرم‌سازی و ... استفاده کرد (Zamani et al., 2012). از مهم‌ترین عوامل مؤثر در عملکرد آنزیم می‌توان به پارامترهای کینتیکی و بیوشیمیایی اشاره کرد که آنزیم می‌تواند تحت تأثیر آنها فعالیت متفاوتی از خود نشان دهد (Ahsan and Watabe, 2001). در زمینه مقایسه پارامترهای کینتیکی و عوامل بیوشیمیایی آنزیم تریپسین ماهیان با آنزیم‌های تجاری مطالعاتی انجام شده است که می‌توان به مقایسه آنزیم تریپسین ماهی آنچوی ژاپنی (*Engraulis Japonica*) با تریپسین گاو (ibid) و آنزیم تریپسین ماهی آنچوی ژاپنی با تریپسین خوک (Kishimura et al., 2005) اشاره کرد. در زمینه مقایسه آنزیم تریپسین کیلکای معمولی با آنزیم‌های تجاری تحقیقی انجام نگرفته، بنابراین، در این

تحقیق سعی شده است پارامترهای کیتیک و بیوشیمیایی مؤثر در فعالیت آنزیم تریپسین ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی سنجش و با آنزیم تریپسین تجاری خوک مقایسه شود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه نمونه ماهی

ماهی کیلکای معمولی مورد نیاز در این مطالعه در تیر ۱۳۸۹ از صیدگاه شهرستان بابلسر تهیه شد. ماهیان صیدشده داخل ظروف یونولیتی با نسبت ۱ به ۲ به یخ مخلوط و در ۴۵ دقیقه به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از انتقال ماهیان به آزمایشگاه، ضمائم پیلوریک در مجاورت یخ از امعا و احشای ماهی جدا و بلافاصله در فریزر ۸۰- نگهداری شدند (Khanthaphant and Benjakul, 2010). میانگین وزن و طول کل ماهیان به ترتیب  $9/5 \pm 1/75$  گرم و  $11/64 \pm 0/67$  سانتی متر بود. نمونه آنزیم تریپسین پانکراتیک خوکی نیز از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) خریداری شد.

۲.۲. چربی‌زدایی و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه ضمائم پیلوریک پس از خروج از فریزر ۲ ساعت در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت تا از حالت انجماد خارج شود. سپس، عمل چربی‌زدایی با استفاده از استون سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) انجام شد. برای این منظور نمونه پس از تعیین حجم با استون سرد با نسبت ۱ به ۳ مخلوط و عمل یکنواخت‌سازی با هموژنایزر (Heidolph Diast 900, Sigma Co., St. Louis, MO, US) ۱ دقیقه در مجاورت یخ انجام شد. سپس نمونه یکنواخت‌شده به وسیله کاغذ صافی (Whatman grade No. ۲, Lawrence, Kansas, USA) فیلتر شد و مواد باقیمانده روی فیلتر چندین مرتبه با استون سرد شسته شد تا عمل چربی‌زدایی به خوبی انجام شود. مواد روی فیلتر یک شبانه روز در دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک شوند (El-Beltagy et al., 2005). پودر خشک‌شده حاصل از نمونه ضمائم پیلوریک با بافر استخراج (pH Tris-HCl, 50 mM) گرفته شد (Khanthaphant and Benjakul, 2010).

۳.۲. راسب‌سازی با آمونیوم سولفات

در این مرحله عصاره خام آنزیمی با اشباعیت ۰-۳۰ و ۳۰-۶۰ درصد به منظور راسب‌سازی آنزیم تریپسین با آمونیوم سولفات (Sigma, St. Louis, MO, USA) مخلوط شد تا بهترین درصد که حاوی بیشترین فعالیت آنزیم تریپسین است، به دست آید و برخی از پروتئین‌های غیرضروری نیز حذف شوند. برای این منظور ابتدا آمونیوم سولفات تا حصول اشباعیت ۳۰ درصد در مجاورت یخ به آرامی به نمونه اضافه شد تا به خوبی حل شود. بعد از ۲ ساعت، نمونه در سانتریفیوژ در  $14000\text{g}$  به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. قسمت رسوب‌یافته جمع‌آوری و در ۵ ml بافر استخراج حل شد. سوپرناتانت نیز مجدداً با آمونیوم سولفات تا حصول اشباعیت ۶۰ درصد مخلوط و پس از ۲ ساعت در  $14000\text{g}$  به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. قسمت رسوب‌یافته جمع‌آوری و در ۵ ml بافر استخراج حل شد. نمونه حاصل از اشباعیت ۰-۳۰ و ۳۰-۶۰ درصد پس از حل شدن در بافر استخراج در کیسه دیالیز (Sigma, St. Louis, MO, USA) ریخته و ۱ شبانه روز در مجاورت بافر استخراج، عمل دیالیز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای حذف یون‌های آمونیوم سولفات انجام شد. سپس فعالیت آنزیم تریپسین در درصدهای مورد آزمایش سنجش شد. بیشترین فعالیت آنزیم در ۳۰-۶۰ درصد مشاهده شد. در نتیجه این درصد برای بررسی آزمایش‌ها انتخاب شد.

۴.۲. سنجش فعالیت آنزیم تریپسین  
 برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین از روش (1961) Erlanger *et al.* و از سوبسترای (DL-)Na-*benzoyl* (BAPNA) (*arginine-p-nitroanilide-HCL*) استفاده شد. در این روش، ابتدا نمونه آنزیمی با آب مقطر سرد با نسبت ۱ به ۴ رقیق شد، سپس با محلول سوبسترا - بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر ۸,۰ pH Tris-HCl, ۵۰ mM) حجم مخلوط واکنش  $(ml) \times 1000 \times$  میزان جذب در ۴۱۰ nm

$$\text{فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین (Unit/mg protein)} = \frac{\text{حجم مخلوط واکنش (ml)} \times 1000 \times \text{میزان جذب در ۴۱۰ nm}}{\text{میزان پروتئین (mg/ml)} \times \text{زمان واکنش (min)} \times 8800}$$

در این فرمول ۸۸۰۰ بیانگر ضریب تاریکی برای پارا-نیتروآنیلین و محصول هیدرولیز سوبسترای BAPNA به وسیله آنزیم تریپسین است.  
 ۵.۲. سنجش مقدار پروتئین محلول  
 برای سنجش مقدار پروتئین محلول از روش (1951) *Lowry et al.* استفاده شد. در این روش از آلبومین سرم گاوی با غلظت ۱ mg / ml در حکم استاندارد استفاده و قرائت نوری نمونه‌ها در ۷۵۰ nm انجام شد. سپس یک منحنی استاندارد با استفاده از قرائت‌های نوری به دست آمده برای آلبومین سرم گاوی رسم و قرائت نوری مربوط به نمونه به منحنی استاندارد منتقل و مقدار پروتئین محلول محاسبه شد.

۲.۷.۲. دمای پایداری  
 برای تعیین دمای پایداری، ابتدا نمونه آنزیمی در دماهای ۴، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در دماهای ۴، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد در حالت انکوباسیون قرار گرفت. سپس فعالیت آنزیم تریپسین در طول موج ۴۱۰ nm اندازه‌گیری شد (Erlanger *et al.*, 1961; Khantaphant and Benjakul, 2010).

۶.۲. آماده‌سازی نمونه آنزیمی پانکراتیک خوک  
 برای تهیه نمونه آنزیمی، مقدار ۱ mg از آنزیم در ۱ ml از بافر استخراج حل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۷.۲. بررسی عوامل بیوشیمیایی بر فعالیت آنزیم تریپسین کیلکای معمولی و خوک  
 ۱.۷.۲. دمای بهینه  
 برای تعیین دمای بهینه، نمونه آنزیمی پس از مخلوط شدن

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

## ۳.۷.۲. pH بهینه

مخلوط شد و ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به حالت انکوباسیون قرار گرفت. پس از آن فعالیت آنزیم تریپسین در طول موج ۴۱۰nm اندازه‌گیری شد (همان).

برای تعیین pH بهینه، ابتدا محلول سوپسترا - بافر با pH های مختلف (۱ میلی مولار BAPNA در بافرهای ذکر شده در جدول ۱) تهیه، سپس با نمونه آنزیمی

## جدول ۱. انواع بافرهای استفاده‌شده برای آماده‌سازی محلول بافر - سوپسترای ۱ میلی مولار BAPNA

۱۰mM CaCl<sub>۲</sub>, ۴.۰-۶.۰ pH acetic acid-sodium acetate, ۵۰ mM بافر شماره ۱

۱۰mM CaCl<sub>۲</sub>, ۷.۰-۹.۰ pH Tris-HCl, ۵۰ mM بافر شماره ۲

۱۰mM CaCl<sub>۲</sub>, ۱۱.۰-۱۰.۰ pH Glycine-NaOH, ۵۰ mM بافر شماره ۳

## ۴.۷.۲. pH پایداری

(CaCl<sub>۲</sub>) مخلوط شد و ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن قرائت نوری در طول موج ۴۱۰nm انجام شد. فعالیت نسبی آنزیم تریپسین نیز از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه شاهد (بدون انکوباسیون در بافر با pH های مختلف) بر اساس فرمول زیر محاسبه و به صورت درصد گزارش شد (همان).

برای تعیین پایداری pH، ابتدا نمونه آنزیمی با نسبت یک به یک با بافرهای ذکر شده در جدول ۱ مخلوط شد و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به حالت انکوباسیون قرار گرفت. سپس نمونه انکوبه شده با محلول سوپسترا - بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر ۱۰mM Tris-HCl, ۰.۸, ۵۰ mM

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

## ۵.۷.۲. اثر یون‌های فلزی

(CaCl<sub>۲</sub>) مخلوط شد و ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن قرائت نوری در طول موج ۴۱۰nm انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز مشابه نمونه آنزیمی بود، فقط نمونه شاهد یون فلزی نداشت (همان). فعالیت نسبی آنزیم تریپسین از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه شاهد بر اساس فرمول زیر محاسبه و به صورت درصد گزارش شد.

برای بررسی اثر یون‌های فلزی، ابتدا یون‌های NaCl، CaCl<sub>۲</sub>، KCl، MgCl<sub>۲</sub> و MnCl<sub>۲</sub> در غلظت ۵ mM با نمونه آنزیمی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس مخلوط حاصل از انکوباسیون با محلول سوپسترا - بافر (۱ میلی مولار BAPNA در بافر ۱۰mM Tris-HCl, ۸.۰, ۵۰ mM

$$\text{فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین در حضور یون‌های فلزی} \times 100 = \frac{\text{فعالیت نسبی (\%)}}{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین در نمونه شاهد}}$$

BAPNA در بافر، pH ۸,۰، ۵۰ mM Tris-HCl، ۱۰ mM CaCl<sub>۲</sub> مخلوط شد و ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. همچنین قرائت نوری در طول موج ۴۱۰ nm انجام شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه آنزیمی بود، فقط نمونه شاهد فاقد بازدارنده بود. درصد بازدارندگی از طریق فرمول زیر محاسبه شد (همان).

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

۰/۹۷۵ (b)x برای آنزیم تریپسین خوک به دست آمد و مقدار V<sub>max</sub> و K<sub>m</sub> از طریق زیر محاسبه شد:

$$V_{max} = \frac{1}{a}, \quad K_m = b \times V_{max} \quad \text{۹.۲. آنالیز آماری}$$

برای مقایسه پارامترهای کینتیکی و بیوشیمیایی بین آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی و خوک، همچنین رسم نمودارها از نرم‌افزارهای SPSS ۱۷ و Excel استفاده شد. برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد و میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند. تمام ارزیابی‌ها نیز در ۳ تکرار انجام گرفت.

### ۳. نتایج

بررسی دمای بهینه و پایداری دمایی آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی و خوک نشان داد که دمای بهینه در هر دو گونه برابر با ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود، به طوری که با افزایش دما از ۴ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم افزایش یافت و در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به حداکثر مقدار خود رسید، اما از ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد کاهش ناگهانی در فعالیت آنزیم مشاهده شد (شکل ۱، a و b). پایداری دمایی آنزیم تریپسین نیز نشان داد که در ماهی کیلکای معمولی با افزایش دما از ۴ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم افزایش، سپس از ۴۵

### ۶.۷.۲. اثر بازدارنده‌ها

برای تعیین اثر بازدارنده‌ها، ابتدا بازدارنده‌های 'SBTI (۰/۰۵ mM)، 'PMSF (۱۰ mM)، 'TLCK (۵ mM) و ρ-Aminobenzamidine (۵ mM) در غلظت‌های مذکور با نمونه آنزیمی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس مخلوط حاصله از انکوباسیون با محلول سوبسترا - بافر (۱ میلی مولار

### ۸.۲. پارامترهای کینتیکی

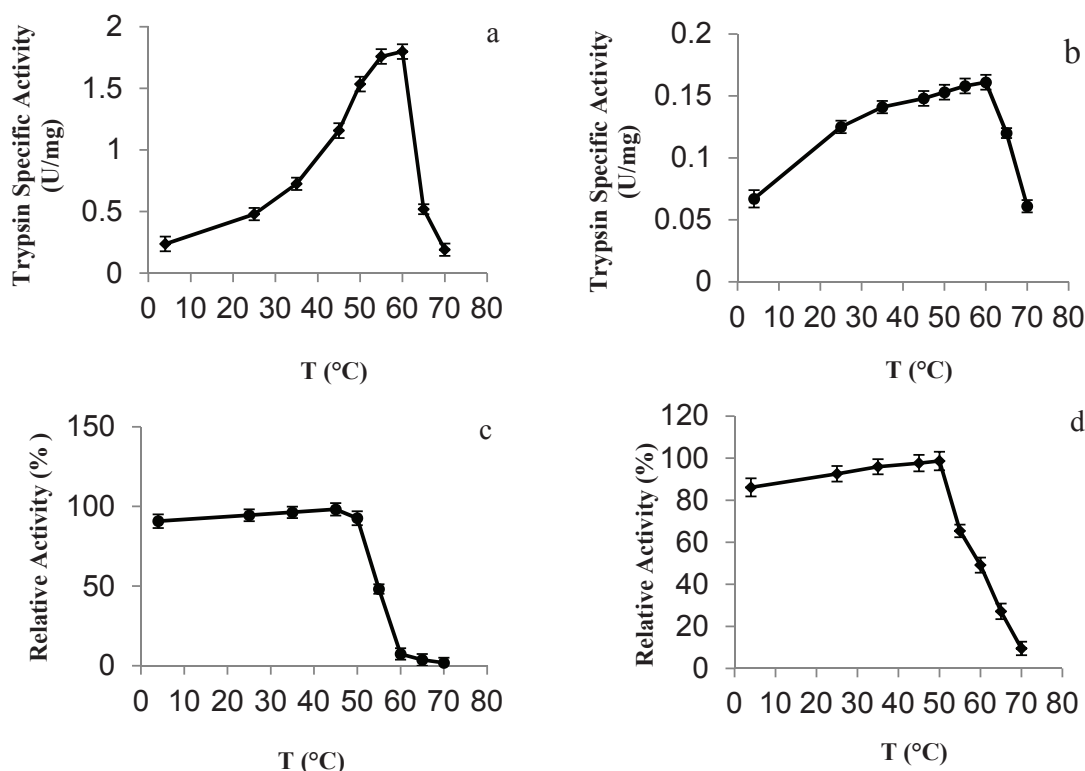
برای تعیین پارامترهای کینتیکی آنزیم تریپسین کیلکای معمولی و خوک از روش Lineweaver and Burk (۱۹۳۴) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا سوبسترای BAPNA با غلظت‌هایی از ۲ - ۱ درصد (شامل ۰/۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱۶، ۰/۳۲، ۰/۶۴، ۰/۲۸، ۰/۵۰ mM Tris-HCl، pH در بافر ۱/۵ و ۲ میلی مولار) در بافر ۱۰ mM CaCl<sub>۲</sub>، ۸,۰، تهیه شد. سپس نمونه آنزیمی با غلظت‌های مختلف تهیه‌شده از سوبسترای BAPNA مخلوط شد و ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. همچنین فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین از روش Erlanger *et al.* (1961) اندازه‌گیری و حداکثر فعالیت آنزیم (V<sub>max</sub>) و ثابت میخائلیس - متن (K<sub>m</sub>) محاسبه شد. برای محاسبه V<sub>max</sub> و K<sub>m</sub> ابتدا نمودار Michaelis and Menten (1913) را در غلظت‌های مختلف سوبسترا با فعالیت آنزیمی مربوطه رسم کردند، به طوری که غلظت سوبسترا در محور X و حداکثر فعالیت آنزیمی در محور Y قرار گرفتند. سپس آن را به نمودار لاین ویور - برک منتقل کردند تا به حالت خطی تبدیل شود و بتوان K<sub>m</sub> و V<sub>max</sub> را از معادله خطی حاصله محاسبه کرد. معادله ۱/۵۲۸ (a) + ۰/۱۵۱ x (b) برای آنزیم تریپسین کیلکای معمولی و معادله ۲/۴۶۸ (a) +

1. Soybean trypsin inhibitor
2. phenylmethanesulfonyl fluoride
3. N-p-tosyl-L-lysine-chloromethylketone

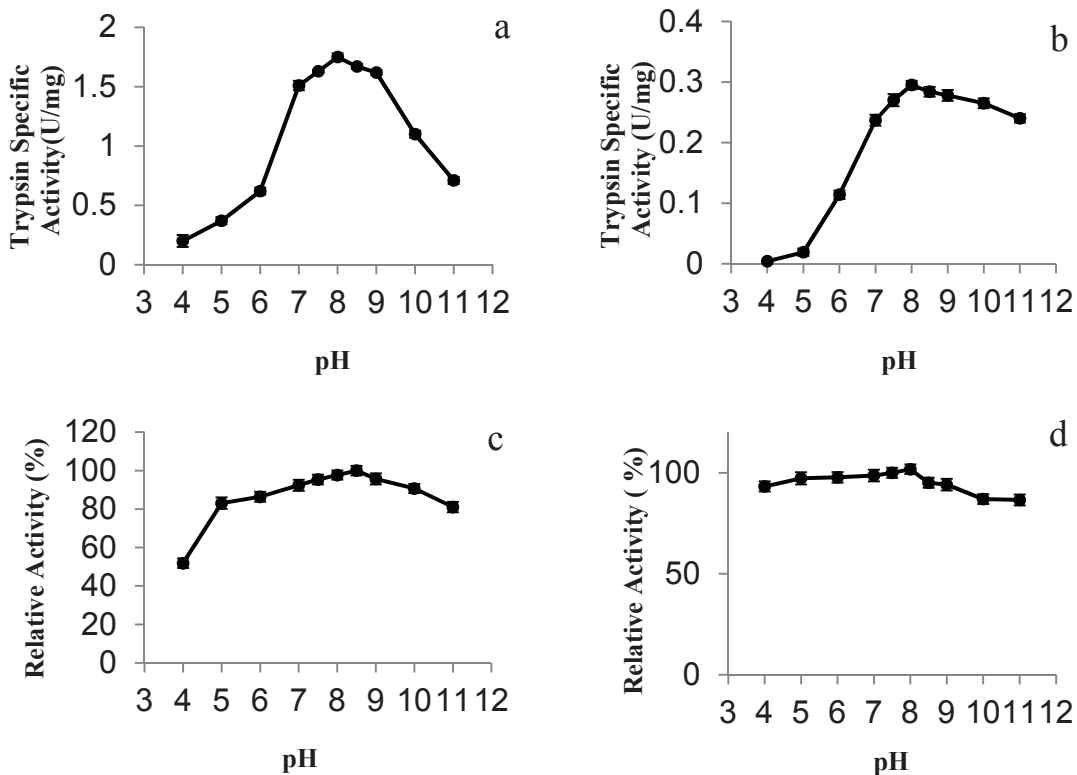
است. یون‌های فلزی  $\text{CaCl}_2$  و  $\text{MgCl}_2$  باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی و خوک نسبت به نمونه شاهد، که فاقد این یون‌های فلزی بود، شدند ( $P < 0,05$ )، با این تفاوت که اثر افزایشی این یون‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی به طور معنی‌داری بیشتر از آنزیم تریپسین خوک بود ( $P < 0,05$ ). یون‌های فلزی  $\text{NaCl}$  و  $\text{KCl}$  اثری بر فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی نسبت به نمونه شاهد نداشتند ( $P < 0,05$ )، اما در خوک اثر کاهشی معنی‌داری از خود نشان دادند ( $P < 0,05$ ). به طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی شد ( $P < 0,05$ )، در حالی که در خوک اثر کاهشی معنی‌داری از خود نشان داد ( $P < 0,05$ ).

تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت، اما در خوک این افزایش تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و از ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت (شکل ۱، c و d). pH بهینه و پایداری pH برای آنزیم تریپسین نیز نشان داد که pH بهینه برای فعالیت آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی و خوک ۸ بود و با افزایش pH از ۴ تا ۸، فعالیت آن افزایش و از pH ۸ تا ۱۱، کاهش یافت (شکل ۲، a و b). پایداری pH نیز نشان داد که در ماهی کیلکای معمولی آنزیم تریپسین در pH ۷ تا ۱۰ پایدار و در pH اسیدی و به شدت قلیایی (pH ۴، ۵، ۶ و ۱۱) تقریباً ناپایدار بود، اما این پایداری در خوک تقریباً در pH ۴ تا ۱۱ مشاهده شد (شکل ۲، c و d).

اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی و خوک در جدول ۲ نشان داده شده



شکل ۱. تأثیر دما در فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی و خوک. a: دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین کیلکای معمولی، b: دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین خوک، c: پایداری دمایی آنزیم تریپسین کیلکای معمولی و d: پایداری دمایی آنزیم تریپسین خوک.



اختلاف بین آن دسته از یون‌های فلزی که حرف مشترک ندارند معنی‌دار است ( $\alpha = 0.05$ ,  $n = 3$ ,  $Mn \pm SD$ ).

شکل ۲. تأثیر pH در فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی و خوک. a: pH بهینه فعالیت آنزیم تریپسین کیلکای معمولی، b: pH بهینه فعالیت آنزیم تریپسین خوک، c: پایداری pH آنزیم تریپسین کیلکای معمولی و d: پایداری pH آنزیم تریپسین خوک.

جدول ۲. اثر یون‌های فلزی بر فعالیت نسبی آنزیم تریپسین (%) از ماهی کیلکای معمولی و خوک

خوک	ماهی کیلکای معمولی	یون‌های فلزی (5 mM)
$1.00 \pm 0.0^a$	$1.00 \pm 0.0^a$	شاهد (بدون یون فلزی)
$98.94 \pm 1.5^e$	$1.00 \pm 1.6^a$	KCl
$98.94 \pm 1.3^e$	$1.00 \pm 1.3^a$	NaCl
$1.04/21 \pm 1.2^f$	$1.08/24 \pm 1.5^b$	CaCl <sub>2</sub>
$1.03/15 \pm 1.4^j$	$1.07/21 \pm 1.7^c$	MgCl <sub>2</sub>
$97.89 \pm 1.4^h$	$1.01/0.3 \pm 1.6^d$	MnCl <sub>2</sub>



شکل ۳ رفتار کینتیکی آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی و خوک را نشان می‌دهد. بر اساس این نمودار و معادلات به دست آمده، مقدار  $V_{max}$  برای آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی و خوک به ترتیب برابر  $0.654 \pm 0.030 \mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{s}$  و  $0.405 \pm 0.028 \text{mg}\cdot\text{s}$  مقدار  $k_m$  برای کیلکای معمولی  $0.098 \pm 0.003 \text{mM}$  و برای خوک  $0.395 \pm 0.026 \text{mM}$  بود. طبق جدول ۴، مقدار  $V_{max}$  در کیلکای معمولی افزایش معنی‌داری نسبت به خوک داشت ( $P < 0.05$ ) که نشان‌دهنده فعالیت بالاتر آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی نسبت به خوک است. مقدار  $k_m$  در کیلکای معمولی به طور معنی‌داری کمتر از خوک بود ( $P < 0.05$ ) که نشان می‌دهد آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی نسبت به خوک میل ترکیبی بیشتری با سوبسترا دارد و سریع‌تر به حداکثر فعالیت ( $V_{max}$ ) خود می‌رسد.

اثر بازدارنده‌های اختصاصی آنزیم تریپسین بر فعالیت آن در کیلکای معمولی و خوک در جدول ۳ نشان داده شده است. مقایسه اثر بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین بین کیلکای معمولی با خوک به استثنای *p*-aminobenzamidine اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0.05$ ). در بین بازدارنده‌ها، SBTI و TLCK به طور معنی‌داری باعث کاهش فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی و خوک شدند ( $P > 0.05$ )، اما SBTI در مقایسه با TLCK اختلاف معنی‌داری از خود نشان نداد ( $P > 0.05$ ). درصد بازدارندگی *p*-aminobenzamidine بر فعالیت آنزیم تریپسین کیلکای معمولی به طور معنی‌داری کمتر از آنزیم تریپسین خوک بود ( $P < 0.05$ ). بازدارنده PMSF باعث کاهش فعالیت آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی و خوک شد و اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۳. درصد بازدارندگی انواع بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی و خوک

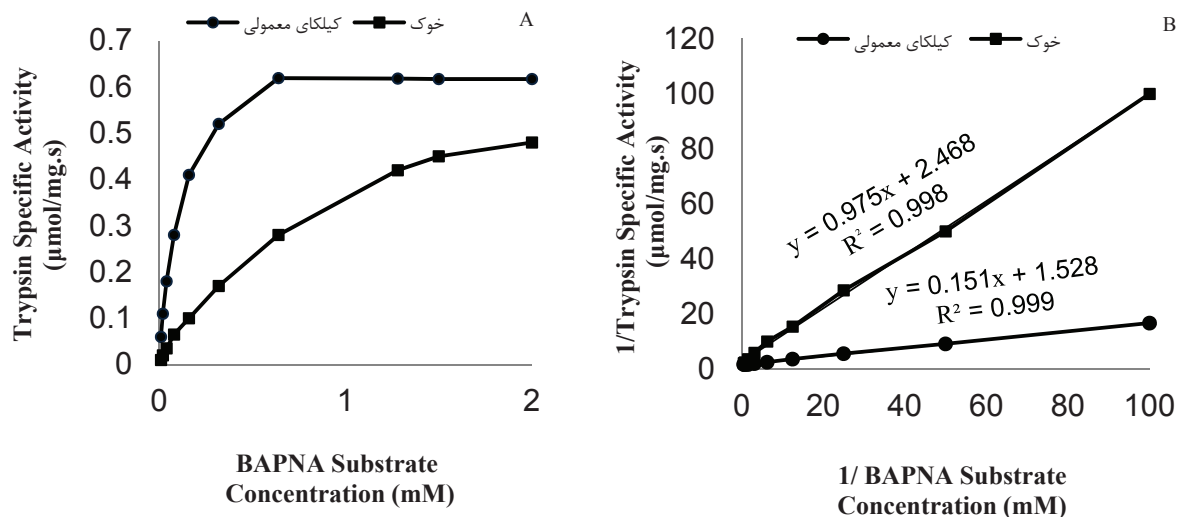
انواع بازدارنده	آنزیم تریپسین کیلکای معمولی (%)	آنزیم تریپسین خوک (%)
PMSF	$36/60 \pm 0/30^a$	$36/20 \pm 0/40^a$
SBTI	$95/67 \pm 0/45^b$	$96/15 \pm 0/36^b$
TLCK	$96/10 \pm 0/30^b$	$96/05 \pm 0/28^b$
$\rho$ - Aminobenzamidine	$43/50 \pm 0/25^c$	$62/95 \pm 0/26^d$

اختلاف بین آن دسته که حرف مشترک ندارند معنی‌دار است ( $\alpha = 0.05$ ,  $n = 3$ ,  $Mn \pm SD$ ).

جدول ۴. پارامترهای کینتیک آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی و خوک

آنزیم تریپسین	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{s}$ )	$K_m$ (mM)
کیلکای معمولی	$0.654 \pm 0.030^a$	$0.098 \pm 0.003^a$
خوک	$0.405 \pm 0.028^b$	$0.395 \pm 0.026^b$

در هر ستون، اختلاف بین آن دسته که حرف مشترک ندارند معنی‌دار است ( $\alpha = 0.05$ ,  $n = 3$ ,  $Mn \pm SD$ ).



شکل ۳. رفتار کینتیکی فعالیت آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی و خوک. A: نمودار میخانلیس - منتن، B: نمودار لاین وپور- برک

در ماهی *Katsuwonus pelamis* (Klomklao et al., 2009) و *Salaria basilisca* (Ktari et al., 2012) دمای بهینه ۶۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد. دمای پایداری آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی نسبت به خوک پایین‌تر بود. در تحقیقات روی آنزیم تریپسین در آنچوی ژاپنی و مقایسه آن با نوع خوکی و گاوی، دمای پایداری برای هر ۳ گونه ۵۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Ahsan and Watabe, 2001; Kishimura et al., 2001). در ماهی *maculatus* (Souza et al., 2007)، *Sardina* (Bougatef et al., 2007) و *Balistes capriscus* و *pilchardus* (Jellouli et al., 2009) پایداری ۵۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد.

pH بهینه برای آنزیم تریپسین از کیلکای معمولی و خوک برابر ۸ گزارش شد (Kishimura et al., 2005). چنین نتایجی را در ماهی آنچوی ژاپنی و خوک و *S. pilchardus* (Bougatef et al., 2007) در ماهی گزارش کرد. Ahsan and Watabe (2001) نیز pH بهینه برای آنزیم تریپسین گاوی را ۸ گزارش کردند.

آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی نسبت به خوک در محدوده pH کمتری پایدار بود. این نتایج را Kishimura et al. (2005) در ماهی آنچوی ژاپنی و

#### ۴. بحث

طی دو دهه گذشته تلاش‌های زیادی به منظور بررسی منابع آنزیمی در آبزیان برای استفاده تجاری از آنها شکل گرفته است. پروتئازها، مهم‌ترین گروه از آنزیم‌های تجاری، حدود ۶۰ درصد از تجارت آنزیم‌ها را در جهان به خود اختصاص داده‌اند (Souza et al., 2007; Silva et al., 2011). در مقایسه با پروتئازهای مشابه از پستانداران، تحقیقات شکل گرفته تأکید بر استفاده از آنزیم‌های موجودات دریایی با ویژگی‌های خاص است که می‌توانند در مواد افزودنی شوینده‌ها، فرآوری مواد غذایی و داروسازی استفاده شوند (Esposito et al., 2009; Ktari et al., 2012; Sila et al., 2012).

بررسی‌ها روی آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی و خوک نشان داد که دمای بهینه برای هر دو گونه ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. Ahsan (2001) and Watabe چنین نتایجی را روی آنچوی ژاپنی (*Engraulis japonicas*) و تریپسین گاوی (Bovine) بررسی کردند و دمای بهینه برابر با ۶۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد. همچنین Kishimura et al. (2005) آنزیم تریپسین از آنچوی ژاپنی را با نوع خوکی مقایسه کرد و گزارش داد که دمای بهینه ۵۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد بود.

خوک نیز گزارش کرده بود. پایداری آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی (Klomkalo et al., 2009) با ماهی *B. capriscus* (Jellouli et al., 2009)، و *S. basilisca* و *K. pelamis* (Ktari et al., 2012) مشابه بود. دامنه پایداری آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی کمتر از خوک بود، اما از آنجا که آنزیم تریپسین پروتئاز قلیایی و دامنه مؤثر برای عملکرد آن در محدوده pH قلیایی است، بنابراین در این محدوده هر دو گونه پایداری مشابهی از خود نشان دادند.

اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم تریپسین کیلکای معمولی به طور معنی‌داری بالاتر از تریپسین خوک بود. برخی از یون‌های فلزی به منزله فعال‌کننده و پایدارکننده در فعالیت آنزیم‌ها عمل می‌کنند. (1975) Bode and Schwager گزارش کردند که یون کلسیم نه تنها از آنزیم تریپسین در برابر عمل خودهضمی جلوگیری می‌کند، بلکه باعث افزایش فعالیت آن نیز می‌شود. چنین نتایجی را Bougateg et al. (2007) در ماهی *S. pilchardus* (Ali et al., 2009) و *Lithognathus mormyrus* (Ktari et al., 2012) در ماهی *S. basilisca* نیز گزارش کردند.

بازدارنده‌های مورد بررسی به استثنای  $\rho$ -aminobenzamidine نشان دادند که بر فعالیت آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی و خوک اثر تقریباً مشابهی دارند و اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند، اما  $\rho$ -aminobenzamidine نشان داد که روی فعالیت آنزیم تریپسین خوک تأثیر بیشتری داشته است و بازدارندگی بالاتری را اعمال کرد، در حالی که فعالیت آنزیم تریپسین در ماهی کیلکای معمولی فعالیت خود را بیشتر از نوع خوک حفظ کرد. در برخی موارد به دلیل ترکیبات شیمیایی مانند بازدارنده‌ها، آنزیم فعالیت خود را از دست می‌دهد و غیرفعال می‌شود، در حالی که نیاز است فعالیت آن حفظ شود. بنابراین پایداری آن در برابر این ترکیبات می‌تواند وجه مثبتی قلمداد شود. بررسی‌ها روی اثر بازدارندگی SBTI، TLCK، PMSF و  $\rho$ -aminobenzamidine در ماهیان *Sardinops* (Kishimura et al., 2005; Klomkalo et al., 2009; Kanno et al., 2011; Ktari et al., 2012).

##### ۵. نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادها

نتایج بررسی‌های کینتیک و بیوشیمیایی بر فعالیت آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی و خوک نشان داد که آنزیم تریپسین در کیلکای معمولی نسبت به نوع

پارامترهای کینتیک آنزیم تریپسین نیز نشان داد که در ماهی کیلکای معمولی نسبت به خوک کارایی بیشتری دارند، زیرا هرچه  $k_m$  آنزیم کمتر باشد، میل ترکیبی بیشتری در اتصال با سوبسترا خواهد داشت و سریع‌تر می‌تواند به حداکثر فعالیت ( $V_{max}$ ) خود برسد. در نتیجه در زمان و انرژی صرفه‌جویی بیشتری می‌شود، زیرا در صنعت در اکثر موارد برای افزایش سرعت فعالیت آنزیم باید دما را تا حد معینی افزایش داد تا ضمن حفظ ساختار آنزیم، فعالیت آن نیز به حداکثر خود برسد که این امر مستلزم صرف هزینه است. این در حالی است که اگر آنزیمی در مدت کمتری به فعالیت بیشینه خود برسد، می‌تواند به لحاظ اقتصادی و زمانی مقرون به صرفه باشد. همچنین اگر آنزیم از فعالیت بالایی برخوردار باشد، می‌تواند با توان بیشتری سوبسترای خود را بشکند و فرآورده موردنظر را تولید کند. در آبیان به نظر می‌رسد به دلیل پایین بودن دمای محیط اطراف، آنزیم‌های گوارشی به ساختار انعطاف‌پذیرتری نیاز دارند تا بتوانند تغییرات تطبیقی را با تغییرات دمای محیط اطراف خود انجام دهند و در دمای پایین محیط پیرامون خود توانایی متصل شدن به سوبسترا را داشته باشند (Ahsan and Watabe, 2001). این تغییرات ساختاری می‌تواند در توالی اسید آمینه‌های آنزیم نمایان شود، به طوری که در موارد مطالعه‌شده این اختلافات در گونه‌های مختلف آبیان مشاهده شده است (Kishimura et al., 2005; Klomkalo et al., 2009; Kanno et al., 2011; Ktari et al., 2012).

بیوتکنولوژی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج  
که ما را در این تحقیق یاری کردند، کمال تشکر و  
قدردانی را داریم.

خوک از کارایی بالاتری برخوردار است و می‌توان در  
آینده به‌منزله ماده افزودنی در صنایع مرتبط و تحقیقات  
بیوتکنولوژی به آن توجه کرد.

### **تقدیر و تشکر**

از کارکنان اداره شیلات شهرستان بابلسر و پرسنل بخش

## References

- [1]. Ahsan, M.N., Watabe, S., 2001. Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy (*Engraulis japonicas*). *Journal of Protein Chemistry* 20, 49–58.
- [2]. Ali, N.E.H., Hmidet, N., Bougatef, A., Nasri, R., Nasri, M., 2009. A Laundry Detergent-Stable Alkaline Trypsin from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: Purification and Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10943–10950.
- [3]. Bode, W., Schwager, P., 1975. The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Å resolution. II, Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *Journal of Molecular Biology* 98, 693–717.
- [4]. Bougatef, A., Souissi, N., Fakhfakh, N., Ellouz-Triki, Y., Nasri, M., 2007. Purification and characterisation of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry* 102, 343–350.
- [5]. Castillo-Yanez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreno, F.L., Del Toro, M.A.N., 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 140B, 91–98.
- [6]. Deguara, S., Jauncey, K., Agius, C., 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology* 62, 1033–1043.
- [7]. El-Beltagy, A.E., El-Adawy, T.A., Rahma, E.H., El-Bedawey, A.A., 2005. Purification and characterization of an alkaline protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Journal of Food Biochemistry* 29, 445–458.
- [8]. Erlanger, B.F., Kokowski, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archive Biochemistry Biophysic* 95, 271–278.
- [9]. Esposito, T.S., Amaral, I.P.G., Buarque, D.S., Oliveira, G.B., Carvalho, L.B., Bezerra, R.S., 2009. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry* 112, 125–130.
- [10]. 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.
- [11]. Kanno, G., Kishimura, H., Ando, S., Nalinanon, S., Klomklao, S., Benjakul, S., Chun, B-S., Saeki, H., 2011. Structural properties of trypsin from cold-adapted fish, arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*). *European Food Research and Technology* 232, 381–388.
- [12]. Karimzadeh, G., Gabrielyan, B., Fazli, H., 2010. Population dynamics and biological characteristics of kilka species (*Pisces: Clupeidae*) in the southeastern coast of the Caspian Sea. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 9(3), 422–433.
- [13]. 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.

- [14]. Kishimura, H., Hayashi, K., Miyashita, Y., Nonami, Y., 2005. Characteristics of two trypsin isozymes from the viscera of Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). *Journal of Food Biochemistry* 29, 459–469.
- [15]. Klomklao, S., 2008. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 30 (1), 37-46.
- [16]. Klomklao, S., Kishimura, H., Benjakul, S., 2009. Trypsin from the Pyloric Ceca of Pectoral Rattail (*Coryphaenoides pectoralis*): Purification and Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 7097–7103.
- [17]. Klomklao, S., Kishimura, H., Benjakul, S., Simpson, B.K., Visessanguan, W., 2010. Cationic trypsin: A predominant protease in Pacific saury (*Cololabis saira*) pyloric caeca. *Journal of Food Biochemistry* 34, 1105–1123.
- [18]. Ktari, N., Khaled, B. H., Nasri, R., Jellouli, K., Ghorbel, S., Nasri, M., 2012. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. *Food Chemistry* 130, 467–474.
- [19]. Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of American Chemistry Society* 56, 658–666.
- [20]. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- [21]. Lu, B.J., Zhou, L.G., Cai, Q.F., Hara, K., Maeda, A., Su, W.J., Cao, M.J., 2008. Purification and characterisation of trypsin from the pyloric caeca of Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chemistry* 110, 352–360.
- [22]. Michaelis, L., Menten, M.L., 1913. Kinetik der invertinwirkung *Biochem. Z.*, 49: 333-369. English translation Accessed 6 April 2007.
- [23]. Shahidi, F., Janak Kamil, Y.V.A., 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 12, 435-464.
- [24]. Shilat., 2010. Iranian Fisheries Organization. Annual Report. 60 p (in Persian).
- [25]. Sila, A., Nasri, R., Bougatef, A., Nasri, M., 2012. Digestive alkaline proteases from the goby (*Zosterisessor ophiocephalus*): Characterization and potential application as detergent additive and in the deproteinization of shrimp wastes. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 21, 118–133.
- [26]. Silva, J.F., Esposito, T.S., Marcuschi, M., Ribeiro, K., Cavalli, R.O., Oliveira, V., Bezerra R.S., 2011. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). *Food Chemistry* 129, 777–782.
- [27]. Simpson, B.K., 2000. Digestive proteinases from marine animals. In: Haard NF., Simpson BK. (Eds.), *Seafood enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality*. Marcel Dekker., New York, 531–540.
- [28]. Souza, A.A.G., Amaral, I.P.G., Santo, A.R.E., Carvalho, L.B., Bezerra, R.S., 2007. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chemistry* 100, 1429–1434.
- [29]. Zamani, A., Rezaei, M., Madani, R., 2012. In-vitro effects of biochemical factors on trypsin activity from intestine and pyloric caeca of common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) for inhibition of belly bursting. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 20(4), 53-62 (In Persian).