شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۷، شماره ۲، پاییز ۱۳۹۲
ص ۳۱۹-۳۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۱۴

تخلیص آنزیم لیپاز از بخش قدامی رودۀ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

❖ **نرگس انوشه:** دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیلات دانشکدۀ منابع طبیعی دانشگاه تهران،کرج، ایران.
❖ **رسول مدنی:** دانشیار بخش بیوتکنولوژی مؤسسۀ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران.
❖ **سیدولی حسینی*:** استادیار گروه شیلات دانشکدۀ منابع طبیعی دانشگاه تهران،کرج، ایران.
❖ **عباس زمانی:** استادیار گروه شیلات دانشکدۀ منابع طبیعی و محیط‌زیست دانشگاه ملایر، ملایر، ایران.
❖ **تارا امامی:** کارشناس ارشد بخش بیوتکنولوژی مؤسسۀ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، ایران.

چکیده

در سال‌های اخیر آبزیان به‌منزلۀ منبع استخراج آنزیم‌هایی مانند لیپاز مورد توجه قرار گرفته‌اند. امعا و احشای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان منبع بسیار مناسبی برای جداسازی آنزیم است. در این تحقیق، آنزیم لیپاز از بخش قدامی رودۀ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تخلیص شد. برای تخلیص، از استون برای چربی‌زدایی، از آمونیوم سولفات برای راسب‌سازی، از اولترافیلتراسیون برای تغلیظ نمونه و از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون برای جداسازی آنزیم موردنظر استفاده شد. میزان فعالیت آنزیم لیپاز تخلیص‌شده با استفاده از پارانیتروفنیل پالمیتات به‌منزلۀ سوبسترا و میزان پروتئین این آنزیم با استفاده از روش لوری، در مراحل مختلف تخلیص سنجش شد. در این تحقیق پارامترهایی مانند درصد بازده و میزان تخلیص نیز در هر مرحله بررسی شد. نتایج نشان داد در آخرین مرحلۀ تخلیص، میزان فعالیت و پروتئین آنزیم به ترتیب ۶/۱۷۱ واحد در میلی‌لیتر و ۰/۵۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، درصد بازده تخلیص برابر با ۷/۵۳ و میزان تخلیص برابر با ۵/۴۹ بود. وزن مولکولی آنزیم تخلیص‌شده با استفاده از روش SDS-PAGE، ۳۲ کیلو دالتون تعیین شد. بر اساس این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که آنزیم لیپاز رودۀ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای کارایی مناسبی است و می‌تواند در آینده به‌منزلۀ مادۀ افزودنی در صنایع مرتبط و تحقیقات بیوتکنولوژی مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ضایعات ماهی، ، فعالیت آنزیم، کروماتوگرافی، لیپاز.

* نویسندۀ مسئول تلفن: ۰۹۱۹۷۶۷۴۰۸۳
Email: Hosseinisv@ut.ac.ir

۱. مقدمه

آنزیم‌ها مولکول‌های پروتئینی‌اند که واکنش‌های شیمیایی را کاتالیز می‌کنند و در کاهش انرژی مورد نیاز برای واکنش‌های بیوشیمیایی نقش مهمی دارند (Shahidi and Hosseininejad, 2007). در صنایع غذایی، آنزیم‌ها جزو ترکیباتی به شمار می‌روند که به‌منزلهٔ کاتالیزور برای فرآوری مواد غذایی مختلف استفاده می‌شوند. استفادهٔ تجاری از آنزیم‌ها در صنایع غذایی ابتدا به تعداد کمی از محصول‌هایی مانند فرآورده‌های غذایی تخمیری محدود بوده است، اما امروزه روش‌های آنزیمی در صنایع غذایی بخش مهمی از واکنش‌ها را برای تولید محصول‌های متنوع به خود اختصاص می‌دهند که محققان علت را به عملکرد اختصاصی آنزیم‌ها و قابلیت بالای فعالیت آن‌ها در غلظت‌های پایین و در شرایط مختلف دمایی و pH ذکر کرده‌اند (Kamini et al., 2000). لیپاز به طور گسترده‌ای در فرآوری روغن‌ها و چربی‌ها، شوینده‌ها، مواد غذایی، سنتز مواد شیمیایی و دارویی، تولید کاغذ و مواد آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود (Kazlauskas and Bornscheuer, 1998). لیپازها به منظور سرعت‌بخشیدن به تخریب زباله‌های چرب نیز به کار می‌روند (Masse et al., 2001).

آنزیم لیپاز به دلیل کاربردهای بالفعل و بالقوه، در دو دههٔ اخیر مورد توجه قرار گرفته است. آنزیم‌های پستانداران به صورت سنتی در کاربردهایی مانند بهبود طعم محصول‌های لبنی استفاده می‌شوند، اما در سال‌های اخیر آنزیم‌های تولیدشده از میکروارگانیسم‌ها بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند. با وجود مزایای آشکار لیپازهای تجاری با منشأ میکروبی، ماهیان و سخت‌پوستان منبع ناشناختهٔ بزرگ برای آنزیم‌های مفیدند که ممکن است اختصاصات سوبسترایی و ویژگی‌های فعالیتی متفاوت از لیپاز میکروبی و پستانداران داشته باشند (Kurtovic et al., 2010). ماهیان ساکن آب‌های سرد و معتدل، آنزیم‌هایی با بازدهی نسبتاً بالای کاتالیستی در دماهای پایین دارند که می‌توانند تحت شرایط حرارتی ضعیف، دناتوره شوند (Georlette et al., 2004). این ویژگی امکان انجام فرآوری در دمای پایین، حفاظت از سوبسترا در برابر آسیب‌های حرارتی و کاهش هزینهٔ انرژی را فراهم می‌کند (Kurtovic et al., 2010).

طی دو دههٔ گذشته، تلاش‌های زیادی برای بررسی منابع آنزیمی در آبزیان و استخراج آن‌ها به منظور استفادهٔ تجاری‌شان صورت گرفته است. عمدهٔ تحقیقات بر استخراج پروتئازها متمرکز شده بود. از جمله تحقیقاتی که روی پروتئازهای آبزیان انجام شد می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: Cao و همکاران (۲۰۰۰) تخلیص و شناسایی آنزیم تریپسین از هپاتوپانکراس ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را انجام دادند. Castillo-Yanez و همکاران (۲۰۰۵) آنزیم تریپسین در ضمائم پیلوریک ماهی ساردین (*Sardinops sagax caerulea*) را بررسی کردند، Klomklao و همکاران (۲۰۰۷a) به تخلیص و شناسایی تریپسین از طحال هوور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) پرداختند. Klomklao و همکاران (۲۰۰۷b) همچنین آنزیم تریپسین را از ماهی *Pomatomus saltatrix* تخلیص کردند، اما تحقیقات کمی در مورد استخراج سایر آنزیم‌ها از

جمله لیپازها از آبزیان صورت گرفته است. نظر به کاربردهای متنوع لیپازها در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، امروزه توجه ویژه‌ای به استخراج و تخلیص آن از منابع آبزی معطوف شده است.

تاکنون تلاش‌هایی برای استخراج آنزیم لیپاز از برخی ماهیان از قبیل کوسۀ لئوپارد (*Triakis semifasciata*) (Patton et al., 1977)، ساردین (*Sardinella longiceps*) (Mukundan et al., 1985)، کاد اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*)، (Lie and Lambersten, 1985)، آزاد (*Salmo gairdeneii*)، (Leger et al., 1977) صورت گرفته است. با توجه به فراوانی و تولید گستردۀ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور و استفاده‌نکردن از امعا و احشای این آبزی، سالانه با حجم بالایی از این ضایعات روبه‌رو هستیم و عمدۀ این مواد، بدون هیچ‌گونه عملیاتی به محیط‌زیست وارد و موجب آلودگی می‌شوند. از طرف دیگر، با توجه به اینکه امعا و احشای ماهی ترکیبات زیست‌فعال ارزشمندی مانند انواع آنزیم‌های گوارشی دارند، می‌توان از آن‌ها استفادۀ بهینه کرد. هدف از این تحقیق، تخلیص آنزیم لیپاز از رودۀ قزل‌آلای رنگین‌کمان و بررسی میزان فعالیت، پروتئین و وزن مولکولی آن است.

۲. مواد و روش‌ها

۲. ۱. آماده‌سازی نمونه

۱۵ عدد ماهی قزل‌آلای زنده (میانگین وزن ۵۰ ± ۹۰۰ گرم) به صورت تصادفی انتخاب و به آزمایشگاه بیوشیمی بخش بیوتکنولوژی مؤسسۀ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج منتقل شدند. رودۀ ماهیان در حضور یخ جداسازی شد. نمونه‌های جداسازی‌شده، تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجۀ سانتی‌گراد نگهداری شدند (Aryee et al., 2007). نمونه‌ها پس از خروج از فریزر به مدت ۲ ساعت در یخچال (۴ درجۀ سانتی‌گراد) قرار گرفتند تا از حالت انجماد خارج شوند. سپس، عمل چربی‌زدایی با استفاده از استون سرد (۲۰-) انجام شد. برای چربی‌زدایی نمونه، پس از تعیین حجم با استون سرد با نسبت ۱ به ۳ مخلوط و عمل یکنواخت‌سازی با هموژنایزر (HeidolpH Diax 900, Sigma Co. St. Louis, MO, US) در حضور یخ انجام شد. نمونۀ چربی‌زدایی‌شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شمارۀ ۲ (Lawrence, Kansas, USA) فیلتر شد و مواد باقی‌مانده روی فیلتر چندین بار با استون سرد شسته شدند تا چربی‌زدایی به طور کامل انجام شود. سپس، مواد روی فیلتر برای خشک‌شدن به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق (۲۳ درجۀ سانتی‌گراد) قرار گرفتند (Aryee et al., 2007). پودر خشک‌شده با نسبت ۱ به ۱۰ با بافر استخراج (۲۵ میلی‌مولار تریس- اسیدکلریدریک با pH ۷/۸ شامل ۵ میلی‌مولار بنزامیدین- اسیدکلریدریک، ۱ میلی‌مولار اتیلن دیامین تتراستیک اسید و ۱۰ درصد گلیسرول) مخلوط و به مدت ۱ساعت در دمای ۴ درجۀ سانتی‌گراد روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. پس از آن، در ۸۰۰۰g در دمای ۴ درجۀ سانتی‌گراد و به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ (IEC Model B-22M program Mable floor centrifuge, US) انجام شد. سپس، محلول رویی (سوپرناتانت) به‌منزلۀ عصارۀ خام آنزیمی در نظر گرفته شد.

۲. ۲. راسب‌سازی با آمونیوم سولفات

عصارهٔ خام آنزیمی تا حصول اشباعیت ۶۰ درصد با آمونیوم سولفات (Sigma, St. Louis, MO, USA) مخلوط و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس، در ۸۰۰۰g و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و ۴۵ دقیقه سانتریفوژ انجام شد. رسوب حاصل جمع‌آوری و با بافر استخراج مخلوط شد و یک شب در مجاور بافر استخراج در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، عمل دیالیز انجام گرفت تا یون‌های سولفات آمونیوم حذف شوند. پس از آن، در ۸۰۰۰g و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و ۴۵ دقیقه سانتریفوژ انجام شد. سپس، محلول از کاغذ صافی عبور داده و اولترافیلتراسیون انجام شد تا نمونه تغلیظ شود (Aryee et al., 2007).

۲. ۳. تخلیص

ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون جی- ۷۵ برای تخلیص آماده‌سازی و با بافر (۱۰ میلی‌مولار تریس- اسید کلریدریک با pH ۸/۵) شست‌وشو شد. نمونهٔ تغلیظ‌شدهٔ حاصل از اولترافیلتراسیون درون ستون ریخته شد و با استفاده از بافر (۱۰ میلی‌مولار تریس- اسید کلریدریک با pH ۸/۵) مواد درون ستون شست‌وشو شدند تا آنزیم مورد نظر جداسازی و از ستون خارج شود. سپس، فراکسیون‌های حاصل از شست‌وشوی ستون، جمع‌آوری شدند و قرائت نوری فراکسیون‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد. در نتایج قرائت نوری پیکی دیده شد که نمونه‌های مربوط به پیک حاصل، جمع‌آوری و محتویات آن‌ها درون کیسهٔ دیالیز (Sigma, St. Louis, MO, USA) ریخته شدند و برای انجام عمل دیالیز یک شب در مجاور بافر (۱۰ میلی‌مولار تریس- اسید کلریدریک با pH ۸/۵) قرار گرفتند. پس از آن، نمونه با ساکارز تغلیظ، سپس سانتریفوژ در ۸۰۰۰ g به مدت ۴۵ دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. سوپرناتانت حاصل برای مراحل بعدی استفاده شد (Islam et al., 2008).

۲. ۴. سنجش فعالیت آنزیم

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

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

در این فرمول ۱۷۵۰۰ بیانگر ضریب تاریکی برای پارا- نیتروفنیل است که محصول هیدرولیز سوبسترای پارانیتروفنیل پالمیتات از طریق آنزیم لیپاز است.

۲. ۵. سنجش پروتئین محلول

از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) برای سنجش

پروتئین محلول استفاده شد، به این ترتیب که از آلبومین سرم گاوی با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌منزلهٔ استاندارد استفاده و قرائت نوری در ۷۵۰ نانومتر انجام شد.

۲. ۶. الکتروفورز

برای تهیهٔ SDS-PAGE از ژل ۱۲/۵ درصد اکریل آمید استفاده شد. این ژل شامل دو قسمت تفکیک‌کننده و ردیف‌کننده است. قسمت تفکیک‌کننده شامل ۳/۱۲۵ میلی‌لیتر محلول A (۲۹:۱ آکریل آمید به بیس آکریل آمید)، ۰/۹۴ میلی‌لیتر محلول B (بافر ۳ مولار تریس HCl با pH=۸/۷)، ۲/۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر، ۷۵ میکرولیتر SDS، ۳/۵ میکرولیتر Temed و ۰/۳۸میکرولیتر (Ammonium APS (Per Sulfate و ژل ردیف‌کننده شامل ۲/۵ میلی‌لیتر محلول A، ۵ میلی‌لیتر محلول D (بافر ۰/۵ مولار تریس HCl با pH=۶/۵)، ۱۱/۳ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر APS، ۲۰۰ میکرولیتر SDS و ۱۲ میکرولیتر Temed بود. ابتدا ژل تفکیک‌کننده ریخته و پس از ۴۰ دقیقه که ژل بست ژل ردیف‌کننده تزریق شد و شانهٔ ژل درون آن قرار گرفت. پس از حدود ۴۰ دقیقه که ژل به طور کامل بست شانهٔ ژل خارج و شیشهٔ حاوی ژل به تانک الکتروفورز منتقل شد. بافر تانک (شامل تریس، گلایسین با pH ۸/۳) تهیه و درون تانک ریخته شد. نمونه‌ها برای تزریق در ژل با غلظت‌های زیر آماده شدند:

۲۰ میکرولیتر نمونهٔ دیالیزشده با ۲۰ میکرولیتر بافر نمونه (بافر تریس-HCl با pH=۶/۸ شامل ۲درصد SDS، ۱۰ درصد گلیسرول، ۵ درصد مرکاپتواتانول و به مقدار لازم بروموفنول‌بلو)، ۲۰ میکرولیتر نمونهٔ اولترافیلتراسیون با ۲۰ میکرولیتر بافر نمونه، ۲۵ میکرولیتر نمونهٔ آنزیم تخلیص‌شده با ۱۵ میکرولیتر بافر نمونه، ۲۵ میکرولیتر نمونهٔ آنزیم استاندارد با ۱۵ میکرولیتر بافر نمونه ترکیب شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند تا همهٔ باندهای پروتئینی باز شوند. پس از انتقال نمونه‌ها درون چاهک‌ها، با جریان ۱۵ میلی‌آمپر و به مدت ۲ ساعت اجازه داده شد تا ژل به جریان درآید. پس از به جریان درآمدن ژل، یک شب درون بافر رنگ (شامل متانول، اسید استیک، آب مقطر و رنگ کوماسی بلو) ریخته شد و روی شیکر قرار گرفت. سپس، به درون محلول رنگ‌بر (شامل متانول، اسید استیک و آب مقطر) منتقل شد و روی شیکر با دور پایین قرار گرفت تا علاوه بر پاک‌شدن زمینهٔ ژل، باندها نیز مشخص شوند.

برای تعیین وزن مولکولی آنزیم، از مارکر پروتئینی و بر اساس حرکت پروتئین‌ها در طول ژل از شاخص Rf استفاده شد. برای این کار ابتدا ژل را روی سطح شیشه‌ای تمیز قرار داده، سپس طول آن از چاهک تا خط آبی پایین ژل با خط‌کش اندازه گرفته، سپس فاصلهٔ هر یک از باندهای مربوط به مارکر پروتئینی نیز از ابتدای ژل اندازه‌گیری شد. سپس، مقدار Rf (نسبت فاصلهٔ باند پروتئین تا چاهک به فاصلهٔ جبههٔ حلال از چاهک، منظور از جبههٔ حلال جایی که در انتها ژل تا آن نقطه جریان یافته است) محاسبه و نمودار Rf رسم شد. در محور Y وزن مولکولی هر پروتئین مارکر و در محور X مقدار Rf نوشته شد. سپس، Rf باند مربوط به نمونهٔ آنزیمی تخلیص‌یافته به دست آمد و در نمودار Rf قرار داده شد و وزن مولکولی آن به دست آمد.

۳. نتایج

نتایج مربوط به سنجش فعالیت و پروتئین آنزیم در مراحل مختلف تخلیص، در جدول ۱ آمده است. بر اساس نتایج، در آخرین مرحلهٔ تخلیص و پس از عبور نمونه از ستون کروماتوگرافی، حجم نمونه برابر با ۱۴ میلی‌لیتر بود که میزان فعالیت آنزیم در این مرحله ۶/۱۷ واحد در میلی‌لیتر، میزان پروتئین ۰/۵۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، پروتئین کل ۷/۴۲ میلی‌گرم، فعالیت کل ۸۶/۴۹ واحد و میزان فعالیت اختصاصی آنزیم برابر با ۱۱/۶ واحد در میلی‌گرم بود.

بازده و میزان تخلیص آنزیم در مراحل مختلف در جدول ۲ آمده است. طبق نتایج در آخرین مرحلهٔ فرایند تخلیص، بازده ۷/۵۳ درصد و مقدار تخلیص برابر با ۵/۴۹ بود. همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، نمونه قبل از ستون‌گذاری چندین باند را نشان داد، اما پس از ستون‌گذاری باند مشخصی مشاهده شد که بر اساس شاخص Rf وزن مولکولی این باند سنجیده شد (شاخص Rf برای باند مورد نظر محاسبه و با پروتئین مارکر تطبیق داده شد تا وزن مولکولی آنزیم مشخص شود)، وزن مولکولی آنزیم بر اساس ژل SDS-PAGE، ۳۲ کیلودالتون تعیین شد (شکل ۱).

جدول ۱. میزان فعالیت و پروتئین آنزیم لیپاز رودهٔ قزل‌آلای رنگین‌کمان در مراحل مختلف تخلیص

مرحلهٔ تخلیص	حجم (میلی‌لیتر)	پروتئین (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	پروتئین کل (میلی‌گرم)	فعالیت آنزیم (واحد/میلی‌لیتر)	فعالیت کل (واحد)	فعالیت اختصاصی (واحد/میلی‌گرم)
عصارهٔ خام	۴۰	۱۳/۵	۵۴۰	۲۸/۷	۱۱۴۷/۲	۲/۱۲
اولترافیلتراسیون	۱۵	۲/۱۱	۳۱/۶۵	۱/۶۸	۲۵/۲	۰/۷۹
ژل فیلتراسیون (سفادکس جی- ۷۵)	۱۴	۰/۵۳	۷/۴۲	۶/۱۷	۸۶/۴۹	۱۱/۶

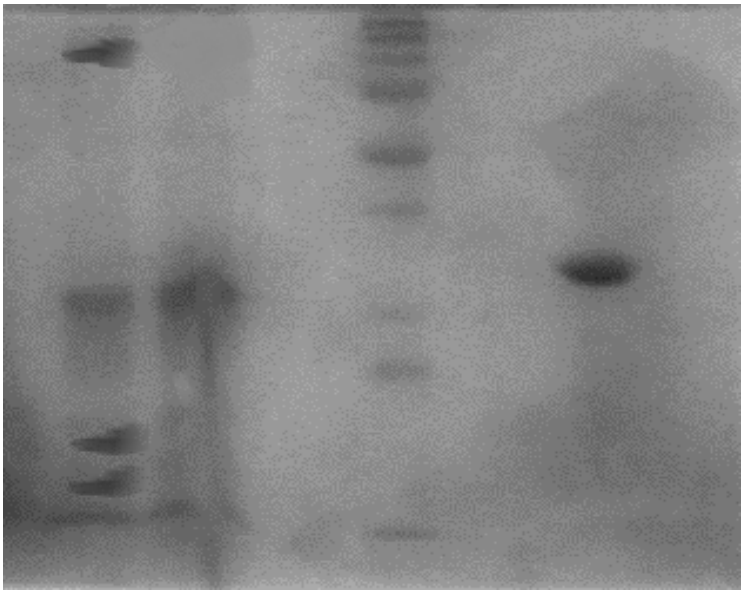
پروتئین کل= پروتئین * حجم فعالیت کل= فعالیت آنزیم * حجم

جدول ۲. میزان بازده و تخلیص آنزیم در مراحل مختلف فرایند تخلیص

مرحلهٔ تخلیص	بازده*(درصد)	تخلیص**
عصارهٔ خام	۱۰۰	۱
دیالیز	۹/۰۲	۰/۸
اولترافیلتراسیون	۲/۱۹	۰/۳۷
ژل فیلتراسیون (سفادکس جی- ۷۵)	۷/۵۳	۵/۴۹

*درصد بازده با تقسیم فعالیت کل آنزیم بر فعالیت کل عصارهٔ خام ضربدر ۱۰۰ محاسبه می‌شود.

**میزان تخلیص با تقسیم فعالیت اختصاصی بر پروتئین کل به دست می‌آید.



شکل ۱. عکس ژل (از راست به چپ: آنزیم تجاری، مارکر، نمونه پس از ستون‌گذاری، نمونه پس از اولترافیلتراسیون)

۴. بحث

طبق نظر بسیاری از محققان لولهٔ گوارش ماهی به خصوص زوائد پیلوریک و روده، محل آنزیم‌های گوارشی (پروتئازها، لیپازها و آمیلازها) با فعالیت بالا هستند (Deguara et al., 2003; Jun-Sheng et al., 2006; Matus de la Parra et al., 2007; Xiong et al., 2010). در این تحقیق امکان استخراج و تخلیص آنزیم لیپاز از رودهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد. عمل تخلیص با استفاده از آمونیوم سولفات و ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس جی-۷۵ انجام شد. از آمونیوم سولفات برای راسب‌سازی استفاده شد و استفاده از ستون کروماتوگرافی سبب افزایش بازده تخلیص می‌شود. استفاده از benzamidine-HCl در بافر استخراج، به این دلیل است که این ماده بازدارندهٔ پروتئازهاست و فعالیت پروتئولیتیکی را طی تخلیص به حداقل می‌رساند. عمل دیالیز قبل از انتقال نمونه به ستون کروماتوگرافی، برای حذف پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلودالتون که ممکن است با تشکیل باند با آنزیم مورد نظر درگیر شوند، انجام شد (Kurtovic et al., 2010). در این تحقیق، بازده تخلیص، پس از انجام عمل دیالیز کاهش و پس از مرحلهٔ ستون‌گذاری افزایش یافت. میزان تخلیص نیز از مرحلهٔ انجام دیالیز کاهش و پس از عبور نمونه از ستون کروماتوگرافی افزایش یافت. کاهش بازده طی تخلیص ممکن است به علت عوامل مختلفی مانند کاهش پایداری آنزیم طی مراحل تخلیص باشد. کاهش بازده در استفاده از مواد مربوط به آبزیان اغلب اجتناب‌ناپذیر است (Aryee et al., 2007). کاهش میزان تخلیص تا قبل از ستون‌گذاری نیز به علت افزودن آمونیوم سولفات است، زیرا این ترکیب تا حدی ساختار آنزیم را تغییر می‌دهد و موجب کاهش بازده و میزان تخلیص می‌شود (Holland and Coolbear, 1996; Chich et al., 1997; Castillo et

al., 1999). این نتایج با تحقیقی که Aryee و همکاران (۲۰۰۷) در خصوص تخلیص آنزیم لیپاز از امعا و احشای ماهی کفال خاکستری انجام دادند، مطابقت دارد. در سال‌های اخیر، در زمینهٔ آنزیم لیپاز و تخلیص آن از آبزیان پژوهش‌هایی انجام شده است. اولین پژوهش‌ها در این زمینه از سوی Iijima و همکاران (۱۹۹۸) صورت گرفت. آن‌ها لیپاز را از هپاتو پانکراس ماهی (*Pagrus major*) red sea bream تخلیص کردند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که وزن مولکولی آنزیم استخراج‌شده بر اساس SDS-PAGE حدود ۶۴ کیلودالتون بود. در پژوهش حاضر وزن مولکولی آنزیم استخراج‌شده با استفاده از SDS-PAGE تعیین شد. تعدادی باند قبل از ستون‌گذاری مشاهده شد، در این مرحله چون تخلیص هنوز صورت نگرفته بود پروتئین‌های دیگر نیز حضور داشتند، اما با انجام ستون‌گذاری و عمل تخلیص، سایر پروتئین‌ها حذف و فقط باند مربوط به آنزیم موردنظر در ژل مشاهده شد. به طور کلی وزن مولکولی آنزیم لیپاز متفاوت است که می‌تواند ناشی از منبع استخراج باشد.

در ماهی بسته به بخشی از بدن که آنزیم از آن جدا می‌شود و عملکرد آنزیم، وزن مولکولی نیز متفاوت است. ایسلام و همکاران (۲۰۰۸) دو نوع آنزیم لیپاز را از عضلهٔ پشتی ماهی کفال (*Liza parsia*) با استفاده از سولفات آمونیوم و ستون‌های کروماتوگرافی Sephadex G-50، DEAE-cellulose و CM-cellulose تخلیص کردند. نتایج نشان داد که وزن مولکولی لیپازهای ۱ و ۲ به ترتیب ۴۶/۵ و ۴۱/۲ کیلودالتون بود. ایسلام و همکاران (۲۰۰۹) در تحقیقی دیگر آنزیم لیپاز را از عضلات پشتی *Cirrhinu sreba* با استفاده از سولفات آمونیوم و ستون‌های کروماتوگرافی sephadex G-50 و DAEA-cellulose تخلیص کردند. بر اساس نتایج، وزن مولکولی آنزیم لیپاز استخراج‌شده ۸۷ کیلودالتون بود. آری و همکاران (۲۰۰۷) آنزیم لیپاز را به صورت جزئی از امعا و احشای ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) با آمونیوم سولفات و ستون کروماتوگرافی Cholate-EAH-Sepharose 4B استخراج کردند. میزان فعالیت این آنزیم در آخرین مرحلهٔ تخلیص ۷/۸ واحد بود. بر اساس نتایج می‌توان چنین نتیجه گرفت که آنزیم لیپاز استخراج‌شده دارای کارایی مناسب است و می‌تواند در آینده به‌منزلهٔ مادهٔ افزودنی در صنایع مرتبط و تحقیقات بیوتکنولوژی مورد توجه قرار گیرد.

References

[1]. Aryee, A., Simpson, B., Villalonnga, R., 2007. Lipase fraction from the viscera of Grey mullet (*Mugil cephalus*) isolation, partial purification and some biochemical characteristics. Enzyme and Microbial Technology 40, 394-402.

[2]. Cao, M., Osatomi, K., Suzuki, M., Hara, K., Tachibana, K., Ishihara, T., 2000. Purification and characterization of two anionic trypsins from the hepatopancreas of carp. Fisheries Science 66, 1172-1179.

[3]. Castillo, I., Requena, T., de.Palencia, F., Fontecha, J., Gobbetti, M., 1999. Isolation and characterization of an intracellular esterase from *Lactobacillus casei* subsp. *Casei* IFPL 731. Journal of Applied Microbiology 86, 653-659.

[4]. Castillo-Yanez, F., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreno, F., Toro, M., 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine, *Sardinops sagax caerulea*. Comparative Biochemistry and physiology 140, 91-98.

[5]. Chich, J. F., Marchesseau, K., Gripon, J. C., 1997. Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCD0763: Purification and characterization. International Dairy Journal 7: 169-174.

[6]. Deguara, S., launcey, K., Agius, C., 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream.1 Fish Bioiology 62, 1033-1043.

[7]. Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J. C., Sonan, G., Feller, G., Gerday, C., 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. FEMS Microbiology Reviews 28, 25–42.

[8]. Holland, R., Coolbear, T., 1996. Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* E8. Journal of Diary Science 63, 131-140.

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

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

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

[12]. Jun-Sheng, L., Jian-Lin, L., Ting-Ting, W., 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid juvenile tilapia *(Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus)*. Fish Physiology and Biochemistry 32, 295-303.

[13]. Kamini, N. R., Fujii, T., Kurosu, T., Iefuji, H., 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. Process Biochemistry 36, 317-324.

[14]. Kazlauskas, R. J., Bornscheuer, U. T., 1998. Biotransformations with lipases. In: Rehm HJ, Pihler G, Stadler A, Kelly PJW, editors. Biotechnology.vol. 8. New York: VCH, pp. 37–192.

[15]. Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B., 2007a. Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Food chemistry 100, 1580-1589.

[16]. Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B., 2007b. Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). Comparative Biochemistry and Physiology 148, 382-389.

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

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

[19]. Leger, C., Bauchart, D., Flanzy, J., 1977. Some properties of pancreatic lipase in *Salmogairdeneii* Rich: K_m effects of bile salts and Ca^{2+}, gel filtrations. Comparative Biochemistry and Physiology 57, 359-363.

[20]. Lie, Q., Lambersten, G., 1985. Digestive lipolytic enzymes in cod (*Gadus morhua*): Fatty acid specificity. Comparative Biochemistry and Physiology 80, 447-450.

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

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

[23]. Matus de la Parra, A., Rosas, A., Lazo, J. P., Viana, M. T., 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. Fish Physiology and Biochemistry 33, 223-231.

[24]. Mukundan, M. K., Gopakumar, K., Nair, M. R., 1985. Purification of a lipase from the hepatopancreas of oil sardine (*Sardinella longiceps*) and its characteristics and properties. Science of Food and Agriculture 36, 191-203.

[25]. Patton, J. S., Warner, T. G., Benson, A. A., 1977. Partial characterization of the bile salt dependent triacylglycerols lipase from the leopard shark pancreas. Biochimica et Biophysica Acta 486, 322-330.

[26]. Shahidi, F., Hosseininejad, M., 2007. Enzymes in Food Industry, Press of Mashhad Ferdowsi 373p.

[27]. Xiong, D. M., Xie, C. X., Zhang, H. J., Liu, H. P., 2011. Digestive enzymes along digestive tract of a carnivorous fish *Glyptosternum maculatum* (Sisoridae, Siluriformes). Journal Animal Physiology and Animal Nutrition 95, 56-64.