جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۶، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۲۳

بررسی اثر دما و *pH* در فعالیت آنزیم لیپاز استخراج‌شده از بخش قدامی رودهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

❖ **نرگس انوشه:** گروه شیلات دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
❖ **سیدولی حسینی*:** گروه شیلات دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
❖ **رسول مدنی:** بخش بیوتکنولوژی مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
❖ **عباس زمانی:** گروه شیلات دانشکدهٔ منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه ملایر، ملایر، ایران
❖ **فریبا گلچین‌فر:** بخش بیوتکنولوژی مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

چکیده

آبزیان یکی از منابع مهم در تولید آنزیم‌های گوارشی از جمله لیپازها هستند. در این پژوهش، تأثیر دما و pH در فعالیت آنزیم لیپاز تخلیص‌شده از بخش قدامیِ رودهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد. برای تخلیص، از سولفات آمونیوم در راسب‌سازی و از اولترافیلتراسیون به منظور تغلیظ نمونه استفاده شد. فعالیت آنزیم به کمک سوبسترای نیتروفنیل پالمیتات در دماها و pHهای مختلف بررسی شد تا بهترین دما و pH برای فعالیت آنزیم و پایداری آن مشخص شود. نتایج نشان داد که دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم لیپاز استخراج‌شده از بخش قدامی رودهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به ترتیب ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد و ۸ است. پایداری دما و pH فعالیت آنزیم لیپاز مذکور به ترتیب در ۴–۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد و ۶–۸ نشان داده شد.

واژگان کلیدی: پایداری دمایی، فعالیت آنزیم، قزل‌آلای رنگین‌کمان، لیپاز.

* نویسندهٔ مسئول: تلفن: ۰۲۶-۳۲۲۲۳۰۴۴ فکس: ۰۲۶-۳۲۲۴۵۹۰۸ Email: hosseinisv@ut.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۱. مقدمه

در صنایع غذایی، آنزیم‌ها جزء ترکیباتی‌اند که به‌منزلهٔ کاتالیزور برای فرآوری مواد غذایی مختلف استفاده می‌شوند. استفادهٔ تجاری از آنزیم‌ها در صنایع غذایی نخست، محدود به تعداد کمی از محصولات مانند فرآورده‌های غذاییِ تخمیری بوده است، اما امروزه واکنش‌های آنزیمی نقش مهمی را در صنایع غذایی برای تولید محصولات متنوع ایفا می‌کنند که محققان علت را به عملکرد اختصاصی آنزیم‌ها همچنین، قابلیت بالای فعالیت آنها در غلظت‌های پایین و در شرایط مختلف دمایی و pH ذکر کرده‌اند (Kamini *et al.*, 2000).

لیپازها (triacylglycerol acylhydrolases; E.C. 3.1.13) از مهم‌ترین آنزیم‌های گوارشی و جزء آنزیم‌های هیدرولیتیکی‌اند و در سطح مشترک بین چربی و آب به‌منزلهٔ کاتالیزور عمل می‌کنند و تری‌گلیسریدها را به اسیدهای چرب و گلیسرول هیدرولیز می‌کنند (Islam *et al.*, 2008). این آنزیم‌ها دارای کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی و صنایع مرتبط با آن، به‌منزلهٔ کمک‌رسان فرآیند[1]، فرآوری روغن و تولید مواد روکشگر[2]ند (ibid). علاوه بر این، امکان استفادهٔ آنها در شوینده‌ها[3] و اصلاح ویژگی‌های تغذیه‌ای، حسی و فیزیکی تری‌گلیسریدهای موجود در غذای دام‌ها[4] و غیره موجب شده است که توجه ویژه‌ای به استخراج آنها از منابع جانوری و گیاهی معطوف شود (Aryee *et al.*, 2007) در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای دربارهٔ آنزیم‌های موجود در گونه‌های کم‌مصرف آبزی و ضایعات ناشی از فرآوری آبزیان انجام شده است؛ به دنبال این مطالعات استفاده و کاربرد آنزیم‌ها نیز در صنایع مختلف گسترش یافته است (Shahidi and Kamil, 2001; Lu *et al.*, 2008; Sila *et al.*, 2012). از جمله تحقیقاتی که دربارهٔ آنزیم لیپاز و ویژگی‌های آن انجام شده است می‌توان به این موارد اشاره کرد: در ایران حسینی و رضوی‌پور (۱۳۸۸) آنزیم لیپاز را از سویه‌های باسیلوس استخراج و محدودهٔ دما و pH بهینه برای فعالیت آن را تعیین کردند، آسوده و قنبری (۱۳۹۰) ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم لیپاز ترموفیل و آلکالوفیل جداشده از باسیلوس سوبتیلیس را بررسی کردند. Iijima و همکاران (۱۹۹۸) pH مناسب برای فعالیت لیپاز استخراج‌شده از هپاتوپانکراس ماهی *Pagrus major* را ۷–۹ تعیین کردند. Nayak و همکاران (۲۰۰۴) مشخص کردند که بهترین فعالیت لیپاز جداشده از رودهٔ ماهی *Labeo rohita* در دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد و pH ۷ است. Islam و همکاران (۲۰۰۸) دو نوع لیپاز از ماهی *Liza parsia* را بررسی کردند و بهترین فعالیت آنزیم‌ها را در دمای ۳۳–۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد و pH: ۸/۵–۸ مشخص کردند. دربارهٔ لیپاز ماهیان می‌توان گفت که معمولاً در دماهای پایین فعالیت پایدارتری دارند، البته زیستگاه و دما و شرایط زیست ماهی تأثیر عمده‌ای در فاکتورهایی مانند دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم دارد. همچنین، اندام و بخشی از بدن که برای استخراج لیپاز به کار می‌رود در تعیین محدودهٔ بهینهٔ عملکرد آنزیم مؤثر است. در مقایسه با دیگر آنزیم‌های هیدرولیتیک، مانند پروتئازها و کربوهیدرازها، لیپازها به نسبت کمتر مطالعه شده‌اند و در این میان لیپازهای موجودات آبزی نسبت به لیپازهای مشابه در پستانداران، گیاهان و منابع میکروبی کمتر شناخته شده‌اند و تحقیقات کمتری نیز دربارهٔ آنها انجام گرفته است.از طرف دیگر، در سال‌های اخیر پرورش قزل‌آلا در ایران

1. Processing Aid
2. Surfactant
3. Detergents
4. Modification of the Nutritional, Sensory and Physical Properties of the Triglycerides in Foodstuffs

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

رشد چشمگیری یافته است. به دنبال این روند رشد درخور توجه، مقدار زیادی از ضایعات از جمله امعا و احشای آنها به محیط وارد شده که منجر به آلودگی محیط زیست شده است. هر چند در برخی موارد از این ضایعات به منظور تولید آرد ماهی استفاده شده است، اما این شکلِ استفاده چندان مطلوب نیست. چرا که آنها حاوی مقادیر درخور ملاحظه‌ای از ترکیبات زیست‌فعال[1] ارزشمندند که با عملیاتی خاص می‌توان استفادهٔ بسیارِ مناسبی از آنها کرد. فعالیت آنزیم تحت تأثیر عواملی مانند دما، pH و غلظت سوبستراست. همهٔ پروتئین‌ها از جمله آنزیم‌ها در محدودهٔ خاصی از دما و pH فعالیت دارند و پایدارند. دما با تغییر ساختار و شکل آنزیم و در نهایت تغییر در عملکرد آن تأثیر خود را اعمال می‌کند؛ به‌طوری که، در دمای بیش از حد مناسب برای فعالیت، آنزیم غیر فعال می‌شود یا تغییر شکل می‌دهد. pH نیز یکی از فاکتورهای بسیار مهم و مؤثر در فعالیت آنزیم است؛ به گونه‌ای که، pH خارج از حد بهینه باعث تغییر شکل آنزیم و تغییر در سرعت واکنش می‌شود. دما و pH دو فاکتور اصلی مؤثر در فعالیت و کارایی آنزیم‌اند، چرا که سنجش فعالیت آنزیم در یک محدودهٔ فیزیولوژیکی دما و pH اطلاعات ارزشمندی دربارهٔ اختلافات بالقوه در فعالیت آنزیم در ماهی زنده به دست می‌دهد. همچنین، این داده‌ها برای شبیه‌سازی مناسب عمل گوارش تحت شرایط آزمایشگاهی مورد نیازند. معمولاً در مقادیر دما و pH فیزیولوژیکی، لیپاز فعالیت مناسبی دارد (Nolasco *et al.*, 2011). بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی و تعیین دما و pH مناسب برای فعالیت آنزیم لیپاز استخراج‌شده از رودهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

1. Bioactive Compounds

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. آماده‌سازی نمونه

از بین ماهیان آماده برای عرضه به بازار تعداد ۱۵ عدد ماهی قزل‌آلای زنده در وزن بازاری (میانگین وزن ۹۰۰ گرم) در دی ۱۳۹۱ از کارگاه خصوصی پرورش ماهی در کرج به صورت تصادفی انتخاب و به آزمایشگاه بیوشیمی بخش بیوتکنولوژی مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج منتقل شدند. رودهٔ ماهیان در حضور یخ جداسازی شد. نمونه‌های جداسازی‌شده در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تا زمان انجام‌دادن آزمایش نگهداری شدند؛ نمونه‌ها بعد از خروج از فریزر به مدت ۲ ساعت در دمای یخچال (۴ درجهٔ 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 (Islam *et al.*, 2009). نمونهٔ هموژن‌شده با استفاده از کاغذ صافی (Whatman grade No. 2, Lawrence, Kansas, USA) فیلتر شد و مواد باقی‌مانده روی فیلتر چندین بار با استون سرد شسته شد تا چربی‌زدایی به‌طور کامل انجام گیرد. سپس، مواد روی فیلتر به مدت یک شبانه‌روز در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود. پودر خشک‌شده با نسبت ۱ به ۱۰ با بافر استخراج (25mM Tris-HCl, pH=7.8, 5mM benzamidine-HCl, 1mM EDTA, 10%glycerol) مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. بعد از آن، در ۸۰۰۰g در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و به

مـدت ۴۵ دقیقـه سـانتریفیوژ (IEC Model B-22M programMable floor centrifuge, US) انجـام شـد. سپس، محلول رویی (سـوپرناتانت) بـه‌منزلـهٔ عصـارهٔ خام آنزیمی در نظر گرفته شد (Aryee *et al*., 2007).

۲.۲. راسب‌سازی با سولفات آمونیوم

نخست، عصارهٔ خام آنزیمی با بافر استخراج مخلـوط سپس، تا حصـول اشـباعیت ۶۰ درصـد بـا سـولفات آمونیـوم (Sigma, St. Louis, MO, USA)، بـا همـزن مغناطیسی (در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد بـه مـدت ۳ ساعت) مخلـوط شـد. سـپس، در ۸۰۰۰g و دمـای ۴ درجهٔ سانتی‌گـراد و بـه مـدت ۴۵ دقیقـه سـانتریفیوژ انجام شد. پس از آن، رسوب حاصل جمع‌آوری و بـا بافر استخراج مخلوط شد و بـه مـدت یـک شـب در مجاور بافر استخراج، در دمای ۴ درجهٔ سـانتی‌گـراد، عمل دیالیز درون کیسه‌های دیالیز (Sigma, St. Louis, MO, USA) انجام گرفت تا یون‌های سولفات آمونیوم حذف شوند. بعد از آن، در ۸۰۰۰g و دمـای ۴ درجـهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شـد. سپس، محلول از کاغذ صافی واتمن عبور داده شـد و پس از آن اولترافیلتراسـیون انجـام گرفـت تـا نمونـه تغلیظ شود. اولترافیلتراسیون برای تغلیظ و تا حدودی تخلـیص سـریع مـاکرومولکول‌هـاییماننـد پـروتئین طراحی شده است. این دستگاه دارای غشایی منفذدار است که قطر منافذ آن بسـیار کـم و تـا حـدود ۰/۰۱ میکرون است. مواد ریز از این منافذ عبور مـی‌کننـد و مواد درشت مانند پروتئین‌ها روی غشا باقی می‌ماننـد و در نتیجهٔ این عمل تغلیظ صورت می‌گیرد (ibid).

۳.۲. سنجش فعالیت آنزیم

برای سنجش فعالیت آنـزیم، ۱ میلـی‌لیتـر از محلـول سوبسـترا (۱/۶۵ میلـی‌مـولار سوبسـترای نیتروفنیـل پالمیتات(Sigma, St. Louis, MO, USA) حـل‌شـده در ایزوپروپانول) بـه ۹ میلـی‌لیتـر از بـافر-50 mM Tris HCl, pH=8, 0.4% Tween, 0.1% Arabic gum) اضافه شد سـپس، ۹۰۰ میکرولیتـر از ایـن محلـول بـا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونهٔ آنزیمی مخلـوط شـد. پـس از ۲۰ دقیقه انکوباسـیون در دمـای ۳۷ درجـهٔ سـانتی‌گـراد، قرائـت نـوری در طـول مـوج ۴۱۰ نـانومتر در اسپکتروفتومتر انجام سپس، فعالیت آنـزیم بـر اسـاس فرمول زیر محاسبه شد (Kordel *et al*.,1991):

$$\text{فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز (واحد در میلی‌گرم پروتئین)} = \frac{\text{حجم مخلوط واکنش (میلی‌متر)} \times 1000 \times \text{میزان جذب در 410 نانومتر}}{\text{میزان پروتئین (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)} \times \text{زمان واکنش (دقیقه)} \times 17500}$$

در این فرمول ۱۷۵۰۰ بیانگر ضـریب تـاریکی برای پارا- نیتروفنیـل اسـت کـه محصـول هیـدرولیز سوبسترای نیتروفنیل پالمیتات با آنزیم لیپاز است.

۴.۲. تعیین دمای بهینه

برای تعیین دمای بهینه، محلول سوبسترا بافر با نمونـهٔ آنزیمی مخلوط و به مـدت ۲۰ دقیقـه در دماهـای ۴، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد انکوباسیون شـد و بعد از آن فعالیت آنزیم سنجش شد (ibid).

۵.۲. تعیین دمای پایداری

برای تعیین دمای پایداری، نمونهٔ آنزیمی در دماهای ۴، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ برای ۳۰ دقیقه در حالت انکوباسیون قرار گرفت. در پایان دورهٔ انکوباسـیون نمونـهٔ آنزیمـی به سرعت سرد شد سپس، با محلـول سوبسـترا- بـافر مخلوط و برای ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد

در حالت انکوباسیون قرار گرفت (ibid)؛ سپس، فعالیت نسبی آنزیم بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{فعالیت نسبی} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم بر نمونه حرارت داده‌شده}}{\text{فعالیت اختصاصی در نمونه شاهد (بدون حرارت بدهی)}} \times 100$$

۶.۲. تعیین pH بهینه

برای تعیین pH بهینه، نخست محلول سوبسترا بافر با pHهای مختلف (جدول ۱) تهیه سپس، با نمونهٔ آنزیمی مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به حالت انکوباسیون قرار گرفت و فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد (ibid).

جدول ۱. انواع بافرهای مورد استفاده برای آماده‌سازی محلول بافر- سوبسترای ۱/۶۵ میلی‌مولار نیتروفنیل پالمیتات

pH	بافر
۶	۰/۲ مولار بافر فسفات
۷	۰/۲ مولار بافر فسفات
۸	۰/۲ مولار بافر تریس
۹	۰/۲ مولار بافر کربنات–بیکربنات

۷.۲. تعیین pH پایداری

برای تعیین pH پایداری، نخست نمونهٔ آنزیمی با بافرهای مختلف (جدول ۲) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آبی با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، نمونهٔ آنزیمی انکوبه‌شده با محلول سوبسترا مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت (ibid)؛ فعالیت نسبی از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{فعالیت نسبی} = \frac{\text{فعالیت اختصاصی آنزیم بر نمونه انکوبه‌شده با pH مختلف}}{\text{فعالیت اختصاصی در نمونه شاهد}} \times 100$$

جدول ۲. بافرهای مورد نیاز برای انکوباسیون نمونهٔ آنزیمی در بررسی پایداری pH

pH	بافر
۲	۰/۲مولار بافر پتاسیم کلراید
۴	۰/۲مولار بافر استات
۶	۰/۲مولار بافر فسفات
۸	۰/۲مولار بافر فسفات

۸.۲. آنالیز آماری

برای بررسی وجود یا نبود تفاوت معنی‌دار بین میانگین نتایج از تجزیهٔ واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد. میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند. همهٔ ارزیابی‌ها نیز در ۳ تکرار انجام گرفت. برای آنالیز نتایج و رسم نمودارها از نرم‌افزارهای SPSS 17 و Excel استفاده شد.

۳. نتایج

بر اساس نتایج، دمای بهینه برای فعالیت آنزیم لیپاز تخلیص‌شده از رودهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد بود؛ به‌طوری که، از دمای ۴ تا ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد فعالیت آنزیم لیپاز به‌طور معنی‌داری افزایش و از ۴۰ تا ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد فعالیت آن به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. پایداری دمایی نیز نشان داد که با افزایش دما از ۳۰ به ۴۰ فعالیت آنزیم افزایش و از ۴۰ تا ۶۰ فعالیت آن کاهش می‌یابد. بررسی پایداری pH آنزیم لیپاز نشان داد که با افزایش pH از ۲ تا ۴ فعالیت آنزیم به‌طور معنی‌داری افزایش و از ۴ تا ۶ فعالیت آن به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در محدودهٔ pH ۶–۸ کاهش فعالیت آنزیم معنی‌دار نبود و آنزیم در این محدوده فعالیت پایداری داشت. pH بهینه برای فعالیت آنزیم لیپاز ۸ بود به‌طوری که، pH از ۶ تا ۸ افزایش و از ۸ تا ۹ کاهش یافت.

جدول ۳. اثر دما در فعالیت نسبی آنزیم لیپاز قزل‌آلای رنگین‌کمان (دمای بهینه)

دما	میانگین فعالیت ± انحراف معیار
۴	۷۷/۴±۰/۹۷[c]
۳۰	۸۷/۴±۰/۵[b]
۴۰	۹۳/۷±۱/۲[a]
۵۰	۶۴/۶±۰/۹۶[d]
۶۰	۴۴/۷±۰/۹[e]

اختلاف بین آن دسته که حرف مشترک ندارند معنی‌دار است.

جدول ۴. اثر دما در فعالیت نسبی آنزیم لیپاز قزل‌آلای رنگین‌کمان (دمای پایداری)

دما	فعالیت ± انحراف معیار
۴	۹۷/۲±۱/۲[a]
۳۰	۹۲/۲±۱/۳[b]
۴۰	۹۸/۰±۱/۵[a]
۵۰	۷۰/۱±۱/۳[c]
۶۰	۶۵/۷±۱/۱[d]

اختلاف بین آن دسته که حرف مشترک ندارند معنی‌دار است.

جدول ۵. اثر pH در فعالیت نسبی آنزیم لیپاز قزل‌آلای رنگین‌کمان (pH بهینه)

pH	فعالیت ± انحراف معیار
۶	۱۰/۸±۱/۲[d]
۷	۱۸/۰±۱/۵[c]
۸	۴۱/۱±۱/۱[a]
۹	۲۷/۲±۱/۳[b]

اختلاف بین آن دسته که حرف مشترک ندارند معنی‌دار است.

جدول ۶. اثر pH در فعالیت نسبی آنزیم لیپاز قزل‌آلای رنگین‌کمان (pH پایداری)

pH	فعالیت ± انحراف معیار
۲	۳۲/۰۰±۱/۱[b]
۴	۵۱/۹۴±۱/۳[a]
۶	۳۲/۰۰±۱/۲[b]
۸	۳۱/۰۰±۱/۵[b]

اختلاف بین آن دسته که حرف مشترک ندارند معنی‌دار است.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

بسیاری از لیپازها از منابع مختلف تخلیص شده‌اند و از نظر ویژگی‌هایی نظیر فعالیت، پایداری نسبت به دما و pH، اثر یون‌های فلزی و سایر خصوصیات شیمیایی بررسی شده‌اند (Sharma *et al*., 2001). در سال‌های اخیر، به آنزیم‌های آبزیان به علت خواص منحصر به فردی مانند داشتن فعالیت بالا در دما و pHهای مختلف توجه ویژه‌ای شده است (Klomklao, 2008). عمدهٔ محققان وجود لیپازها و فعالیت‌های لیپولیتیک را در غدد هاضمه (digestive glands)، کبد و بافت‌های چربیِ (adipose tissues) گونه‌های مختلف آبزیان گزارش کرده‌اند (Aryee *et al*., 2007).

به نظر بسیاری از محققان لولهٔ گوارش ماهی، به خصوص زوائد پیلوریک و روده، محل آنزیم‌های گوارشی (پروتئازها، لیپازها و آمیلازها) با فعالیت بالاست (Deguara *et al*., 2003; Jun-Sheng *et al*., 2006; Xiong *et al*., 2011). در این تحقیق اثر pH و دما در فعالیت آنزیم لیپاز تخلیص‌شده از بخش قدامی رودهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد. بر اساس نتایج، آنزیم لیپاز استخراج‌شده از رودهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای ۴-۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد و pH=۶-۸ فعالیت پایداری داشت. دما و pH بهینه برای لیپاز تخلیص‌شده در این مطالعه به ترتیب ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد و ۸ بود. بسیاری از مطالعات pH بهینه برای فعالیت لیپاز را بین ۷-۹ تعیین کرده‌اند (Iijima *et al*., 1998; Aryee *et al*., 2007; Noriega-Rodriguez *et al*., 2009; Smichi *et al*., 2010). با افزایش دما، به علت دناتوره‌شدن پروتئین فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. همچنین، قزل‌آلای رنگین‌کمان ماهی سردابی است و از آنجا که این ماهی در دماهای پایین زیست می‌کند بنابراین، آنزیم‌های این گونه نیز در دمای پایین آداپته و در دماهای بالا دناتوره می‌شوند و فعالیت خود را از دست می‌دهند. تفاوت در دمای بهینه برای ماهیان مختلف بستگی به دمای زیستگاه آبزی (Borlongan, 1990) و پایداری دمایی لیپازها دارد (Sukarno *et al*., 1996).

در زمینهٔ آنزیم لیپاز و ویژگی‌های بیوشیمیایی آن تحقیقاتی انجام شده است. آنزیم لیپاز از هپاتوپانکراس ماهی red sae bream (*Pagrusmajor*) بررسی شد و نتایج نشان داد که فعالیت این آنزیم در pH: ۷-۹ مناسب بود (Iijima *et al*., 1998). آنزیم‌های لیپاز جداشده از بخش روده و هپاتوپانکراس در pH خنثی و تا حدی قلیایی فعالیت بهتری دارند. تحقیقی دربارهٔ استخراج و بررسی ویژگی‌های شیمیایی آنزیم لیپاز از رودهٔ ماهی rohu (*Labeorohita*, Cyprinidae) انجام شد؛ نتایج این تحقیق نشان داد که بهترین فعالیت آنزیم در دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد و pH ۷ بود (Nayak *et al*., 2004). دو نوع

آنزیم از عضلات پشتی ماهی کفال استخراج شد و ویژگی‌های آنها بررسی شد. بر اساس نتایج، بهترین pH برای فعالیت این آنزیم‌ها ۸–۸/۵ و پایداری فعالیت آنها در pH: ۲/۵–۱۰/۵ بود و حداکثر فعالیت آنزیم در ۳۳–۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد نشان داده شد. لیپازهای جداشده از عضلات پشتی معمولاً در pH کمتری نسبت به لیپازهای استخراج‌شده از امعا و احشای ماهی فعالیت بهینه دارند. لیپازهای بخش امعا و احشا، به ویژه روده و پانکراس، در pH قلیایی فعالیت بیشتری دارند. بر اساس بررسی‌ای که دربارهٔ استخراج آنزیم لیپاز از امعا و احشای ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) و خصوصیات بیوشیمیایی آن انجام شد، مشخص شد که بیشترین فعالیت آنزیم در pH=۸ و دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد و بیشترین پایداری در pH=۴–۱۰ و دمای ۱۰ تا ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد بود (Aryee *et al*., 2007). لیپازی که از زوائد پیلوریک ماهی seabream (*Sparus aurata*) استخراج شد در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد و pH=۸/۵ بیشترین فعالیت را داشت. این آنزیم در pH قلیایی نسبت به pH اسیدی پایداری بیشتری را نشان داد (Nolasco *et al*., 2011). به‌طور کلی، با توجه به بخشی از بدن ماهی که آنزیم از آن جداسازی و بررسی می‌شود دامنهٔ pH و دمای پایداری برای فعالیت آنزیم متفاوت است. بنا بر نتایجی که در مطالعات ذکرشده در بالا گفته شد، چنین برداشت می‌شود که آنزیم استخراج‌شده از آبزیان در دماهای پایین فعالیت بیشتری دارد؛ در نتیجه برای غیرفعال‌کردن آنها نیازی به حرارت بالا نیست و در برخی موارد دمای محیط در این خصوص کافی است. بنابراین، از یک طرف باعث صرفه‌جویی در انرژی و از طرف دیگر، مانع تغییر در کیفیت فرآوردهٔ تولیدشده به کمک آنزیم می‌شود. نتایج این پژوهش در صنایع، خصوصاً صنایع غذایی، اهمیت و کاربرد دارد. با توجه به اینکه بسیاری از مواد غذایی به دمای بالا حساس‌اند، آنزیم آبزیان که در دماهای پایین فعالیت بهتری دارد در این صنایع می‌تواند استفاده شود. از آنجا که در این مطالعه آنزیم لیپاز روده بررسی شده است، بنابراین، در pH قلیایی نسبت به pH اسیدی فعالیت بیشتری نشان می‌دهد. اختلاف در دمای بهینه برای فعالیت لیپاز در این پژوهش و مطالعاتی که در بالا به آن اشاره شد می‌تواند به علت اختلاف در زیستگاه و دمای زیست موجود زنده باشد. به‌طوری که، ماهی قزل‌آلا، که گونه‌ای سردابی است، آنزیم جداشده از آن حتی در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد دارای فعالیت پایداری است.

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]. Asoodeh, A., Ghanbari, T., 2011. Lipase biochemical features alkalo - thermophilic Bacillus subtilis strain isolated from DR8806. Seventh National Biotechnology Congress of Iran, Tehran - Institute for Energy.

[3]. Borlongan, I.G., 1990. Studies on the Digestive Lipases of Milkfish, *Chanos chanos*, Aquaculture 89, 315-325.

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

[5]. Hosseini, F., Razavipour, R., 2009. Optimization of lipase production by Bacillus strains isolated from activated sludge. Journal of Microbiology, First year (3).

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

[7]. 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(4), 243-255.

[8]. 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 × Oreochromis aureus).* Fish Physiology and Biochemistry 32, 295-303.

[9]. 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.

[10]. Klomklao, S., 2008. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 30 (1): 37-46.

[11]. Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D., Schmid, R., 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. Journal of Bacteriology173, 4836–41.

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

[13]. Nayak, J., Nair, P.G.V., Mathew, S., Ammu, K., 2004. A study on the intestinal lipase of India major carp (*Labeo rohita*). Asian Fisheries Science 17, 333-340.

[14]. Nolasco, H., Moyano-Lopez, F., Vega-Villasant, F., 2011. Partial characterization of pyloric-duodenal lipase of gilthead seabream *(Sparus aurata)*. Fish Physilogy and Biochemistry 37, 43-52.

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

[16]. 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.

[17]. Sharma, R., Chistiww, Y., Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advance 19, 627-662.

[18]. 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.

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

[20]. Sukarno, K., Takahashi, M., Hatano, Y., Sakurai, Y. 1996. Lipase from neon flying Squid hepatopancreas: Purification and properties. Food Chemistry, 57(4): 515-521.

[21]. 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(1), 56-64.