بررسی میزان آنزیم و فعالیت آنزیماتیک پروتئازهای موجود در شیرابه اندام‌های هوایی مختلف انجیر بومی خراسان در فصول مختلف سال

امید رجبی[1]*، جواددانای باغکی[2]، عبدالرضا وارسته[3]، لیلا جهانگیری[4]، علی براتیان[4]

۱- استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد و مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی
۲- داروساز، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳- دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد و مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی
٤- دانشجوی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
* آدرس مکاتبه: مشهد، بلوار وکیل آباد، مجتمع دانشگاه فردوسی، دانشکده داروسازی، گروه شیمی دارویی، صندوق‌پستی: ۱۳٦۵ – ۹۱۷۷۵، تلفن: ۸۸۲۳۲۵۵ (۰۵۱۱)، نمابر: ۸۸۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱)
پست الکترونیک: omidrajabi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸٤/۷/۳۰ **تاریخ تصویب:** ۸۵/۹/۱۳

چکیده

مقدمه: شیرابه گیاه انجیر به عنوان منبعی غنی از آنزیم پروتئاز فیسین مدت‌ها است که شناخته شده و این آنزیم کاربرد وسیعی در زمینه تهیه مواد خوراکی، دارویی و تشخیص طبی دارد. گیاه انجیر به خوبی در استان خراسان رضوی قابل پرورش و باروری است.

هدف: تعیین میزان شیرابه در این گیاه برای تعیین بهترین زمان و اندام برای استحصال شیرابه. بنابراین این گیاه را از نظر میزان آنزیم موجود در شیرابه‌اش بررسی کردیم.

روش بررسی: در این بررسی اندام‌های هوایی که در آنها شیرابه جریان دارد (سرشاخه، تنه، برگ و میو نارس) انتخاب، و شیرابه موجود به روش خراش دادن توسط تیغ جمع‌آوری شد. به منظور بررسی تاثیر فصل بر میزان و فعالیت آنزیم، جمع‌آوری شیرابه‌ها در فصول مختلف انجام گردید.

روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی مبتنی بر تاثیر آنزیم بر سوبسترای کازیین بود. فعالیت آنزیمی در مقایسه با فعالیت آنزیمی محلول استاندارد پاپائین تعیین گردید. در این مطالعه غلظت یون کلسیم موجود در شیرابه به عنوان یک فعال‌کننده آنزیمی بررسی شد.

یافته‌ها: فعالیت پروتئازی شیرابه انجیر بومی خراسان ۵۰ الی ۱۰۰ بار بیشتر از پاپاین به دست آمد. میزان فعالیت آنزیمی فیسین در اندام‌ها و فصول مختلف متفاوت بوده و با فصل تغییر می‌کند. میزان یون کلسیم شیرابه هم وابسته به فصل و اندام می‌باشد.

نتایج: بهترین فصل جمع‌آوری شیرابه جهت استحصال فیسین پاییز و بهترین اندام جهت این منظور سرشاخه‌های جوان است.

گل‌واژگان: انجیر، فیسین، فعالیت ویژه، فصل

مقدمه

انجیر درختی است که در کتب طب سنتی از آن بسیار نام برده شده [۱]، این گیاه از خانواده Moraceae است و نام علمی آن *Ficus carica* L. است [۱،۲]. این گیاه خزان‌کننده است. ارتفاع درختچه انجیر تا ۱۲ متر نیز می‌رسد و طول برگ‌های آن بین ۱۸ تا ۳۵ سانتی‌متر است. دمبرگ آن بین ۱/۵ تا ۵ سانتی‌متر طول دارد [۲]. فصل گل‌دهی انجیر در اواخر زمستان تا اواسط بهار است و تشکیل میوه آن در تابستان و پاییز است [۱]. پراکندگی جغرافیایی انجیر در اروپا، ترکیه، ایران، قفقاز، آسیای مرکزی، افغانستان عراق، سوریه، اردن و لبنان است. در ایران این گیاه بیشتر در شمال، شمال غرب و شمال شرق یافت می‌شود [۳].

از ساقه‌های جوان گیاه و به خصوص از میوه نارس آن شیرابه سفید رنگی در اثر خراش دادن خارج می‌شود که طعم گس و کمی تلخ و تند دارد. در شیرابه ترکیباتی از جمله پروتئین‌ها، آلکالوییدها، نشاسته، قند روغن، تانن، رزین و صمغ وجود دارند [۲]. عمده پروتئین شیرابه (۹۰ درصد) را پروتئازی به نام فیسین تشکیل می‌دهد [۳]. شیرابه توسط سلول‌های شیرابه‌ساز ساخته می‌شود و در مجاورت هوا منعقد می‌گردد. نقش احتمالی شیرابه برای گیاه محافظت آن در برابر دشمنان خارجی منجمله حشرات است [٤]. شیرابه انجیر محرک و سوزاننده است و حتی در صورتی که به طور اتفاقی وارد چشم شود می‌تواند منجر به کوری گردد [۲].

شیرابه انجیر به واسطه وجود آنزیم فیسین کاربردهای متنوعی دارد که از آن جمله می‌توان به استفاده از آن در صنایع پنیرسازی [۵]، صنایع گوشت و کالباس [٦،۷]، صنایع صابون‌سازی و صنعت چسب [۸] اشاره نمود. در طب سنتی از آن به عنوان داروی برطرف کننده زگیل و میخچه و در درمان کرم آسکاریس استفاده شده است [۱،۹،۱۰].

فیسین[1] از گروه سیستئین پروتئازها است. سردسته این گروه آنزیمی است به نام پاپایین[2] که از خربزه درختی[3] به دست می‌آید [۱۱].

پاپایین نخستین آنزیم سولفیدریلی است که کشف شده و برای سال‌ها موضوع مطالعات ساختمانی و مکانیسمی بوده است [۱۲]. اطلاعات ما در مورد آنزیم فیسین کامل نیست و هنوز توالی کامل اسیدهای آمینه آن مشخص نگردیده، (swiss-prot upto 2006) اگرچه توالی اسیدهای آمینه اطراف محل فعالیت آنزیم مشخص شده است [۱۱،۱۳،۱٤]. از نظر عملکرد، فیسین بسیار شبیه به سر گروه خود یعنی پاپایین است [۱۱]. پاپایین، آنزیم تک رشته و کروی شکل است و حاوی ۲۱۲ اسید آمینه است. بیشترین فعالیت را در pH بین ۵/۵ الی ۷ دارا است در عین حال در pH خنثی بسیار پایدار است. پاپایین در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد برای ٦ تا ۱۲ ماه پایدار است.

این آنزیم در دمای بالا نیز از خود مقاومت نشان می‌دهد [۱۲].

از عوامل پایدارکننده پاپایین می‌توان به دی مرکاپتو پروپانول، EDTA و سیستئین اشاره کرد. این آنزیم حاوی ٦ پیوند دی سولفیدی و یک گروه گوگردی آزاد (سولفیدریل) است که محل فعال آنزیم را تشکیل می‌دهد. گروه سولفیدریل مذکور مربوط به سیستئین شماره ۲۵ است. این آنزیم دارای دو دومین و یک شکاف عمیق بین آنها است، به طوری‌که سیستئین ۲۵ در این شکاف قرار دارد و مربوط به ساختمان آلفا- هیلیکس دومین سمت چپ است و حلقه ایمیدازول اسید آمینه هیستیدین شماره ۱۵۹ قسمتی از ساختمان صفحه‌ای بتا در دومین راست است. این حلقه ایمیدازول با آسپارژین شماره ۱۷۵ پیوند هیدروژنی می‌دهد که از هر گونه حرکت حلقه جلوگیری می‌کند [۱۲،۱۵].

مکانیسم هیدرولیز باند پپتیدی سوبسترا با حمله نوکلئوفیلی گروه سولفیدریل سیستئین ۲۵ شروع می‌شود و منجر به تشکیل واسطه‌های آسیل- آنزیم تترا هدرال می‌شود [۱۵].

نام فیسین اولین بار توسط Walti A. و در سال ۱۹۳۸ برای آنزیم‌های جدا شده از شیرابه انجیر گذاشته شد [۱۱]. این آنزیم دارای جرم مولکولی حدود ۲۵ کیلو دالتون است [۱٦]. فیسین ۱۷٤ اسید آمینه دارد که ۲۱/۸ درصد آن‌ها اسیدی ۲/۵ درصد آن‌ها بازی و ۷۹/۷ درصد آن‌ها اسیدهای آمینه خنثی

[1] EC 3.4.22.3
[2] EC 3.4.22.2
[3] *Carica papaya*

Archive of SID

هستند [۱۷]. بیشترین پایداری فیسین در pH بین ۵/٦ تا ۷/٦ و در حضور بافر فسفات ۰/۰۵ مولار به ثبت رسیده است. نیمه عمر فعالیت فیسین در دماهای ۵۰، ۵۵ و ٦۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۳۰۸۰، ۵۲۰ و ۸۲ دقیقه گزارش گردیده است [۲۵]. انرژی لازم برای غیرفعال کردن فیسین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۷۱/۷ کیلوکالری بر مول است.

کینتیک غیرفعال‌سازی آن در اثر حرارت از نوع درجه اول نیست [۱۸]. این آنزیم در ۸۰/٦ درجه سانتی‌گراد کاملاً غیرفعال می‌شود [۷]. از فیسین حدود ۱۰ ایزو آنزیم شناسایی شده‌اند [۱۹]. این ایزو آنزیم‌ها فقط از نظر نقطه ایزو الکتریک با هم تفاوت دارند [۲۰]. ثابت مکالیس منتون برای فیسین ۰/۱۲۵ (در pH= ٦/۵) تعیین گردیده است. این رقم در مقایسه با پاپایین (۰/۰۰٦ در pH= ۷) بسیار بزرگ است [۲۱].

ضریب خاموشی مولی فیسین در ۲۵۳/۷ nm برابر با ۰/۰۱۳ است [۲۲].

فعال‌کننده‌های فیسین عبارتند از: H_2S [۲۲]، سیستئین [۲۲،۷]، یون کلسیم [۲۳]، گلوتاتیون [۲٤] سیانید سدیم [۱۸،۲٤]، تیوگلیکولیک اسید و EDTA [۲٤]. از مهارکننده‌های فیسین می‌توان از کلرید جیوه، [۲۱] آب اکسیژنه و یدواستیک اسید نام برد [۱۱].

روش‌های مختلفی برای تعیین فعالیت آنزیمی فیسین ذکر گردیده که از آن جمله می‌توان به روش‌های زیر اشاره کرد:

روش ترسیب کازئین[1] [۱۲،۲٤،۲۵]، روش Northrop-Kunitz [۲٦]، روش استفاده از همو گلوبین غیرطبیعی شده [۲٦]، روش استفاده از فیلم ژلاتین [۲۷]، روش تعدیل شده E. Schwerdffeger [۲۵] و در نهایت روش استفاده از کیت‌های تعیین فعالیت پروتئازی مثل روش کیت آزو-کازیین[2] و کیت پان وان بیکن[3].

در این مقاله از روش ترسیب کازئین (روش Kunitz) برای تعیین فعالیت پروتئازی فیسین موجود در شیرابه انجیر استفاده گردید. علت استفاده از این روش سادگی، دقت و تکرارپذیری روش است [۱۱].

[1] Kunitz
[2] Azo-Casein
[3] Pan van Beacon

با عنایت به مصارف مختلفی که برای شیرابه انجیر و پروتئازهای موجود در آن ذکر گردید، پیدا کردن بهترین فصل جمع‌آوری و بهترین اندام جهت جمع‌آوری شیرابه از اهمیت خاصی برخوردار است. در این مقاله سعی شده است که میان اندام‌های هوایی مختلف (برگ، سرشاخه، تنه و میوه نارس) از نظر میزان پروتئاز و فعالیت پروتئازی مقایسه‌ای صورت گیرد. همچنین در بین فصول مختلف (بهار، تابستان و پاییز) بهترین فصل جهت جمع‌آوری انتخاب شود.

مواد و روش‌ها

شیرابه انجیر مورد استفاده در این تحقیق به صورت تازه از درختان انجیر اطراف دانشکده داروسازی مشهد (ایران ۱۳۸۲) جمع‌آوری گردیده و مدت کوتاهی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جنس و گونه درخت توسط هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد تعیین گردید. پاپایین و فیسین از شرکت Sigma(آلمان) خریداری گردید. کازئین، تری کلرو استیک اسید، آمونیوم بی‌کربنات، سدیم کلراید، سدیم فسفات و کلسیم کلراید از شرکت Merck (آلمان) خریداری شدند.

تهیه نمونه: شیرابه‌های جمع‌آوری شده بلافاصله با شتاب ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. محلول شفاف زیرین از پلی‌مر چسبنده رویی جدا و در میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری گردید [۱۱].

تعیین مقدار پروتئین تام

اندازه‌گیری پروتئین تام به روش بیوره صورت گرفت. در این اندازه‌گیری از دستگاه اتوآنالایزر (Technicon RA1000) (ساخت آمریکا) استفاده گردید. جهت دستیابی به صحت مناسب هر اندازه‌گیری ۳ مرتبه تکرار گردید و میانگین آن به همراه انحراف از معیار در بخش نتایج ارایه می‌گردد [۲۸].

تعیین میزان یون Ca^{2+}

کاتیون کلسیم به روش تیتراسیون کمپلکسومتری (کمپلکس کلسیم با Cresolphthaline) و با استفاده از کیت و دستگاه

Archive of SID

(Technicon RA1000) (ساخت آمریکا) و در محیط قلیایی اندازه‌گیری شد، حساسیت روش، mg/dL ۰/۱ است [۲۹].

تعیین فعالیت پروتئولتیک نمونه‌های شیرابه

محلول‌ها و بافرهای مورد استفاده جهت تعیین فعالیت پروتئازی شیرابه‌ها عبارت بودند از: بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH= ۷/۲)، محلول اسیدسولفوریک ۰/۰۵ مولار، محلول بافر فسفات – سیستئین – EDTA با pH= ٦ (۷/۱ گرم سدیم فسفات دی بازیک بدون آب، ١٤ گرم سدیم EDTA دوآبه، ٦/١ گرم سیستئین هیدروکلراید یک آبه برای تهیه ۱ لیتر بافر) محلول تری کلرو استیک اسید۳۰ درصد، محلول سوبسترای کازئین (محلول ۱ درصد کازئین در بافر فسفات M ۰/۰۵) استوک پاپائین (۱۰۰ میلی‌گرم پاپائین USP با فعالیت (IU/mg) ۳۰۰۰۰ در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات– سیستئین – EDTA).

از محلول استوک پاپائین رقت‌های ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲، ١٤، ١٦، ۱۸ و ۲۰ میلی‌گرم در۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات – سیستئین – EDTA ساخته شد.

روش رسم نمودار استاندارد فعالیت پاپائین: از محلول کازئین تهیه شده، ۵ میلی‌لیتر درون ۲۰ لوله آزمایش درب‌دار می‌ریزیم (۱۰ عدد از لوله‌ها مربوط به بلانک و ۱۰ عدد مربوط به استانداردها)، و به مدت ۱۵ دقیقه لوله‌ها را در حمام آب گرم با دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا به تعادل دمایی برسند. بعد از اتمام این زمان به هرکدام از لوله‌ها، ۲ میلی‌لیتر از هر رقت پاپائین استاندارد اضافه گردید و به ۱۰ لوله مربوط به بلانک ابتدا ۳ میلی‌لیتراز محلول تری کلرو استیک اسید و سپس۲ میلی‌لیتر از رقت‌های فوق‌الذکر افزوده شد.

به محض افزودن نمونه‌های استاندارد و بلانک به سوبسترا زمان یادداشت شد و لوله‌ها به مدت ٦٠ دقیقه در حمام ٤٠ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. طی این مدت چندین بار لوله‌ها در حمام تکان داده شدند. به تدریج با گذشت زمان محتوای لوله‌های استاندارد شیری‌تر و کدرتر می‌شوند که نشان از هیدرولیز آنزیماتیک کازئین توسط آنزیم پاپائین است. پس از طی شدن زمان ٦٠ دقیقه واکنش در لوله‌های استاندارد با اضافه کردن ۳ میلی‌لیتر از محلول تری کلرو استیک اسید متوقف شد. لوله‌ها برای مدت ۳۰ دقیقه دیگر نیز در حمام ٤٠ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شدند تا از انعقاد تمام پروتئین‌ها اطمینان حاصل گردد. پس از طی شدن زمان مذکور لخته‌های پروتئینی توسط کاغذ صافی واتمن شماره ٤٢ جدا شده و محلول شفافی حاصل گردید.

جذب محلول‌های حاصله از لوله‌های استاندارد در مقابل بلانک متناظر خود در nm ۲۸۰ اندازه‌گیری شد. بدین‌ترتیب رابطه بین میزان جذب در nm ۲۸۰ با غلظت و فعالیت پاپائین مشخص می گردد [۱۱].

تعیین فعالیت شیرابه انجیر از اندام‌های مختلف و در فصول متفاوت: فعالیت آنزیماتیک شیرابه‌های اندام‌های مختلف هوایی انجیر مشابه آنچه در قسمت روش رسم نمودار استاندارد فعالیت پاپائین ذکر شد، تعیین گردید. به روش آزمون و خطا مشخص شدکه رقت‌های بین ۰/۰۰۰٤ تا ۰/۰۰۲ درصد (v/v) از شیرابه اندام‌های مختلف هوایی انجیر از نظر فعالیت در نمودار استاندارد رسم شده فعالیت پاپائین قرار می‌گیرند. بدین ترتیب رقت‌های مختلف از شیرابه انجیر تهیه گردید و با استفاده از نمودار استاندارد رسم شده فعالیت پاپائین، فعالیت هر رقت تعیین شد. با عنایت به اینکه حجم شیرابه مورد استفاده و غلظت پروتئین آن مشخص است می‌توان نمودار فعالیت آنزیماتیک هر رقت را نسبت به وزن پروتئین (mg) موجود درآن رسم نمود.شیب نمودار به دست آمده فعالیت (IU) بر واحد وزن (mg) است. نمودارهای فوق برای هر اندام و در فصول مختلف رسم شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: برای بالا بردن ضریب اطمینان نتایج به دست آمده هرآزمون حداقل سه مرتبه تکرار گردید. داده‌ها به صورت میانگین و همراه انحراف معیار گزارش شده است. به منظور بررسی اختلاف آماری بین گروه‌ها (از نظر اندام و فصل جمع‌آوری) از آزمون ANOVA و سپس TUCKY KARAMER استفاده گردید.

Archive of SID

$p< ۰/۰۰۰۱$ به عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

اطلاعات به دست آمده از میزان پروتئین در اندام‌های مختلف هوایی شیرابه انجیر در فصول مختلف سال در نمودار شماره ۱ خلاصه شده است.

رسم نمودار استاندارد فعالیت پاپائین: نمودار استاندارد پاپائین در غلظت‌های (mg/100 ml) ۱۸،۱۶،۱۴،۱۲،۱۰،۸،۶،۴،۲ و ۲۰ در مقابل جذب محلول سوبسترا پس از واکنش با آنزیم در طول موج ۲۸۰ nm ترسیم شد.

تعیین فعالیت آنزیماتیک: با داشتن نمودار استاندارد رابطه بین غلظت‌های مختلف پاپائین وجذب محلول سوبسترا پس از واکنش با آنزیم در طول موج ۲۸۰ nm، می‌توان فعالیت آنزیماتیک رقت‌های مختلف شیرابه اندام‌های هوایی انجیر را به دست آورد.

اطلاعات حاصل از آزمایش‌ها روی محلول‌های استاندارد پاپائین به صورت نمودار شماره ۲ نمایش داده شده است و معادله خط حاصل محاسبه شد: $Y=8.3\times10^{-5}X+0.039$.

با عنایت به معادله خط حاصل از نمودار فعالیت در برابر جذب محلول استاندارد پاپائین در حضور سوبسترای کازئین می‌توان جذب‌های نمونه‌های مربوط به سوبسترای کازئین بعد از تاثیر شیرابه انجیر در طول موج ۲۸۰ نانومتر را در معادله فوق قرار داده و فعالیت آنزیمی فیسین موجود را به دست آورد. با داشتن مقدار پروتئین تام موجود در شیرابه که به روش بیوره تعیین گردید و با توجه به اینکه ۹۰ درصد پروتئین موجود در شیرابه، فیسین است [۱۹]، می‌توان رابطه میان میزان فعالیت و مقدار فیسین موجود در شیرابه را به دست آورد. به عنوان نمونه رابطه بین فعالیت و میزان فیسین موجود در شیرابه سرشاخه انجیر در فصل تابستان در قالب نمودار شماره ۳ ذکر می‌گردد.

فعالیت ویژه آنزیمی بنا به تعریف میزان فعالیت آنزیم به ازای هر میلی‌گرم از آنزیم تعریف می‌گردد. لذا میزان فعالیت ویژه هر اندام در هر فصل از شیب نمودار میزان فعالیت در مقابل وزن پروتئین (میلی‌گرم) به دست می‌آید. برای مثال در نمودار شماره ٤ شیب خط حاصل (که فعالیت ویژه آنزیم فیسین موجود در شیرابه سرشاخه است) عبارت است: $Slope = 2.227\times10^{6} \pm 2.208\times10^{5}(IU/mg)$.

به همین ترتیب میزان فعالیت ویژه فیسین موجود در شیرابه اندام‌های مختلف هوایی گیاه انجیر تعیین شد که در جدول شماره ۱ درج شده است.

نتایج تعیین مقدار Ca^{2+}: مقادیر Ca^{2+} در فصول مختلف سال و در شیرابه اندام‌های هوایی مختلف تعیین گردیدند که اطلاعات آن در جدول شماره ۲ ارایه شده است.

نتایج آماری: نتایج آماری حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار در میزان پروتئین و فعالیت آنزیمی شیرابه اندام‌های مختلف هوایی انجیر است. این نتایج نشان می‌دهند که فصول، تاثیر معنی‌داری در میزان پروتئین و فعالیت آنزیمی شیرابه هر اندام دارد. همچنین تاثیر فصل بر غلظت یون کلسیم موجود در شیرابه معنی‌دار است.

بحث

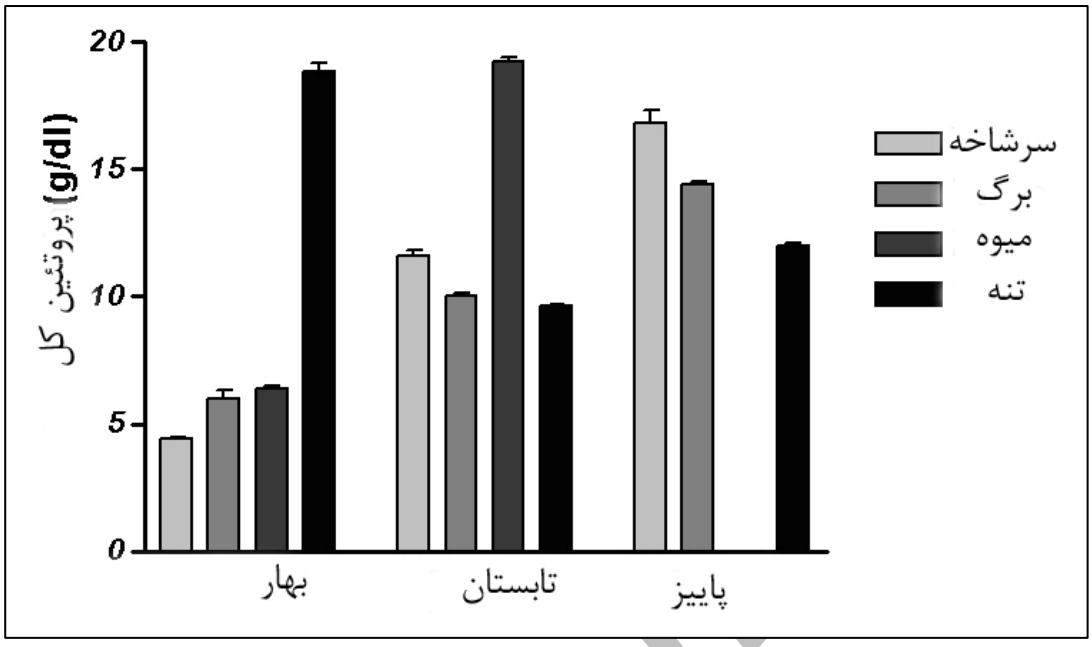
اصولاً غلظت ترکیبات آلی و کانی موجود در اندام‌های گیاهی، متغیری وابسته به فصل است [۳۰،۳۱]. در این خصوص غلظت پروتئین تام موجود در شیرابه اندام‌های هوایی مختلف درخت انجیر نیز مستثنی نیست. بررسی ما نشان می‌دهد که طی فصول مختلف میزان پروتئین در اندام‌های هوایی مختلف تغییر می‌کند. روند این تغییرات به اندامی که شیرابه از آن‌ها جمع‌آوری می‌شود بستگی دارد. برای مثال غلظت پروتئین تام در تنه در فصول بهار و تابستان بیشر از پاییز است، در حالی‌که در سرشاخه، میوه و برگ، غلظت پروتئین در فصول بهار، تابستان و پاییز سیر صعودی طی می‌کند. بیشترین غلظت پروتئین تام در فصل‌های بهار، تابستان و پاییز به ترتیب به اندام‌های تنه، میوه و سرشاخه مربوط هستند (نمودار شماره ۱).

تفاوت در فعالیت شیرلبه انجیر به دو عامل بستگی دارد:

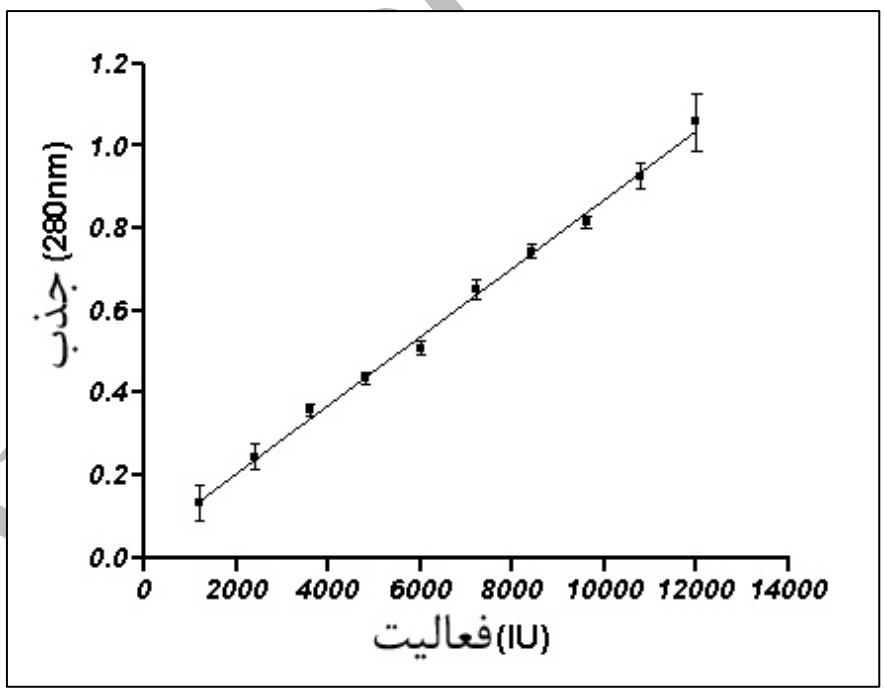
الف) غلظت آنزیم موجود در شیرابه (پروتئین تام).

ب) فعالیت ویژه آنزیم موجود در شیرابه.

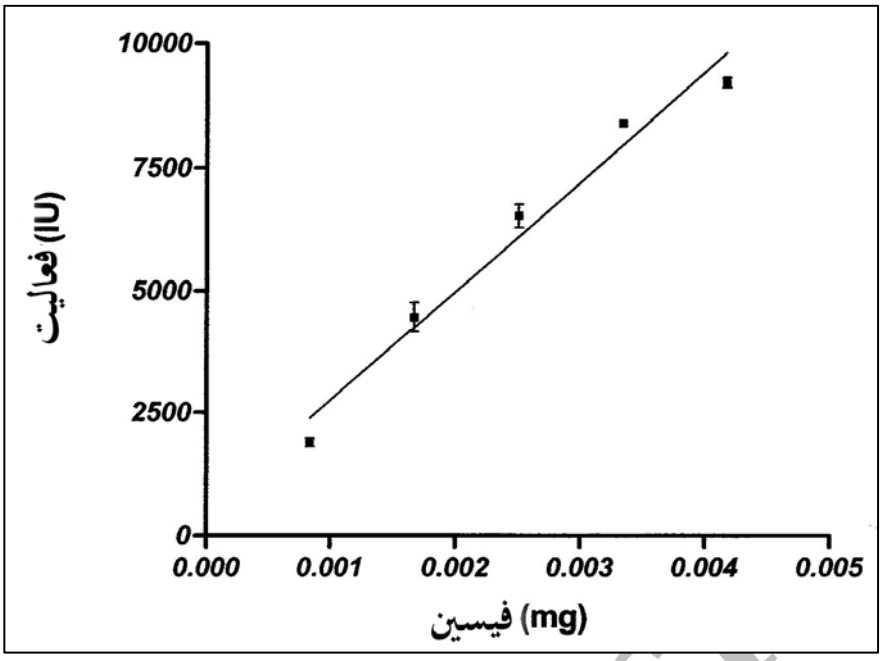
Archive of SID



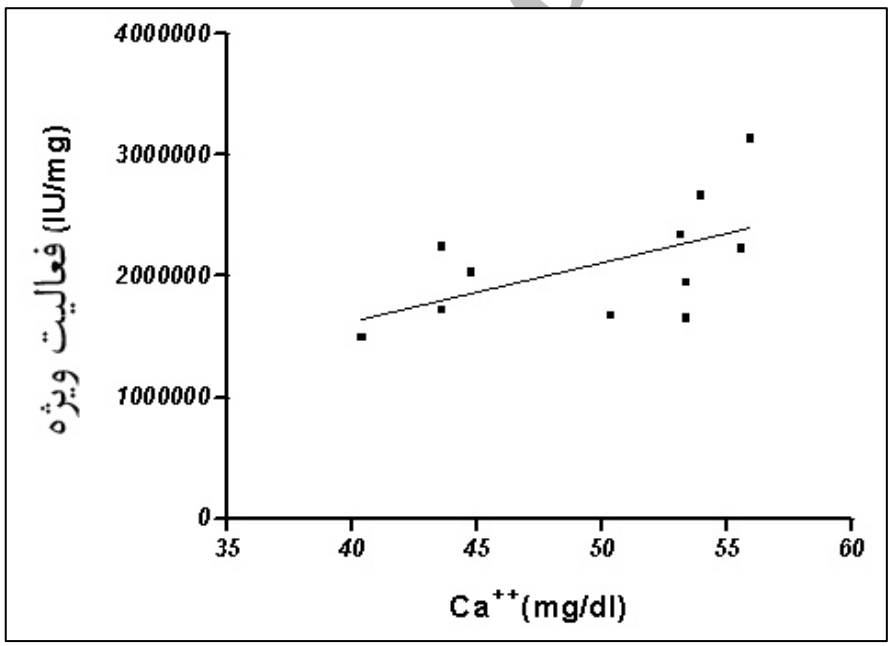
شکل شماره ۱- تاثیر فصل بر میزان پروتئین کل موجود در شیرابه اندام‌های مختلف هوایی انجیر



شکل شماره ۲- رابطه بین فعالیت و جذب سوبسترا پس از واکنش با پاپائین



شکل شماره ۳- رابطه بین فعالیت و مقدار فیسین موجود در شیرابه سرشاخه گیاه انجیر در فصل تابستان



شکل شماره ٤ - رابطه میان غلظت یون کلسیم و فعالیت ویژه فیسین موجود در شیرابه اندام‌های هوایی مختلف انجیر

جدول شماره ۱ – میزان فعالیت ویژه فیسین موجود در شیرابه اندام‌های مختلف هوایی گیاه انجیر در فصول مختلف

اندام	غلظت یون کلسیم (mg/dL)		
	بهار	تابستان	پاییز
سرشاخه	۵۰/٤	۵۵/٦	۵٤
برگ	۵۳/۲	۵٦	۵۳/٤
میوه	٤٤/۸	۵۳/٤	–
تنه	٤۳/٦	٤۰/٤	٤۳/٦

جدول شماره ۲– غلظت یون کلسیم در شیرابه اندام‌های هوایی انجیر در فصول مختلف سال برحسب (mg/dL)

اندام	فعالیت ویژه (IU/mg)		
	بهار	تابستان	پائیز
سرشاخه	۱/٦۷٤ × ۱۰٦ ± ۵/۰۷۲×۱۰٤	۲/۲۲۷ × ۱۰٦ ± ۲/۲۰۸×۱۰۵	۲/٦٦۲ × ۱۰٦ ± ۲/٤۹×۱۰۵
برگ	۲/۳٤۱ × ۱۰٦ ± ۱/٤۹۸۸×۱۰۵	۳/۱۳۸ × ۱۰٦ ± ۲/۸۱۹×۱۰۵	۱/٦۵۱ × ۱۰٦ ± ۳/۷۷۳×۱۰٤
میوه	۲/۰۳٤ × $۱۰^{٦}$ ± ۲/۱۵۲×$۱۰^{۵}$	۱/۹٤٦ × $۱۰^{٦}$ ± ۱/۰٤۸×$۱۰^{۵}$	–
تنه	۱/۷۱۷ × $۱۰^{٦}$ ± ۱/۱٤۱×$۱۰^{۵}$	۱/٤۹۹ × $۱۰^{٦}$ ± ۳/۵۸۱×$۱۰^{۵}$	۲/۲٤ × $۱۰^{٦}$ ± ۳/۰۷×$۱۰^{٤}$

بررسی ما حاکی از تفاوت در فعالیت ویژه شیرابه انجیر در اندام‌های هوایی مختلف و در فصول مختلف است. به عبارتی دیگر فعالیت ویژه فیسین متاثر از دو متغیر زمانی و مکانی (اندام جمع‌آوری) است.

در فعالیت ویژه آنزیم‌ها نقش مواد فعال‌کننده از اهمیت بالایی برخوردار است [۳۲،۳۳]. یون کلسیم به عنوان یکی از فعال‌کننده‌های آنزیم فیسین مطرح است که به مقدار قابل توجه‌ای در شیرابه انجیر یافت می‌شود. در این تحقیق تغییرات کمی این یون در فصول مختلف و در اندام‌های متفاوت بررسی شد. غلظت این یون با افزایش فصل در تمامی اندام‌ها بیشتر می‌شود (جدول شماره ۲). از طرفی فعالیت ویژه آنزیم نیز مورد بررسی مشابه‌ای قرار گرفت (جدول شماره ۱).

نتایج نشان می‌دهد در جایی که غلظت این یون زیادتر بوده، به همان نسبت فعالیت ویژه آنزیم نیز بالاتر است. این ارتباط به صورت نمودار شماره ٤ نمایش داده شده است. بنابراین تفاوت در فعالیت ویژه فیسین در اندام‌های مختلف و در فصول مختلف را می‌توان به غلظت یون کلسیم موجود در شیرابه، به عنوان یک فعال‌کننده آنزیمی مربوط دانست.

در نهایت فصل و اندام مناسب جهت جمع‌آوری شیرابه با توجه به فعالیت ویژه آنزیمی، غلظت آنزیم موجود و مقدار شیرابه قابل استحصال تعیین می‌گردد. بررسی حاضر نشان می‌دهد که بیشرین فعالیت ویژه مربوط به برگ و در فصل تابستان است. تنه و سرشاخه بیشترین فعالیت ویژه آنزیمی خود را در فصل پاییز دارند. با این وجود با عنایت به حجم شیرابه موجود در اندام‌ها

Archive of SID

سرشاخه بهترین کاندیدا برای جمع‌آوری شیرابه محسوب می‌شود (جدول شماره ۱).

مقایسه میزان فعالیت ویژه فیسین موجود در لاتکس انجیر بومی خراسان با آن چیزی که در متون علمی پیشتر بدان اشاره شده (مقدار فیسین موجود در *Ficus glabrata*) نشان می‌دهد که فعالیت ویژه هر دو تقریباً به یک میزان است و اندک تفاوتی که ما شاهد آن هستیم، می‌تواند به خاطر اندام جمع‌آوری، فصل و غلظت یون کلسیم موجود در شیرابه آن باشد [۳٤].

با عنایت به کاربرد فراوان فیسین که در مقدمه به آن پرداخته شد، و اینکه انجیر از گیاهانی است که به خوبی در استان خراسان رضوی پرورش می‌یابد انتظار می‌رود در آینده نه چندان دور برای آن کاربردهایی بیش از پیش تعریف شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی که هزینه انجام این تحقیق را متقبل گردیدند، همچنین از سرکار خانم مهندس مهناز رحیمی بخاطر زحماتی که در تدوین نمودارها کشیدند، تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

۱. میرحیدر حسین. *معارف گیاهی، کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها*. چاپ سوم. دفتر نشر فرهنگ اسلامی. ۱۳۷۷، صفحات ٤۹ – ٤۲.

۲. زرگری علی. *گیاهان دارویی*. چاپ ششم. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۳۷٦، جلد چهارم، صفحات ٤٤۸ – ٤۳۸.

۳. عزیزیان دینا. *فلور ایران شماره ۳۵ تیره توت* (*Moraceae*). چاپ اول. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع. ۱۳۷۹، صفحات ۲۹–۱۱.

4. Konno K, Hirayama C, Nakamura M, Tateishi K, Tamura Y, Hattori M and Kohno K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J.* 2004; 37: 370-8.

5. Oner MD and Akar B. Separation of the proteolytic enzymes from fig latex and it's utilization Gaziantep cheese production. *Food Sci. Technol*.1993; 26: 318-321.

6. Solvey VI, and Korsakov VZ. Enzyme activity of ficin from different sources and their effect meat. *Prikl. Biochim. Mikrobiol*.1974; 7: 189-95.

7. Whitaker JR. Assay and properties of commercial ficin. *Food Research.* 1957; 22: 468-478.

8. Mamoru N and Akikatsu K. Blending vinyl chloride resin, past dispersion comprising such blending vinyl chloride resin and molded articles prepared from it. *Eur. Pat. Apppl*. 1980; 19: 404-406.

9. Robbis BH. A proteolytic enzyme in ficin, the anthelmintic principle of leche higueron. *J. Biol. Chem*.1930; 87: 251-257.

10. Stepek G, Buttle DJ, Duce IR, Lowe A and Behnke JM. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode. Heligmosomoides polygyrus, in vitro. *Parasitology* 2005; 130: 203-11.

11. Englund PT, King TP, Craig LC and walti A. Ficin (I): It's isolation and characterization. *Biochemistry* 1968; 7: 163-175.

12. Reed HM. The freezing storage of figs. *Ice and Refri*g.1939; 96: 425-426.

13. Glazer AN, and Jones IK. Comparative studies on four sulfydryl endopeptidases ficin of Ficus glabrata latex. *J. Biol. Chem*.1970; 245: 2765-2772.

14. Bairoch A, Boeckmann B, Ferro S and Gasteriger E. *Swiss_Prot: Juggling between evolution and stability Brief. Bioinform*. 2004; 5: 39-55.

Archive of SID

15. Harrison M, Hillier IH and Burton NA. The catalytic mechnism of the papain: predictions with a Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical potential. *J. Am. Chem. Soc*. 1997;119: 12285-12291.

16. Ryan CA and Simmons MW. Plant proteinases. In: Stumpf PK and Conn EE. *Biochemistry of plants: A comprehensive treatise proteins and nucleic acids*. Academic press Inc. vol 6. 1981, pp: 321-323.

17. Pyoung KJ, Sin SJ and Sook KJ. Isolation and purification from fig latex. *Han 'guk Sikp 'um Kwahakhoechi*.1986; 18: 270-70.

18. Whitaker JR. Properties of the proteolytic enzymes of commertial ficin. *Food Research* 1957; 22: 483-493.

19. Sgarbieri VC, Gupte SM, Kramer DE, and Whitaker JR. Ficus enzymes I. Separation of the protelytic enzyme of Ficus caria L. and Ficus glabrata lattices. *J. Biolo Chem*. 1964; 239 (7): 2170-2177.

20. Mamoru S and Masanori S. Proteinases from Ficus Carica var Horaishi V Purification and properties of a sugar containing Protein (Ficin S). *Biochem. Biophys. Acta*. 1974; 350: 38-47.

21. Chas HWMW and kuna S. Some toxicological and pharmalogical of the proteolytic enzyme ficin. *J. Pharmacol*. 1941; 71: 20-29.

22. Mandl I and Mclaren AD. Photochemistry of Proteins VII. Quantum yield for the inactivation of ficin by ultraviolet light. *Arch. Biochem.* 1949; 21: 408-15.

23. Albonico F and Malato M. The action of some bacterial and plant chymases of pepsin on whole casein and casein fractions. *Latte*.1963; 37: 21-33.

24. Kredhnamurti CR, and subrahmanyan V. Vegetable rennet (IV) Natural activators of the protease in fig latex. *Indian. J. Dairy. Sci*. 1949; 2: 23-50.

25. Hoopen THJG, and Els V. Fast, Sensitive assay of proteolytic activity. *Delft prog. Repser A.* 1974; 1: 82-89.

26. Winnick T, Cone WH and Greenberg DM. Experiments on the activation of ficin. *University of Idaho Moscow*.1999; 465-470.

27. Glenister PR and Becker K. Method for appraising protease activity and some application. *Euro Brewery conv. Proc Congr*.1961; 310-318.

28. Vesna Matijatko, Blanka Beer, Jadranka Foršek, Ljiljana Bedrica, and Nada Kuer "Blood serum proteinograms in pregnant and non-pregnant cows" *VETERINARSKI ARHIV* 2000*;* 70: 21-30.

29. Yusuf Oğuz, Fatih Bulucu, Abdülgaffar Vural. Oral and Parenteral Essential Amino Acid Therapy in Malnourished Hemodialysis Patients. *Nephron* 2001; 89: 224-7.

30. Whitman WC, Bolin DW, Klosterman EW, Klosterman HJ, Ford KK, Moomaw L, Hoga DG and Buchanan ML. Caroten protein and phophorus in range and tame grasses of western North Dakota. *North Dakota Agrica turel Experiment station. Bulettin 370 - fargo*, 1951; 55-65.

31. Hopper TH and Nesbitt LL. The Chemical composition of some North Dakota pasture and hay grasses. *North Dakota Agricaltural Ezperiment station Bulletin 236 fargo*, 1930; 38-40.

32. Leone FA, Ciancaglini P, Pizauro JM. Effect of calcium ions on rat osseous plate alkaline phosphatase activity. *J Inorg. Biochem.* 1997; 68:123-7.

33. Kulkarni AP, Mitra A, Chaudhuri J, Byczkowski JZ, Richards I." Hydrogen peroxide: a potent activator of dioxygenase activity of soybean lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1990; 166: 417 - 421.

34. Smith EL, Kimmel JR. In: Boyer PD, Lory H, Myback K. The Enzymes.Vol IV. New York. Academic Press; 1960, P: 133-145.

Archive of SID