مقاله پژوهشی

تخلیص و بررسی فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم فیسین انجیر (فیکوس کاریکا)

نغمه ژاله جو*، مریم چلبی **، شهرام پروانه***، دکتر علی مصطفایی****

دریافت : ۹۱/۶/۷ ، پذیرش : ۹۱/۱۰/۱۲

چکیده:

مقدمه و هدف: فیسین عضوی از خانواده سیستئین پروتئازهای گیاهی است که در انجیر بـه وفـور یافـت مـی‌شـود. ایـن آنـزیم کاربردهای دارویی و صنعتی فراوانی دارد. هدف این مطالعه تخلیص و تعیـین برخـی خـصوصیات ایـن آنـزیم و بررسـی فعالیـت پروتئولیتیکی آن بر روی چندین پروتئین گیاهی و حیوانی می باشد.

روش‌کار: در این مطالعه تجربی آنزیم فیسین طی مراحل عصاره‌گیری، رسوب‌دهی با سولفات آمونیم و کروماتوگرافی تعـویض یون در ستون کربوکسی متیل سفارز از میوه نارس انجیر خالص گردید. جهت بررسی فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم، فیسین خـالص شده تحت چهار شرایط بافری مختلف بر پروتئین‌های کازئین، آلفا لاکتا لبومین، بتا لاکتوگلبولین و ژلاتین اثر داده شد.

نتایج: محصول آنزیمی به دست آمده شامل دو باند پروتئینی با اوزان ۲٤ و ۲۶ کیلودالتون بود. نتایج حاصل از تـاثیر فیـسین بـر پروتئین‌ها نشان داد که این آنزیم قادر به هضم کازئین بوده و دارای اثرات هیدرولازی کمتری بر بتا لاکتوگلبولین و ژلاتین است و بر آلفا لاکتا لبومین اثر بسیار کمتری دارد.

نتیجه نهایی: با توجه به اثر نسبتاً انتخابی فیسین بر پروتئینهای مورد مطالعه، این آنزیم می‌تواند یک کاندید مناسب با هدف هضم کازئین و تولید فرآورده‌های حاصل از آن باشد.

کلید واژه ها: انجیر / پروتئازها / فیسین

مقدمه :

آنزیم‌های پروتئاز دسته مهمی از آنزیم‌های بـا کـاربرد صنعتی هـستند کـه مـوارد اسـتفاده متعـددی در صـنایع غذایی، دارویی و بهداشتی دارند (۱،۲). انجیر (fig) و شیره درخت آن (latex) غنی از گروهی از سیـستئین پروتئازهـا بنـام فیـسین (EC: 3.4.22.3) بـا وزن حـدود ۲۶-۲۴ کیلودالتـون و نقطـه ایزوالکتریـک معـادل ۹/۱ اسـت. نـام فیسین اولین بار توسط والتی در سال ۱۹۳۸ برای یکسری آنزیم‌های موجود در شیرهٔ انجیر به کار برده شد. این آنزیم حاوی ۱۷۴ اسیدآمینه بوده و تـاکنون ۱۰ ایزوآنـزیم از آن با نقطه ایزوالکتریک متفاوت شناسایی شـده اسـت (۳،۴). ایـن گـروه از پروتئازهـا از نظـر خـصوصیات سـاختمانی، مکانیسم کاتالیزوری و مهار کننده‌هـا، شـباهت زیـادی بـا سـایر پروتئازهـای گیـاهی مثـل پاپـائین میـوه انبـه (EC: 3.4.22.2) بروملین میـوه آنانـاس (EC: 3.4.22.4) و اکتینیـدین میـوه کیـوی (EC: 3.4.22.14) دارنـد (۷-۵). پروتئازهای گیاهی از جمله فیسین موارد استفادهٔ متعددی در صنعت گوشت (جهت ترد کـردن گوشـت) و پنیـر (۲) تهیه قرص های گوارشی(۸) درمـان بعـضی از زخـم هـای پوستی و فرمولاسـیون بعـضی کـرم‌هـا و همچنـین فعـال نمودن سیستم انعقاد خون در پزشکی دارند (۹).

با توجه به کاربردهای متعـدد فیـسین گیـاه انجیـر در صنعت و پزشکی و وفور این گیاه در ایران و منـاطق غـرب کشور و همچنین به این دلیل که تـا کنـون مطالعـه‌ای در این زمینه در ایران صورت نگرفته است، مطالعه حاضـر بـا هدف تخلیص و تعیـین برخـی خـصوصیات ایـن آنـزیم و بررسی فعالیت پروتئولیتیکی آن بر روی چندین پـروتئین (کازئین، آلفالاکتالبومین، بتا لاکتوگلبولین و ژلاتین) انجام

* دانشجوی دوره دکتری بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

** دانشجوی دوره دکتری بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*** کارشناس آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

**** استاد ایمونولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه(amostafaie@kums.ac.ir)

Archive of SID

www.SID.ir

گرفت. پروتئین کازئین، پروتئین عمدهٔ شیر بوده و بررسی فعالیت فیسین بر روی این پروتئین می‌تواند در تهیهٔ محصولات هیدرولیز شدهٔ شیر، کمک‌کننده باشد.

روش کار:

جمع‌آوری نمونه و عصاره‌گیری: در این مطالعه تجربی به مقدار کافی از میوهٔ نارس انجیر در فصل بهار جمع‌آوری شد. میوه با مخلوط کن همراه با اضافه کردن مقداری بافر فسفات نمکی(PBS)، کاملاً خرد و یکنواخت گردید. عصارهٔ حاصل از چند لایه صافی پارچه‌ای عبور داده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در g ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ و مایع رویی جهت مراحل بعد نگهداری شد.

رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم: به عصارهٔ تهیه شده سولفات آمونیوم (سیگما) اشباع در سه غلظت نهایی ۳۰، ۴۰ و ۶۰ درصد در مدت زمان یک ساعت در دمای C ° ۴ افزوده شد. نمونه‌ها سپس به مدت ۳۰ دقیقه در g ۱۵۰۰۰ در دمای C ° ۴ سانتریفوژ و رسوب حاصله در بافر فسفات سدیم ۸۵ میلی مولار با pH ۷، حاوی ۱۰ میلی‌مولار EDTA (سیگما) و ۴۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (سیگما)، حل و به مدت یک شب در مقابل این بافر دیالیز گردید.

کروماتوگرافی تعویض یون کاتیونی : پس از تجربه روی رزین کاتیون و آنیون در شرایط بافری مختلف مشخص گردید که تخلیص عصاره انجیر در ستون تعویض کاتیون کربوکسی متیل سفارز نتیجه بهتری دارد. برای این کار ستون کربوکسی متیل سفارز (فارماسیا) به قطر و ارتفاع به ترتیب۲ و۲۰ سانتیمتر به میزان کافی با بافر فسفات سدیم ۸۵ میلی‌مولار با pH ۷ حاوی ۱۰ میلی‌مولار EDTA و ۴۰ میلی‌مولار کلرید سدیم شسته شد تا به تعادل بافری رسید، سپس نمونه عصارهٔ انجیر دیالیز شده به ستون وارد گردید. جذب مایع خروجی ستون با اسپکتروفتومتر(APEL) در طول موج ۲۸۰nm مورد بررسی قرار گرفت. پس از اینکه جذب مایع خروجی از ستون به حدود صفر رسید، شیب غلظت ۴۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در بافر فسفات با حجمی حدود۶-۳ برابر ستون، وارد ستون گردید. خروجی ستون در حجم‌های ۵ میلی لیتر جمع‌آوری گردید.

تعیین میزان پروتئین با روش براد فورد: غلظت پروتئین در مراحل مختلف با استفاده از روش برادفورد(۱۰) اندازه‌گیری شد. استاندارد مورد استفاده شامل محلول آلبومین گاوی (سیگما) با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

الکترفورز در ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات(SDS-PAGE) : جهت بررسی میزان خلوص و تعیین وزن مولکولی فراکسیون‌های پروتئینی مراحل مختلف و مقایسه محصول آنزیمی بدست آمده با آنزیم فیسین خالص شرکت سیگما، با استفاده از روش الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید (۱۱) در ژل جداکننده ۱۵ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد انجام گرفت. پس از آماده‌سازی ژل و قراردادن آن در تانک الکتروفورز، ۴۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۱۰ میکرولیتر از بافر نمونه (۵X)، مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در g ۱۲۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند و به دنبال آن نمونه‌گذاری و تفکیک انجام گردید. پس از انجام الکتروفورز(Bio-RAD) در ولتاژ ۱۵۰ ولت، ژل با رنگ کوماسی آبی R–۲۵۰ (فارماسیا) رنگ آمیزی شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی اثر پروتئولیتیکی فیسین بر سوبسترای پروتئینی: اثر این پروتئاز بر پروتئین‌های مختلف شامل کازئین، بتالاکتوگلبولین، آلفا لاکتا لبومین و همچنین ژلاتین در شرایط بافری مختلف شامل بافر استات ۲۰ میلی‌مولار با pH ۴/۵، بافر سیترات۲۰ میلی‌مولار با pH ۵/۵، بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار با pH ۷ و بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار با pH ۸/۵ که هر یک حاوی کلرید سدیم ۵۰ میلی مولار بودند با نسبت وزنی ۱٪ (نسبت آنزیم به سوبسترا) انجام شد. اثر آنزیم بر روی سوبستراها در دو حالت طبیعی و حاوی فعال کننده (سیستئین۱۰ میلی‌مولار یا مرکاپتو اتانول همراه با EDTA یک میلی‌مولار) (نمونه‌های آزمون) و مهار کننده (یدواستامید یا آنزیم حرارت داده شده) (نمونه‌های کنترل) مورد بررسی قرار گرفت. پس از اضافه نمودن آنزیم (فراکسیون دوم) به سوبسترا در شرایط بافری بافرهای ذکر شده، نمونه‌ها بمدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (دمای اپتیمم فعالیت آنزیم) قرار گرفتند و سپس بلافاصله در دمای C ° ۱۰۰ قرار داده شدند تا آنزیم غیرفعال گردد. پس از الکتروفوز نمونه‌های کنترل و آزمون در ژل جداکننده ۱۵ درصد و رنگ‌آمیزی ژل با رنگ کوماسی آبی R-۲۵۰، نتایج مورد بررسی قرار گرفتند. مراحل مختلف انجام این مطالعه در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام گرفت.

نتایج:

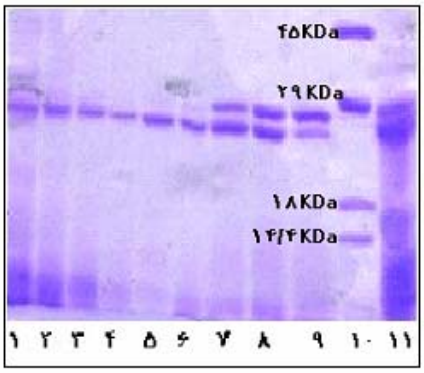
در عصارهٔ نارس انجیر که محتوای پروتئین آن حدود

Archive of SID

www.SID.ir

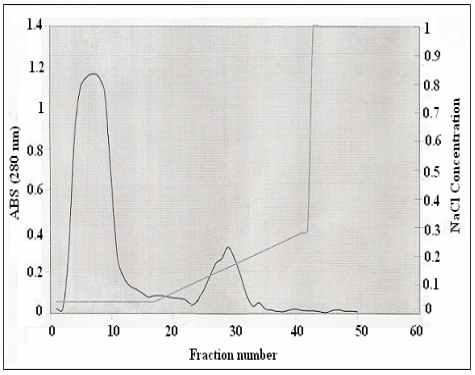
یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، پروتئین‌های متنـوعی کـه عمدتاً در محدوده وزنی ۱۰ تا ۴۰ کیلودالتون قـرار دارنـد، دیده می‌شود (شکل ۱). در این میان دو باند پروتئینـی در موقعیـت‌هـای ۲۴ و ۲۶ کیلـو دالتـون پـر مقـدارترین پروتئینهای عصاره بودند.

پس از رسوب‌دهی عصاره با سولفات آمونیوم در غلظت نهایی ۶۰ درصد تقریبـا تمـامی بخـش پروتئـازی عـصاره تفکیک گردید. عبور ایـن فراکـسیون از سـتون کربوکـسی متیل سفارز تحت شرایط ذکر شده نموداری شامل دو قلـه عمده پروتئینی، یکی قبل از اضافه کـردن شـیب نمـک و دیگـری بعـد از افـزودن آن حاصـل نمـود کـه در شـکل۲ نمایش داده شده است. الکتروفورز فراکسیون‌های مختلـف این دو قله پروتئینی در ژل ۱۵ درصد، در ستون‌های ۹-۱ شکل ۱ نمایش داده شده است.



شکل۱: الکتروفورز عصارهٔ میوهٔ انجیر و فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی تعویض کاتیون در ژل جدا کننده ۱۵ درصد

ستون‌های ۶- ۱ فراکسیون‌های بدست آمـده قبـل از افـزودن کلریـد سدیم و ستون‌های ۹-۷ مربوط به فراکسیون‌های بدست آمـده بعـد از افزودن کلرید سدیم، ستون ۱۰ مارکر و ستون ۱۱ عصارهٔ میوهٔ انجیـر قبل از عبور از ستون کروماتوگرافی.

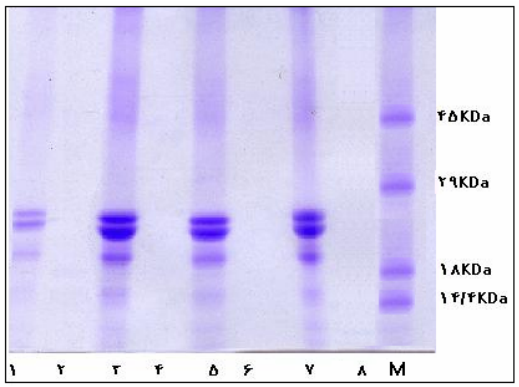


شکل ۲: منحنی کروماتوگرافی تعویض کاتیونی عصارهٔ میوه انجیر در ستون کربوکسی متیل سفارز

قله اول فراکسیون‌های به دست آمده قبل از افزودن نمـک و قلـه دوم مربوط به فراکسیون‌های بعد از افزودن شیب نمک است.

با بررسی فعالیت پروتئازی فراکـسیون‌هـای حاصـل از کروماتوگرافی تعویض یون مشخص گردید که هـر دو بانـد واقـع در موقعیـت ۲۴ و ۲۶ کیلودالتـون دارای فعالیـت پروتئازی هستند و به عنوان فیسین محـسوب مـی‌گردنـد. در بخـش اول کروماتوگرام (سـتون‌هـای ۶-۱) بانـد ۲۴ کیلودالتونی مقدار بیشتری را به خود اختـصاص داده ولـی پس از افزایش شیب کلرید سدیم نسبت این دو باند مشابه و در انتهـای شـیب نمـک، بانـد ۲۶ کیلودالتـونی مقـدار بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد ستون ۱۰ مربوط بـه مارکر با اوزان ۴۵، ۲۹، ۱۸ و ۱۴/۴ کیلو دالتون می‌باشد.

نتایج تأثیر آنزیم در شرایط بافری مختلف بـر کـازئین (بـا وزن مولکـولی ۳۶-۲۴ کیلودالتـون)، نـشان داد کـه فیسین قادر است درهر دو حالـت طبیعـی و فعـال شـده، کازئین را در شرایط بافری مختلف بطور کامل تجزیه نماید و در نتیجه در نمونـه‌هـای آزمـون، هـیچ بانـدی مـشاهده نمی‌شود(شکل ۳).



شکل ۳: الگوی SDS–PAGE اثر فیسین (۱µg/ml) بر کازئین (۱mg/ml)

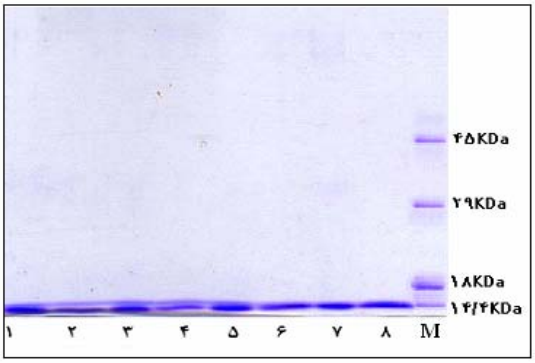
ستون‌های ۱، ۳، ۵ و ۷ مربوط به نمونه‌های کنترل در شـرایط بـافری استات، سیترات، فسفات، تریس و ستون‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ مربـوط بـه نمونه‌های آزمون در همان شرایط ذکر شده.

در شرایط اسیدی بافر استات (ستون‌های ۱ و ۲)، کـازئین بخوبی در بافر حل نشد. بدین لحـاظ غلظـت پـروتئین در ستون ۱ کمتر از سایر ستون‌های مربوط به کنترل است.

نتایج تأثیر آنزیم بر پروتئین آلفا لاکتا لبومین بـا وزن مولکولی ۱۴/۴ کیلو دالتون (شکل ۴)، نشـــان داد که در شرایط بافری خنثی و بازی (ستون‌های ۶ و ۸)، آنـزیم اثـر محسوسی بر روی آن ندارد، هر چنـد در شـرایط اسـیدی، بخشی از آلفا لاکتا لبومین توسط فیسین هضم شده است (ستون‌های ۲ و ۴).

Archive of SID

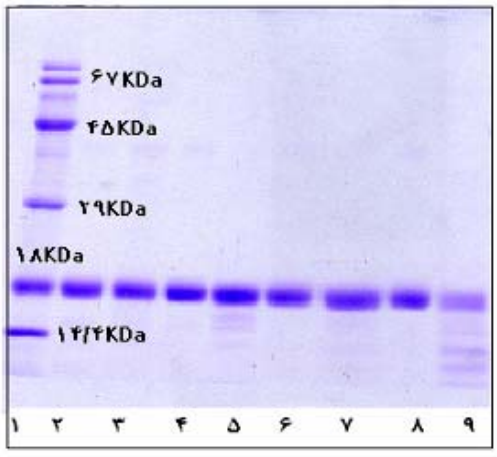
www.SID.ir



شکل ۴: الگوی SDS-PAGE اثر فیسین (۱µg/ml) بر آلفالاکتالبومین (۱mg/ml)

ستون‌های ۱، ۳، ۵ و ۷ مربوط به نمونه‌های کنترل در شرایط بافری استات، سیترات، فسفات، تریس و ستون‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ مربوط به نمونه‌های آزمون در همان شرایط ذکر شده.

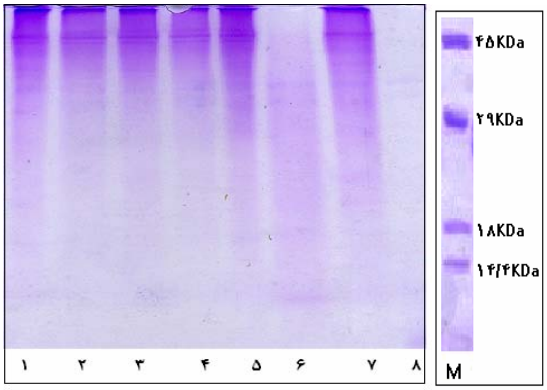
بررسی نتایج تأثیر فیسین بر بتالاکتوگلبولین با وزن مولکولی ۱۸ کیلودالتون نشان داد، بجز در شرایط بافری قلیایی بافر تریس، در بقیه شرایط بافری هیدرولیز چندانی صورت نگرفته است (شکل ۵). در شرایط بافری تریس قلیایی فیسین قادر بود بخش قابل توجهی از بتالاکتوگلبولین را به انواعی از پپتیدهای کوچکتر تجزیه نماید (ستون۹).



شکل ۵: الگوی SDS-PAGE اثر فیسین(۱µg/ml) بر روی بتالاکتوگلبولین (۱mg/ml)

ستون ۱ مربوط به مارکر، ستون‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ مربوط به نمونه‌های کنترل در شرایط بافری استات، سیترات، فسفات، تریس و ستون‌های ۳، ۵، ۷ و ۹ مربوط به نمونه‌های آزمون در همان شرایط ذکر شده.

نتایج اثر آنزیم روی ژلاتین هم نشان داد که فیسین در شرایط بافری استات و سیترات تأثیر چندانی بر روی ژلاتین ندارد اما قادر است در شرایط بافری فسفات و تریس، پروتئین مذکور را هیدرولیز نماید (شکل ۶). ستون‌های ۱، ۳، ۵ و ۷ ، مربوط به نمونه‌های کنترل و ستون‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ مربوط به نمونه‌های تست بترتیب در بافر استات، سیترات، فسفات و تریس می‌باشند. همانطور که ذکر شد در نمونه‌های آزمون با شرایط بافری فسفات (ستون ۶) و شرایط بافری تریس (ستون ۸)، هیدرولیز ژلاتین توسط آنزیم فیسین صورت گرفته و در نتیجه باندی مشاهده نمی‌شود.



شکل ۶: الگوی SDS-PAGE اثر فیسین (۱µg/ml) بر ژلاتین (۱mg/ml).

آنزیم فیسین هم در حالت طبیعی و هم در مجاورت مهارکنندهٔ برگشت پذیر تتراتیونات سدیم ۱۰ میلی‌مولار (جهت افزایش پایداری آنزیم) نگهداری شد. در هنگام بررسی اثر پروتئازی آن بر روی سوبستراها در حالت دوم به آن فعال کنندهٔ سیستئین اضافه شد، که نتایج تأثیر پروتئولیتیکی آن در هر دو حالت مشابه بود.

بحث:

مطالعه حاضر نشان داد که رسوب‌دهی عصاره میوه نارس انجیر در غلظت نهایی ۶۰ درصد سولفات آمونیم نتایج بهتری نسبت به درصدهای دیگر آن در تفکیک فیسین بدست می‌دهد. بعلاوه نتایج دیگر مطالعات نیز نشان داد که فیسین رسوب داده شده، پس از عبور از ستون تمایلی مرکوریال-آگارز، دو جزء پروتئینی شامل فیسین و مرکوری- فیسین حاصل می‌نماید که هر دو جزء فعالیت آنزیمی از خود نشان دادند(۱۴-۱۲). در این مطالعه تخلیص آنزیم با روش کروماتوگرافی تعویض یون کاتیونی و آنیونی دربافرهای اسیدی، خنثی و بازی مورد آزمون قرار گرفت که با توجه به قلیایی بودن آنزیم

Archive of SID
www.SID.ir

(pI ۹/۱) و مثبت بودن آن در pH اسیدی، نتـایج بهتـری در جداسازی و تخلیص این پـروتئین در رزیـن کربوکـسی متیل سفارز در حضور بافر فسفات pH ۷ در شیب غلظتی کلرید سدیم بدست آمد.

با توجه به روش‌هـای متفـاوت تعیـین وزن مولکـولی، تـاکنون اوزان مختلفـی در محـدوده ۲۸-۲۴ کیلودالتـون برای آنزیم فیسین گـزارش نمـوده‌انـد (۱۴،۱۵). محـصول تخلیص شده در مطالعـه حاضـر شـامل ۲ بانـد پروتئینـی نزدیـک بهـم بـود کـه ایـن دو بانـد در محـدودهٔ ۲۶-۲۴ کیلودالتون قرار گرفتند که احتمالاً ایزوآنزیم‌هـای مختلـف فیسین هستند و شناخت دقیق‌تر آنهـا نیازمنـد مطالعـات بیشتر همچون اسپکتروسکوپی جرمی است. برطبق مطالعات دیگران به نظر می‌رسد که حداقل سه جزء فعـال اصـلی و چندین جزء فعال فرعی آنزیم در شـیرهٔ ficus glabrata و حداقل ده جزء آنزیمی در شیرهٔ ficus carica وجـود دارد. بطور کلی طراحی اجزاء آنزیم فیسین قـراردادی بـوده و از یک گروه تحقیقاتی به دیگری متفاوت می‌باشد (۶).

در ارتباط بـا تـأثیر پروتئولیتیـک فیـسین، مطالعـات معدودی انجام گرفته است اما از مقایسه نتایج این مطالعـه و مطالعـات مـشابه بـر روی پروتئازهـای گیـاهی، چنـین استنباط می‌شود که خصوصیات عملکردی و پروتئازی این آنزیم نسبت به اکتینیدین میوه کیوی شباهت بیشتری به پاپائین دارد (۱۶،۱۷). نتـایج ایـن مطالعـه نـشان داد کـه فیسین قادر اسـت در شـرایط مختلـف بـافری، کـازئین را هیدرولیز نماید. در طی مطالعات قبـل کـه توسـط همـین گروه بر روی اکتینیدین میوهٔ کیوی و پاپائین انجـام شـد، مشخص گردید که اثر اکتینیدین بر کـازئین در pH هـای پائین‌تر (اسیدی) قویتر بوده ولی الگـــوی تأثیر پاپائین بر کازئین همانند فیسین بود (نتـایج گـزارش نـشده). بـراین اساس، پاپائین و فیسین گزینه‌های مناسب‌تری جهت هضم کازئین شیر و محصولات حاصل از آن نسبت به اکتینیدین محسوب می‌شوند. نتایج مطالعه حاضر همچنین نـشان داد که فیسین اثر هیدرولازی مناسبی بـر آلفـا لاکتـالبومین و بتالاکتوگلبولین در شرایط مورد آزمون ندارد و از این نظـر تقریباً مشابه اثر اکتینیدین بر روی ایـن پـروتئین حیـوانی است (۱۸). بعلاوه تأثیر فیسین بر روی ژلاتـین بـه عنـوان محصول هضم شده کلاژن نشان داد که در شـرایط بـافری خنثی و بازی قادر به هیدرولیز این پروتئین می‌باشد. بـــر این‌اساس به نظر می‌رسد که بتوان از فیسین برای هضم کلاژن زمینه خارج سلولی بافت و جداسازی سلول استفاده نمود.

بطور کلی از مقایسه اثر پروتئولیتیکی فیسین و دیگـر سیستئین پروتئازهای گیاهی ماننـد پاپـائین و اکتینیـدین چنـین اسـتنباط مـی‌شـود کـه خـصوصیات عملکـردی و پروتئازی این آنزیم شبیه به پاپائین می‌باشد، در حالی کـه اثـر اکتینیـدین روی سوبـستراهای مختلـف تـا حـدودی متفاوت‌تر از این دو آنزیم است. با توجه به بعضی شـباهتها و همچنـین خـصوصیات منحـصر بفـرد در هـر یـک از سیستئین پروتئازهای گیاهی و بـا عنایـت بـه کاربردهـای بالای آنها در صـنایع مختلـف، بـا انجـام مطالعـات بیـشتر می‌توان، از مخلوطی از این پروتئازها در دامنه وسـیع‌تـری برای مصارف صنعتی، دارویی، بهداشتی و پزشکی استفاده نمود.

نتیجه نهایی:

در این مطالعه آنزیم فیسین با روشی نسبتاً ساده و تکرار پذیر از میوه نارس انجیر، تخلـیص و وزن مولکـولی آن بـه روش الکتروفورز تعیین گردیـد. تـاثیر فیـسین خـالص بـر پروتئین‌ها نشان داد که این آنزیم قادر بـه هـضم کـازئین بوده و دارای اثرات هیدرولازی کمتری بر بتا لاکتوگلبولین و ژلاتین است و بر آلفالاکتالبومین اثر بسیار کمتـری دارد. با توجه به اثرات پروتئازی فیسین بر پـروتئین‌هـای مـورد مطالعه، این آنزیم می‌تواند به عنوان کاندید مناسبی بـرای هضم کازئین و تولید فرآورده‌های حاصل از آن(تولید شیرهای هیدرولیز شده برای بیماران آلرژیک به شیرگاو) مطرح گردد.

سپاسگزاری:

با تشکر از آقای سعید نورمحمدی بـرای جمـع آوری و تهیه میوه نارس انجیر و همکاران محترم مرکـز تحقیقـات بیولوژی پزشکی برای کمک علمی و فنی در مراحل اجرای این مطالعه.

منابع :

1. Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczk W, et al. Structural studies of cystein proteases and their inhibitors. Acta Biochimica Polonica 2001; 48(l): 1-20.
2. Morton JF. Fig. In: Morton JF, Miami FL, (eds), Fruits of warm climates. Winterville: Creative resource systems Inc, 1987: 47-50.
3. Pyoung KJ, Sin SJ, Sook KJ. Isolation and purification from fig latex. Han Guk Sikp Um Kwa hakhoechi 1986; 18: 270-70.

Archive of SID

www.SID.ir

4. Mamoru S, Masanori S. Proteinases from ficus carica var horaishi V purification and properties of a sugar containing protein (Ficin S). Biochem Biophys 1974; 350: 38-47.
5. Glazer A, Smith E. The enzymes. 3rd ed. Vol 3. New York: Boyer, P.D. Academic, 1971;538-542.
6. Friedenson B, Irvin E, Friedenson L. Ficin. Method Enzymol 1970; 19: 261-273.
7. Mariani M, Camaqna M, Tarditi L, Seccamani E. A new enzymatic method to obtain high yield F(ab) mouse IgG. Mol Immunol 1991;28:69-77.
8. Mihalyi E. Application of proteolytic enzymes to protein structure studies. Florida: CRC press, 1972: 39-101.
9. Schwarz H,Doner F, Turecek P. Activation and inactivation of human factor x by protease derived from ficus carica. J Haematol 2002; 119 (4): 1042-51.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680- 685.
12. Kramer DE, Whitaker JR. Nature of the conversion of ficus carica variety kadota ficin component D to component C. some physicochemical properties of components C and D. Plant Physiol 1969; 44: 1566-1573.
13. Sgarbieri VC, Gupte ShM, Kramer DE, Whitaker JR. Separation of the proteolytic enzymes of ficus carica and ficus glabrata latices. J Biol Chem 1964; 239(7): 2170-77.
14. Englund PT, King TP, Craig LC, Walti A. Studies on ficin. Its isolation and characterization. Biochem J 1968; 7(1): 163-175.
15. Constance D, Hall A, Hall PL. Purification of ficin by affinity chromatography. Anal Biochem 1974; 60: 417-423.
16. Nakayama SH, watanabe T, Takahashi K, Hoshino M.Comparative study on the active Sites of ficin and papain by the spin labeling method. J Biochem 1997; 102(3): 531-535.
17. Sugiyama S., Ohtsuki K., Sato K., Kawabata M. Enzymatic properties, substrate specifities and pH-activity profiles of two kiwifruit proteases. J Nutr Sci Vitaminol 1997; 43(5):581-9.
18. Mostafaie A, Bidmeshkipour A, Shirvani Z, Mansouri K, Chalabi M. Kiwifruit Actinidin: A Proper New Collagenase for Isolation of Cells from Different Tissues. Appl Biochem Biotechnol 2008; 144: 123–131.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Purification and Study of Proteolytic Activity of Ficin Enzyme of Fig (Ficus Carica)

N. Zhalehjoo, Ph.D. Student [*]; M. Chalabi, Ph.D. Student [**]; Sh. Parvaneh, B.Sc. [***]
A. Mostafaie, Ph.D. [****]

Received: 28.8.2012 Accepted: 1.1.2013

Abstract

Introduction & Objective: Ficin is a member of plant cystein proteases that is abundant in fig. This enzyme has many pharmacological and industrial uses. In the present study, the enzyme was purified by a simple procedure and its proteolytic activity was assayed on several plant and animal proteins.

Materials & Methods: Ficin was extracted from unripe fig, precipitated by ammonium sulfate and purified using ion-exchange chromatography on a Carboxymethyl Sepharose column. Proteolytic activities of the purified enzyme were determined in 4 buffering conditions on casein, alpha lactalbumin, beta lactoglobulin and gelatin proteins.

Results: Purified enzymes include two bands with molecular mass of 24 and 26 KDa. Results of proteolytic activity showed that ficin can digest casein. It has moderate hydrolytic activity on beta lactoglobulin and gelatin but ficin can not hydrolyze alpha lactalbumin.

Conclusion: It seems ficin has selective effects on some proteins so it can be a good candidate for digestion of casein and making related drugs.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2013; 20 (2):126-132)

Keywords: Ficain / Fig / Proteases

---

* Ph.D. Student of Biochemistry , Isfahan University of Medical Sciences & Health Services, Isfahan, Iran.

** Ph.D. Student of Molecular Biology, Kermanshah University of Medical Sciences & Health Services, Kermanshah, Iran.

*** Medical Biology Research Center Laboratory
Kermanshah University of Medical Sciences & Health Services, Kermanshah, Iran.

**** Professor of Immunology, Medical Biology Research Center
Kermanshah University of Medical Sciences & Health Services, Kermanshah, Iran. (amostafaiekums.ac.ir)

www.SID.ir