Archive of SID

جداسازی و تعیین خواص چهار پروتئاز جداشده از لاتکس درخت انجیر بومی خراسان (Ficus Carica)

دکتر امید رجبی[1]- دکتر عبدالرضا وارسته[2]- جواد دانای باغکی[3]- علی براتیان[3]- لیلا جهانگیری[3]

چکیده

زمینه و هدف: فعالیت پروتئازی لاتکس انجیر در مقالات متعددی گزارش شده است. مطالعه حاضر با هدف مقایسه پروتئازهای شیرابه (Latex) درخت انجیر بومی خراسان با لاتکس زیر گونه‌های مختلف از گونه کاریکا (Carica) انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، چهار پروتئاز (فیسین) به کمک روشهای جداسازی به کمک نمک (Salt Fractionation) و کروماتوگرافی بر روی ستون مونو S (نوعی رزین تعویض کاتیون) از شیرابه استخراج گردیدند. کمیت‌هایی چون فعالیت، غلظت، ضریب خاموشی مولی برای هر نمونه حداقل سه بار اندازه‌گیری شدند. مقایسه بین گروهها از نظر فعالیت و ضریب خاموشی مولی با استفاده از آزمون آماری ANOVA مورد تحلیل قرار گرفتند. $P<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: این پروتئازها در خواصی نظیر جرم مولکولی و ضریب خاموشی مولی، فعالیت مشابهی نشان دادند. فعالیت و جرم مولکولی به ترتیب به کمک رسوب‌دهی کازئین و روش SDS-Page تعیین شدند؛ همچنین این آنزیم‌ها رفتار متفاوتی از نظر ماندگاری بر روی ستون تعویض‌کننده کاتیونی نشان دادند که احتمالاً به دلیل تفاوت اندکی در ساختار بنیادین و نقشه پپتیدی آنها می‌باشد. میزان پروتئین و فعالیت آنزیمی شیرابه به ترتیب ۱۱۰ mg/ml و ۲۴۲ IU/ml بود. اجزایی که دارای فعالیت آنزیمی بودند در فراکسیون‌های III-VI یافت شدند. جرم مولکولی فیسین‌های III-VI حدود ۲۶/۵ KDa تخمین زده شد. محلول ۱٪ پروتئین‌های موجود در فراکسیون‌های III-VI در محلول NH_4CO_3 ۰/۰۵M دارای ضریب جذب مولی (ε280nm) به ترتیب در حدود ۲۲، ۲۱/۵، ۲۱ و ۲۰/۹ بودند. فعالیت آنزیماتیک فیسین‌ها (فراکسیون‌های III-VI) با استفاده از سوبسترای کازئین به ترتیب ۶۱/۶، ۶۲/۷، ۶۳/۴ و ۶۷/۲ (Unit/mol) تعیین شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، شیرابه انجیر بومی خراسان در بین چهار زیرگونه مختلف فیکوس کاریکا از نظر تعداد و فعالیت پروتئازی فیسین بسیار به زیرگونه Calimyrna که در کالیفرنیای آمریکا رشد می‌کند، شباهت دارد.

واژه‌های کلیدی: لاتکس انجیر؛ فیسین؛ خالص‌سازی؛ فعالیت آنزیمی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (دوره ۱۱، شماره ۳، سال ۱۳۸۳)

[1] نویسنده مسؤول؛ دکترای داروسازی صنعتی؛ استادیار گروه آموزشی شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
آدرس: مشهد- دانشگاه علوم پزشکی مشهد- دانشکده داروسازی
تلفن: ۹-۸۸۲۳۲۵۵ -۰۵۱۱ نمابر: ۸۸۲۳۲۵۱-۰۵۱۱ پست الکترونیکی:omidrajabi@ yahoo.com
[2] دکترای ایمونولوژی؛ مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی؛ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد
[3] دانشجوی داروسازی؛ دانشکده داروسازی؛ دانشگاه علوم پزشکی مشهد

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جنس فیکوس (Ficus) حدودا ۲۰۰ نوع مختلف از درختان مناطق حاره و معتدله را در بر می‌گیرد و یکی از بزرگترین جنسهای خانواده موراسه (Moraceae) است. در ایران یکی از انواع مهم فیکوس، نوع کاریکا (Carica) می‌باشد که انجیر تولید می‌کند (۱). شیرابه درخت انجیر که نوعی ترشح شیرابه‌ای از برگ و میوه‌های فیکوس کاریکا (Ficus carica) می‌باشد، اثرات درمانی نظیر اثرات هیپوگلیسیمیک (۲) هیپوکلسترولمیک (۳) سرکوب‌کننده سرطان (۴) هیپوتری گلیسیریدمیک (۵) و ضد کرم (۶) دارد؛ همچنین به دلیل آنزیم‌های پروتئولیتیک، اسیدهای آمینه، مواد معدنی، قندها، تری‌ترپن‌ها و اسیدهای آلی موجود در آن مورد توجه محققان بوده است (۸،۷). بررسی شیرابه درخت انجیر به کمک SDS-Page وجود پروتئین‌های با جرم مولکولی ۲۵ و ۴۸ کیلودالتون به نسبت بیشتر و به نسبت کمتر پروتئین‌هایی با جرم مولکولی کمتر از ۱۰ و بیشتر از ۱۰۰ را نشان داده است (۹).

«فیسین» به آنزیم‌های پروتئولیتیک فعال شیرابه درختهای جنس فیکوس گفته می‌شود. اطلاعات موجود درباره آن نشان می‌دهد که در زمینه‌های اختصاصی بودن سوبسترا، فعالیت استرازی، واکنش‌های ترانس پپتیداسیون و فعال‌شدن با عوامل کاهنده، خواص بسیار مشابه به پاپاین (Papain) (نام سیتئین پروتئاز مهم حاصل از گیاه خربزه درختی یا Carica Papaja) از خود نشان می‌دهد (۱۰). در بسیاری از انواع فیکوس کاریکا تعدادی از انواع سولفیدریل آندو پپتیدازها گزارش شده است (۱۱).

از بین زیر گروههای مختلف انجیر می‌توان به انجیر سیاه یا Black Mission، Stamforal، King و Calimyrna اشاره کرد که در نقاط مختلف جهان رشد و نمو می‌کنند. لازم به ذکر است که شیرابه خشک انجیر وحشی جنگلهای حاره قاره آمریکای جنوبی (Ficus Glabrata) با نام فیسین خام (Crude Ficin) در بازار داد و ستد می‌شود. از این ماده چندین پروتئاز قوی استخراج و خالص‌سازی می‌شود که کاربرد فراوانی در صنایع دارند از جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- صنایع دارویی (۱۲)

- استفاده در فرمولاسیون بر طرف کننده زگیل و میخچه
- استفاده در فرمولاسیون‌های کرم‌ها جهت لطیف‌کردن پوست

۲- صنایع غذایی (۱۴،۱۳)

- استفاده در صنایع گوشت، جهت تردکردن گوشت‌های دیرپز و تهیه کالباس و سوسیس
- استفاده در صنعت پنیرسازی

۳- صنایع پزشکی و آزمایشگاهی (۱۵)

- استفاده در ساخت کیت‌های تعیین Rh در بانک خون

شناخت انواع پروتئازهای موجود در لاتکس درخت انجیر بومی خراسان و پی‌بردن به فعالیت بیولوژیکی آنها تاکنون مورد تحقیق قرار نگرفته است و اطلاعات حاصل می‌تواند محققان صنایع فوق را یاری دهد.

مطالعه حاضر با هدف مقایسه پروتئازهای شیرابه (Latex) درخت انجیر بومی خراسان با لاتکس زیر گونه‌های مختلف از گونه Carica انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، شیرابه انجیر مورد استفاده به صورت تازه از درختان انجیر اطراف دانشکده داروسازی در مشهد (ایران ۱۳۸۲) جمع‌آوری و از آن برای مدت کوتاهی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

جنس و گونه درخت توسط هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد تعیین گردید. پاپاین، فیسین، سدیم دودسیل سولفات، آکریل آمید، بیس آکریل آمید، تریس از شرکت Sigma (آلمان)، کازئین، تری کلرواستیک اسید، آمونیوم بی‌کربنات،

www.SID.ir

Archive of SID

سدیم کلراید، سدیم فسفات، کلسیم کلراید از شرکت Merck (آلمان) و نشانگر (Marker) استاندارد جرم مولکولی از شرکت Invitrogen (آمریکا) خریداری شد.

میزان پروتئین موجود به روش برادفورد تعیین گردید (۱۶). از پاپاین به عنوان پروتئین استاندارد در تعیین میزان پروتئین استفاده شد.

جهت الکتروفورز، SDS-Page در شرایط احیاکننده با استفاده از ژل جداکننده هموژن ۱۲/۵٪ و ژل جمع کننده ۵٪ در ولتاژ ثابت به همراه شاخص استاندارد جرم مولکولی انجام گردید (۱۳). رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از روش نیترات نقره صورت گرفت.

دستگاه مورد استفاده از نوع Bio-Rad (آمریکا) بود.

جرم مولکولی فیسین‌ها به کمک SDS-Page تخمین زده شد. منحنی استاندارد برای لگاریتم جرم مولکولی نشانگرها در مقابل مقادیر Rf رسم گردید (۱۷).

دیالیز توسط کیسه دیالیز با Cut Off=۱۰۰۰۰ شرکت Sigma (آمریکا) انجام شد.

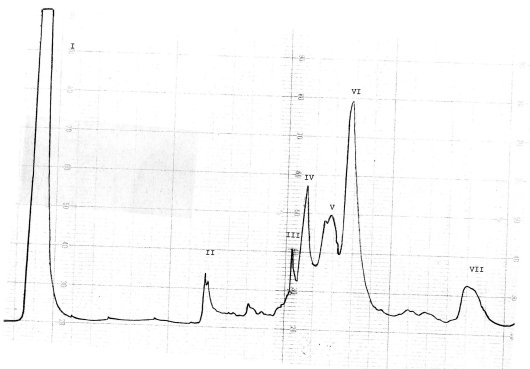
به منظور استخراج و خالص سازی، ۱۵ml شیرابه در ۲۵ml بافر فسفات pH=۷ سوسپانسیون شد. سوسپانسیون حاصله برای مدت سه ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد مخلوط و سپس سانتریفوژ گردید تا مواد نامحلول آن جدا گردد. در مرحله بعد، عمل Salting Out با اضافه کردن ۱۷/۷ کلرید سدیم به ۱۰۰ml از محلول شفاف انجام گردید. بعد از گذشت ۱۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، رسوب با سانتریفوژ جدا گردید و دوباره در بافر فسفات (pH =۶ و ۰/۰۵ M و ۳ml) پراکنده شد. این مخلوط سپس به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد در مقابل بافر فسفات (pH =۶ و ۰/۰۵ M) دیالیز گردید.

بعد از انجام دیالیز، مواد نامحلول موجود در کیسه دیالیز به کمک سانتریفوژ جدا شد و بخش محلول (که حدود ۵ml بود) به دستگاه FPLC (مجهز به ستون [۱۰/۱۰ Mono-S HR]، از انواع تعویض‌کننده‌های کاتیونی)که با فاز متحرک بافر فسفات (pH =۶ و ۰/۰۵ M)به تعادل رسیده بود، تزریق شد.

نوع دستگاه FPLC به‌کار رفته Pharmacia (فرانسه) بود. لازم به ذکر است که FPLC دستگاهی برای انجام عمل کروماتوگرافی است و از نظر عملکرد شباهت بسیار زیادی به دستگاه HPLC دارد.

سپس ستون با بافر فسفات (pH =۶/۸ و ۰/۰۰۵ M و ۳۰ml) شسته و شویش با استفاده از گرادیان خطی سدیم فسفات از pH =۶/۸ و ۰/۰۰۵ M تا pH =۶/۲ و ۰/۱۸۵ M ادامه یافت. گرادیان به نحوی تنظیم شده بود که با عبور ۱۰۰ml محلول از ستون غلظت سدیم فسفات به صورت خطی از ۰/۰۰۵ M تا ۰/۱۸۵ M تغییر کند. این عملیات در دمای اتاق انجام شد و فراکسیون‌ها با سرعت جریان ۶۰ ml/h جمع‌آوری شدند (۱۸).

فراکسیون‌ها به کمک روشهای عیارسنجی که در ادامه شرح داده خواهد شد، بررسی شدند. لوله‌های دارای فراکسیون‌های III-VI (شکل ۱) مخلوط گردیده و با اضافه کردن ۳۵ گرم سدیم کلرید در ۱۰۰ ml محلول (Salting-Out) رسوب داده شدند. پروتئین‌های رسوب کرده سانتریفوژ شده و در بافر فسفات (pH =۶/۸ و ۰/۰۰۵ M) لیوفیلیزه شدند.



شکل ۱- کروماتوگرام رسوبات جدا شده از لاتکس (با استفاده از روش جداسازی با نمک) روی ستون Mono-S با گرادیان غلظت و pH بافر فسفات

www.SID.ir

Archive of SID

جهت تعیین ضریب خاموشی مولی، فیسین‌های لیوفیلیزه شده در آب حل و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد در مقابل آب دیالیز شدند. این محلول‌ها مجدداً لیوفیلیزه گردیدند. ضریب خاموشی مولی با تهیه محلول (w/v) ۱٪ از نمونه‌های لیوفیلیزه شده فیسین‌ها (فراکسیون‌های III-VI) در محلول ۰/۰۵ بی‌کربنات آمونیوم تعیین گردید. جذب این محلول‌ها در طول موج ۲۸۰ nm به کمک اسپکتروفتومتر (Shimatzu-Japan CPS-240A) در دمای اتاق تعیین شد (۱۵).

بررسی فعالیت پروتئولیتیک آنزیم‌ها به کمک روش Kuntiz انجام شد (۱۴). محلول ۰/۱ مولار بافر سدیم فسفات pH=۷ دارای غلظتهای معینی از فیسین به همراه ۰/۰۰۱M NaEDTA و ۰/۵٪ از کازئین با حجم نهایی ۲۰ml، برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. واکنش با اضافه‌کردن تری‌کلرو استیک اسید (V/V ۵٪ و ۳ml) متوقف شد و بعد از انجام سانتریفوژ، جذب مایع رویی در طول موج ۲۵۰nm قرائت گردید. هر واحد فعالیت به میزانی از آنزیم تعلق می‌گیرد که بتواند تغییر جذبی به اندازه ۱ واحد در طول موج ۲۵۰ nm در مایع رویی ایجاد کند (۱۹). جهت افزایش صحت نتایج به دست آمده، کمیت‌هایی چون فعالیت، غلظت، ضریب خاموشی مولی برای هر نمونه حداقل سه بار اندازه‌گیری شدند. مقایسه بین گروهها از نظر فعالیت و ضریب خاموشی مولی با استفاده از آزمون آماری ANOVA مورد تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

میزان پروتئین و فعالیت آنزیمی شیرابه به ترتیب ۱۱۰ mg/ml و ۲۴۲ IU/ml بود. کروماتوگرام عصاره شفاف شیرابه که به کمک سدیم کلراید جدا شد، در شکل ۱، نشان داده شده است.

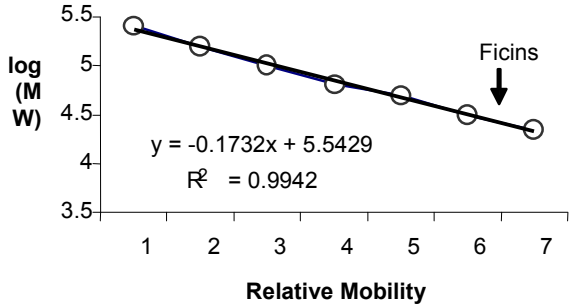
اجزایی که دارای فعالیت آنزیمی بودند، در فراکسیون‌های III-VI یافت شدند. الکتروفورز هر یک از این فراکسیون‌ها ترکیب خالصی را نشان داد. لوله‌هایی که دارای فراکسیون‌های III-VI (شکل ۱) بودند، به طور جداگانه مخلوط و سپس لیوفیلیزه شدند. جرم مولکولی فیسین‌های III-VI حدود ۲۶/۵KDa تخمین زده شد (شکل ۲).

محلول ۱٪ پروتئین‌های موجود در فراکسیون‌های III-VI در محلول NH_4CO_3 ۰/۰۵M دارای ضرایب جذب مولی (ε280nm) به ترتیب در حدود ۲۲، ۲۱/۵، ۲۱ و ۲۰/۹ بودند. فعالیت آنزیماتیک فیسین‌ها (فراکسیون‌های III-VI) با استفاده از سوبسترای کازئین به ترتیب ۶۱/۶، ۶۲/۷، ۶۳/۴ و ۶۷/۲ (Unit/mol) تعیین شد (جدول ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

شیرابه درخت انجیر مخلوطی حاوی چندین جزء پروتئینی است. در این تحقیق، بیشتر از ۷ جزء پروتئینی در شیرابه انجیر به روش کروماتوگرافی جداسازی شد. به غیر از جزء I سایر اجزا در الکتروفورز تنها یک جزء پروتئینی را نشان دادند. اجزای I و II و VII فعالیت پروتئولتیک نشان ندادند.

در عین وجود تفاوت در جرم مولکولی فیسین‌های موجود در گونه گلابراتا (۱)، اجزای III-VI جدا شده از شیرابه انجیر بومی خراسان جرم مولکولی یکسانی نشان دادند (۲۶/۵ KD) که به نظر می‌رسد، فیسین باشند. در این تحقیق تفاوتی در فعالیت فیسین‌ها و ضرائب خاموشی مولی آنها مشاهده نشد (P<۰/۰۵).



شکل ۲- تخمین وزن مولکولی فیسین به روش الکتروفورز SDS-Page

www.SID.ir

Archive of SID

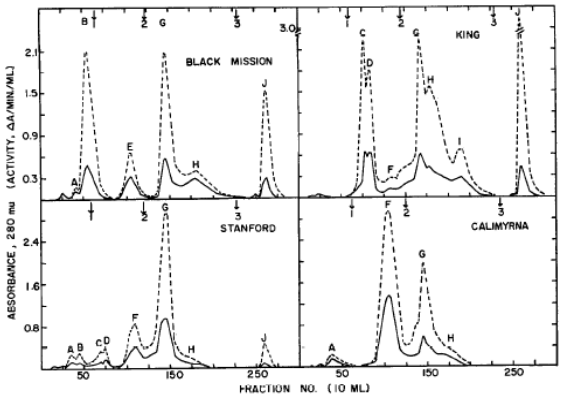
در مطالعه‌ای در سال ۱۹۶۴، چند زیرگونه از فیکوس کاریکا (Stanford, King, Black Mission, Calimyrna) مورد مقایسه قرار گرفتند؛ در این تحقیق جداسازی آنزیم‌های موجود در شیرابه این زیرگونه‌ها از فیکوس کاریکا با استفاده از ستون کروماتوگرافی CM- Cellulose انجام شد (۱۱)، (شکل ۳). اجزای فعال آنزیمی جدا شده به همراه فعالیت آنها برحسب Unit/mg در جدول ۲ ملاحظه می‌شود.

با مقایسه به دست آمده از الگوی پروتئازی شیرابه انجیر بومی خراسان با زیرگونه‌های اشاره شده در جدول ۲ و همچنین از نظر بزرگی و شکل برگها و میوه‌ها، به نظر آید این انجیر از نظر ژنوتیپی به زیرگونه Calimyrna که در ایالت کالیفرنیای آمریکا می‌روید، بسیار شبیه است.

از طرفی در تحقیق Sagarbieri و همکاران، به این مطلب اشاره شده که با وجود تفاوت در شکل برگها، اندازه آنها، رنگ و شکل میوه‌های چهار زیر گونه از فیکوس کاریکا (Common, Smyrna, San Pedro, Caprifig) تفاوتی در ترکیبات آنزیم‌های پروتئولتیک ملاحظه نشده است (۱۱)؛ به هرحال جهت نشان دادن ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ این گیاه از نظر تنوع آنزیم‌های پروتئولتیک موجود در آنها نیاز به مطالعات دقیق‌تری می‌باشد.

تفاوت در زمان ماندگاری فیسین‌های جدا شده بر روی ستون تعویض یونی، نشان از تفاوت در ساختار مولکولی آنها دارد که در تفاوت در pH ایزوالکتریک منعکس می‌شود.

از آنجا که این آنزیم مانند سرگروه خود، پاپاین (از دسته سیتئین پروتئازها)، دارای فعالیت زیادی است، جایگاه خاصی در صنایع مرتبط دارد و این که تاکنون هنوز توالی آمینو اسیدهای آن به طور کامل مشخص نشده است می‌طلبد که در آینده تحقیقات بیشتری روی آنها صورت گیرد.



شکل ۳- کروماتوگرام شیرابه چهار زیر گروه از فیکوس کاریکا بر روی ستون CM-Cellulose

جدول ۱- خلاصه تخلیص پروتئازهای موجود در شیرابه درخت انجیر

ترکیب	حجم	فعالیت در واحد حجم (ml±SD)	غلظت پروتئین mg/ml±SD	فعالیت کل	فعالیت Unit±SD	فعالیت Unit/mg	ضریب خاموشی مولی (۴۲۸۰)
شیرابه‌شفاف‌شده	۱۵	۲۴۲±۵	۱۱۰±۳	۳۶۳۰	تعیین نشد.	تعیین نشد.	تعیین نشد.
جزء III	۹	۴۱±۵	۱۷/۷±۱/۵	۳۷۰	۶۱/۶±۳/۱	۲/۳۲±۰/۱۱	۳۰/۹±۰/۲
جزءIV	۱۵	۳۶/۱±۴	۱۵/۳±۱/۳	۵۴۳	۶۲/۷±۴/۲	۲/۳۶±۰/۱۶	۲۱/۲±۰/۳
جزء V	۲۰	۳۱±۴	۱۳/۹±۱/۵	۶۲۰	۶۳/۹±۴/۱	۲/۴۱±۰/۱۵	۲۱/۵±۰/۳
جزءVI	۲۳	۳۷±۴	۱۴/۶±۱/۵	۸۵۱	۶۷/۲±۳/۴	۲/۵۳±۰/۱۳	۲۲/۱±۰/۳

جدول ۲- فعالیت اجزای مختلف جدا شده از لاتکس زیرگونه‌های مختلف فیکوس کاریکا (Unit/mg)

زیرگونه	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Black mission	۳/۹۶	۱۰/۱	۰	۰	۲/۴۶	۰	۶/۸۴	۲/۷۳	۰	۹/۹۶
Stanford	۲/۸۱	۵/۵۱	۵/۷۴	۵/۹۸	۰	۴/۷۱	۶/۱۵	۳/۷۲	۰	۹/۸۵
King	۰	۰	۷/۲۱	۶	۰	۴/۵۳	۶/۹۵	۶/۶۲	۵/۱	۳/۹
Calimyrna	۲/۹۷	۰	۰	۰	۰	۴/۴۶	۴/۴۶	۳/۹۶	۰	۰

www.SID.ir

Archive of SID

منابع:

1- Jones LK, Glazer AN. Comparative studies on four sulfidryl endopeptidase (Ficins) of ficus glabrata latex. J Biol Chem 1970; 245: 2765-72.

2- Serraclara A, Hawkins F, Perez C, Doniguez E, Campillo JE, Torres MD. Hypoglycemic action of an oral fig-leaf decoction in type- I diabetic patients. Dia Res Clin Prac 1998; 39: 19-22.

3- Canal JR, Torres MD, Romero A, Perez C. A choloroform extaract obtained from a decoction of ficus carica leaves improves the cholesterlameic status of rats with streptozotocin- induced diabetes. Act Physiol Huny 2000; 87: 71-76.

4- Rubbnov S, Kashman Y, Rabinowitz R, Schlesinger M, Mechoulam R. Suppressors of cancer cell proliferation from fig (Ficus carica) resin: Isolation and structure elucidation. J Nat Prod 2000; 64: 993-96.

5- Pezer C, Canal JR, Campillo JE, Romero A, Torres MD. Hypotriglyceridemic activity of Ficus carica leaves in experimental hypotriglyceridemic rats. Phyto Res 1999; 13: 188-91.

6- De-Amorin A, Borba HR, Carauta JP, Lopes D, Kaplan MA. Anthelmintic activity of the latex of ficus species. J Ethno Pharm 1999; 64: 255-58.

7- Ahmed W, Khan AQ, Malik A. Two triterpenes from the leaves of Ficus carica. Plant Med 1998; 54: 481-85.

8- Kang H, Kang MY, Han H. Identification of natiural rubber and characterization of rubber biosynthetic activity in fig tree. Plant Physiol 2000; 123: 1133-42.

9- Oner MD, Akar B. Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilization in Gaziantep cheese production. Lebensmittel Wissenscharftund Technologie 1993; 26: 318-21.

10- Smith EL, Kimmel JR. In: Boyer PD, Lordy H, Myrback K. (eds). The Enzymes. Vol IV. New York: Academic Press; 1960. P: 133.

11- Sagarbieri VC, Gupte SM, Kramer DE, Whitaker JR. Separation of the proteolytic enzymes of Ficus carica and Ficus glabrata lattices. J Biol Chem 1964; 239: 2170-77.

12- Judd WJ, Steiner EA, Knafl PC, Master C. The gel test: use in identification of unexpected antibodies to blood group antigens. Immunohematol 1998; 14 (2):59-62.

13- Hevia P, Whitaker JR, Olcott HS. Solubilization of a fish protein concentration with proteolytic enzymes. J Agric Food Chem 1976; 383-85.

14- Stefanek JL, Scanga JA, Belk KE, Smith GC. Effect of enzymes on beef tenderness and palatability traits. Animal Science Research Report. The department of Animal Sciences, Colorado State University. 2002.

15- Hemmatzadeh F, Fatemi A, Amini F. Therapeutic effect of Fig Tree Latex on Bovine Papilomatosis. J Vet Med 2003; B50: 473-76.

16- Bradford M, Morioh A. Rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein otilizing the principal of protein- dyebinding. Anal Biochem 1976; 72: 255-60.

17- Lammli UK. Cleavage of structural proteins during the assebly of the head of bacteriophage T4. Nature 1976; 227: 680-85.

18- Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem 1969; 244: 4406-12.

19- Englund PT, King TP, Craig LC, Walti A. Studies on Ficus (I) its isolation and characterization. J Biol Chem 1968; 7: 163-75.

www.SID.ir