

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 به وفور یافت می‌شود. این آنزیم کاربردهای دارویی و صنعتی فراوانی دارد. هدف این مطالعه تخلیص و تعیین برخی خصوصیات این آنزیم و بررسی فعالیت پروتئولیتیکی آن بر روی چندین پروتئین گیاهی و حیوانی می‌باشد.

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

نتایج: محصول آنزیمی به دست آمده شامل دو باند پروتئینی با اوزان ۲۴ و ۲۶ کیلودالتون بود. نتایج حاصل از تاثیر فیسین بر پروتئین‌ها نشان داد که این آنزیم قادر به هضم کازئین بوده و دارای اثرات هیدرولازی کمتری بر بتا لاکتو گلوبولین 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:

(EC: 3.4.22.2) بروملین میوه آناناس (EC: 3.4.22.4) و اکتینیدین میوه کیوی (EC: 3.4.22.14) دارند (۷-۵). پروتئازهای گیاهی از جمله فیسین موارد استفاده متعددی در صنعت گوشت (جهت ترد کردن گوشت) و پنیر (۲) تهیه قرص های گوارشی (۸) درمان بعضی از زخم های پوستی و فرمولاسیون بعضی کرم‌ها و همچنین فعال نمودن سیستم انعقاد خون در پزشکی دارند (۹).

با توجه به کاربردهای متعدد فیسین گیاه انجیر در صنعت و پزشکی و وفور این گیاه در ایران و مناطق غرب کشور و همچنین به این دلیل که تا کنون مطالعه‌ای در این زمینه در ایران صورت نگرفته است، مطالعه حاضر با هدف تخلیص و تعیین برخی خصوصیات این آنزیم و بررسی فعالیت پروتئولیتیکی آن بر روی چندین پروتئین (کازئین، آلفالاکتالبومین، بتا لاکتوگلوبولین و ژلاتین) انجام

آنزیم‌های پروتئاز دسته مهمی از آنزیم‌های با کاربرد صنعتی هستند که موارد استفاده متعددی در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی دارند (۱،۲). انجیر (fig) و شیره درخت آن (latex) غنی از گروهی از سیستئین پروتئازها بنام فیسین (EC: 3.4.22.3) با وزن حدود ۲۴-۲۶ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک معادل ۹/۱ است. نام فیسین اولین بار توسط والتی در سال ۱۹۳۸ برای یکسری آنزیم‌های موجود در شیرۀ انجیر به کار برده شد. این آنزیم حاوی ۱۷۴ اسیدآمینه بوده و تاکنون ۱۰ ایزوآنزیم از آن با نقطه ایزوالکتریک متفاوت شناسایی شده است (۳،۴). این گروه از پروتئازها از نظر خصوصیات ساختمانی، مکانیسم کاتالیزوری و مهار کننده‌ها، شباهت زیادی با سایر پروتئازهای گیاهی مثل پاپائین میوه انبه

* 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)

الکتروفورز 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 ۱۲۰۰۰g 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 سوبستراهای پروتئینی: اثر این پروتئاز بر پروتئین‌های مختلف شامل کازئین، بتالاکتوگلوبولین، آلفا لاکتالبو مین و همچنین ژلاتین در شرایط بافری مختلف شامل بافر استات ۲۰ میلی‌مولار با pH ۴/۵، بافر سیترات ۲۰ 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 میلی‌مولار بودند با نسبت وزنی ۱٪ (نسبت آنزیم به سوبسترا) انجام شد. اثر آنزیم بر روی سوبستراها در دو حالت طبیعی و حاوی فعال کننده (سیستئین ۱۰ 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 ۱۰۰°C قرار داده شدند تا آنزیم غیرفعال گردد. پس از الکتروفورز 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 عصاره نارس انجیر که محتوای پروتئین آن حدود

گرفت. پروتئین کازئین، پروتئین عمده شیر بوده و بررسی فعالیت فیسین بر روی این پروتئین می‌تواند در تهیه محصولات هیدرولیز شده شیر، کمک‌کننده باشد.

روش کار:

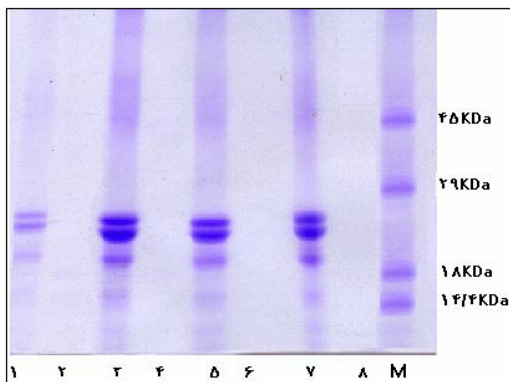
جمع‌آوری نمونه و عصاره‌گیری: در این مطالعه تجربی به مقدار کافی از میوه نارس انجیر در فصل بهار جمع‌آوری شد. میوه با مخلوط کن همراه با اضافه کردن مقداری بافر فسفات نمکی (PBS)، کاملاً خرد و یکنواخت گردید. عصاره حاصل از چند لایه صافی پارچه‌ای عبور داده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد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

رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم: به عصاره تهیه شده سولفات آمونیوم (سیگما) اشباع در سه غلظت نهایی ۳۰، ۴۰ و ۶۰ درصد در مدت زمان یک ساعت در دمای ۴°C افزوده شد. نمونه‌ها سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g در دمای ۴°C سانتریفوژ و رسوب حاصله در بافر فسفات سدیم ۸۵ میلی‌مولار 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 ترتیب ۲ و ۲۰ 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 عصاره 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 حدود ۳-۶ برابر ستون، وارد ستون گردید. خروجی ستون در حجم‌های ۵ میلی‌لیتر جمع‌آوری گردید.

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

با بررسی فعالیت پروتئازی فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی تعویض یون مشخص گردید که هر دو باند واقع در موقعیت ۲۴ و ۲۶ کیلودالتون دارای فعالیت پروتئازی هستند و به عنوان فیسین محسوب می‌گردند. در بخش اول کروماتوگرام (ستون‌های ۶-۱) باند ۲۴ کیلودالتونی مقدار بیشتری را به خود اختصاص داده ولی پس از افزایش شیب کلرید سدیم نسبت این دو باند مشابه و در انتهاهای شیب نمک، باند ۲۶ کیلودالتونی مقدار بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد ستون ۱۰ مربوط به مارکر با اوزان ۴۵، ۲۹، ۱۸ و ۱۴/۴ کیلو دالتون می‌باشد. نتایج تأثیر آنزیم در شرایط بافری مختلف بر کازئین (با وزن مولکولی ۳۶-۲۴ کیلودالتون)، نشان داد که فیسین قادر است در هر دو حالت طبیعی و فعال شده، کازئین را در شرایط بافری مختلف بطور کامل تجزیه نماید و در نتیجه در نمونه‌های آزمون، هیچ بانندی مشاهده نمی‌شود (شکل ۳).



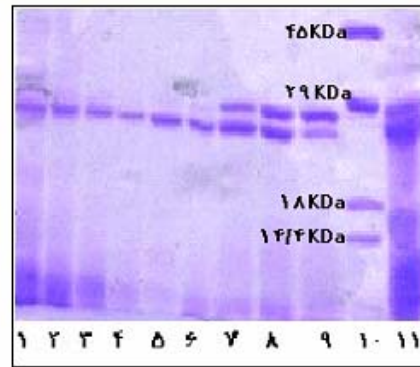
شکل ۳: الگوی SDS-PAGE اثر فیسین (۱ μg/ml) بر کازئین (۱ mg/ml)

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

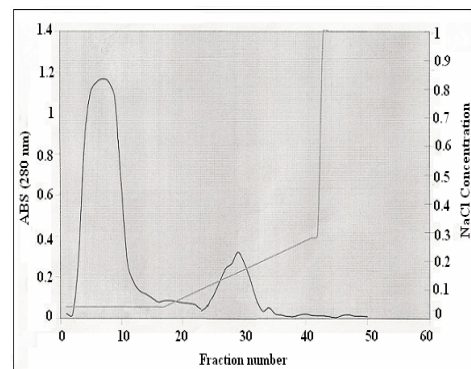
در شرایط اسیدی بافر استات (ستون‌های ۱ و ۲)، کازئین بخوبی در بافر حل نشد. بدین لحاظ غلظت پروتئین در ستون ۱ کمتر از سایر ستون‌های مربوط به کنترل است. نتایج تأثیر آنزیم بر پروتئین آلفا لاکتالبو مین با وزن مولکولی ۱۴/۴ کیلو دالتون (شکل ۴)، نشان داد که در شرایط بافری خنثی و بازی (ستون‌های ۶ و ۸)، آنزیم اثر محسوسی بر روی آن ندارد، هر چند در شرایط اسیدی، بخشی از آلفا لاکتالبو مین توسط فیسین هضم شده است (ستون‌های ۲ و ۴).

یک میلی گرم در میلی لیتر بود، پروتئین‌های متنوعی که عمدتاً در محدوده وزنی ۱۰ تا ۴۰ کیلودالتون قرار دارند، دیده می‌شود (شکل ۱). در این میان دو باند پروتئینی در موقعیت‌های ۲۴ و ۲۶ کیلو دالتون پر مقدارترین پروتئین‌های عصاره بودند.

پس از رسوبدهی عصاره با سولفات آمونیوم در غلظت نهایی ۶۰ درصد تقریباً تمامی بخش پروتئازی عصاره تفکیک گردید. عبور این فراکسیون از ستون کربوکسی متیل سفارز تحت شرایط ذکر شده نموداری شامل دو قله عمده پروتئینی، یکی قبل از اضافه کردن شیب نمک و دیگری بعد از افزودن آن حاصل نمود که در شکل ۲ نمایش داده شده است. الکتروفورز فراکسیون‌های مختلف این دو قله پروتئینی در ژل ۱۵ درصد، در ستون‌های ۹-۱ شکل ۱ نمایش داده شده است.

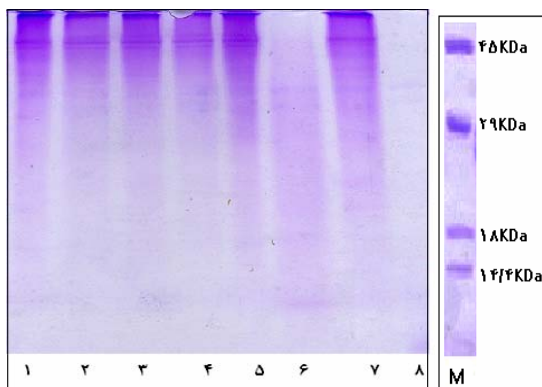


شکل ۱: الکتروفورز عصاره میوه انجیر و فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی تعویض کاتیون در ژل جدا کننده ۱۵ درصد ستون‌های ۶-۱ فراکسیون‌های بدست آمده قبل از افزودن کلرید سدیم و ستون‌های ۹-۷ مربوط به فراکسیون‌های بدست آمده بعد از افزودن کلرید سدیم، ستون ۱۰ مارکر و ستون ۱۱ عصاره میوه انجیر قبل از عبور از ستون کروماتوگرافی.



شکل ۲: منحنی کروماتوگرافی تعویض کاتیونی عصاره میوه انجیر در ستون کربوکسی متیل سفارز
 قله اول فراکسیون‌های به دست آمده قبل از افزودن نمک و قله دوم مربوط به فراکسیون‌های بعد از افزودن شیب نمک است.

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.

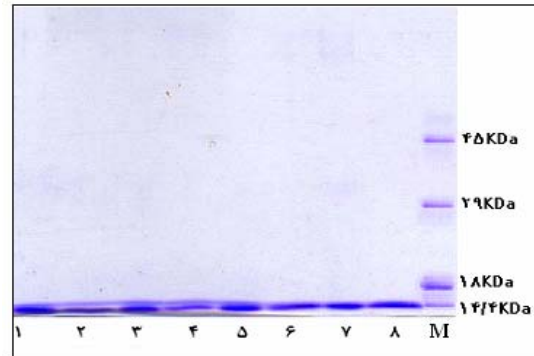


شکل ۶: الگوی SDS-PAGE اثر فیسین (۱µg/ml) بر ژلاتین (۱mg/ml).

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

بحث:

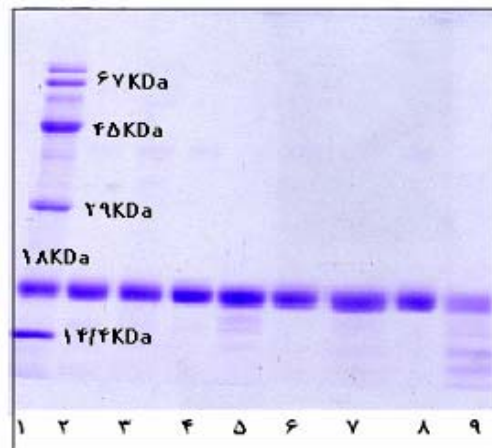
مطالعه حاضر نشان داد که رسوبدهی عصاره میوه نارس انجیر در غلظت نهایی ۶۰ درصد سولفات آمونیم نتایج بهتری نسبت به درصدهای دیگر آن در تفکیک فیسین بدست می‌دهد. بعلاوه نتایج دیگر مطالعات نیز نشان داد که فیسین رسوب داده شده، پس از عبور از ستون تمایلی مرکوریال-آگارز، دو جزء پروتئینی شامل فیسین و مرکوری- فیسین 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



شکل ۴: الگوی SDS-PAGE اثر فیسین (۱µg/ml) بر آلفالکتالبومین (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 بتالاکتوگلوبولین 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 بتالاکتوگلوبولین را به انواعی از پپتیدهای کوچکتر تجزیه نماید (ستون ۹).



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

این اساس 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 دیگر سیستم‌های پروتئازهای گیاهی مانند پاپائین و اکتینیدین چنین استنباط می‌شود که خصوصیات عملکردی و پروتئازی این آنزیم شبیه به پاپائین می‌باشد، در حالی که اثر اکتینیدین روی سوبستراهای مختلف تا حدودی متفاوت‌تر از این دو آنزیم است. با توجه به بعضی شباهتها و همچنین خصوصیات منحصر بفرد در هر یک از سیستم‌های پروتئازهای گیاهی و با عنایت به کاربردهای بالای آنها در صنایع مختلف، با انجام مطالعات بیشتر می‌توان، از مخلوطی از این پروتئازها در دامنه وسیع‌تری 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، تخلیص و وزن مولکولی آن به روش الکتروفورز تعیین گردید. تاثیر فیسین خالص بر پروتئین‌ها نشان داد که این آنزیم قادر به هضم کازئین بوده و دارای اثرات هیدرولازی کمتری بر بتا لاکتوگلوبولین و ژلاتین است و بر آلفالاکتالبومین اثر بسیار کمتری دارد. با توجه به اثرات پروتئازی فیسین بر پروتئین‌های مورد مطالعه، این آنزیم می‌تواند به عنوان کاندید مناسبی برای هضم کازئین و تولید فرآورده‌های حاصل از آن (تولید شیرهای هیدرولیز شده برای بیماران آلرژیک به شیر گاو) مطرح گردد.

سپاسگزاری:

با تشکر از آقای سعید نورمحمدی برای جمع آوری و تهیه میوه نارس انجیر و همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی برای کمک علمی و فنی در مراحل اجرای این مطالعه.

منابع:

1. Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wicz W, et al. Structural studies of cystein proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica* 2001; 48(1): 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 Sikk Um Kwa hakhoechi* 1986; 18: 270-70.

(۹/۱) و مثبت بودن آن در pH اسیدی، نتایج بهتری در جداسازی و تخلیص این پروتئین در رزین کربوکسی متیل سفارز در حضور بافر فسفات ۷ pH در شیب غلظتی کلرید سدیم بدست آمد.

با توجه به روش‌های متفاوت تعیین وزن مولکولی، تاکنون اوزان مختلفی در محدوده ۲۴-۲۸ کیلودالتون برای آنزیم فیسین گزارش نموده‌اند (۱۴،۱۵). محصول تخلیص شده در مطالعه حاضر شامل ۲ باند پروتئینی نزدیک بهم بود که این دو باند در محدوده ۲۴-۲۶ کیلودالتون قرار گرفتند که احتمالاً ایزوآنزیم‌های مختلف فیسین هستند و شناخت دقیق‌تر آنها نیازمند مطالعات بیشتر همچون اسپکتروسکوپی جرمی است. برطبق مطالعات دیگران به نظر می‌رسد که حداقل سه جزء فعال اصلی و چندین جزء فعال فرعی آنزیم در شیره *ficus glabrata* و حداقل ده جزء آنزیمی در شیره *ficus carica* وجود دارد. بطور کلی طراحی اجزاء آنزیم فیسین قراردادی بوده و از یک گروه تحقیقاتی به دیگری متفاوت می‌باشد (۶).

در ارتباط با تأثیر پروتئولیتیک فیسین، مطالعات معدودی انجام گرفته است اما از مقایسه نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه بر روی پروتئازهای گیاهی، چنین استنباط می‌شود که خصوصیات عملکردی و پروتئازی این آنزیم نسبت به اکتینیدین میوه کیوی شباهت بیشتری به پاپائین دارد (۱۶،۱۷). نتایج این مطالعه نشان داد که فیسین قادر است در شرایط مختلف بافاری، کازئین را هیدرولیز نماید. در طی مطالعات قبل که توسط همین گروه بر روی اکتینیدین میوه کیوی و پاپائین انجام شد، مشخص گردید که اثر اکتینیدین بر کازئین در pH های پائین‌تر (اسیدی) قویتر بوده ولی الگوی تأثیر پاپائین بر کازئین همانند فیسین بود (نتایج گزارش نشده). براین اساس، پاپائین و فیسین گزینه‌های مناسب‌تری جهت هضم کازئین شیر و محصولات حاصل از آن نسبت به اکتینیدین محسوب می‌شوند. نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که فیسین اثر هیدرولازی مناسبی بر آلفا لاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین در شرایط مورد آزمون ندارد و از این نظر تقریباً مشابه اثر اکتینیدین بر روی این پروتئین حیوانی است (۱۸). بعلاوه تأثیر فیسین بر روی ژلاتین به عنوان محصول هضم شده کلاژن نشان داد که در شرایط بافاری خنثی و بازی قادر به هیدرولیز این پروتئین می‌باشد. بر

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 specificities 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.

*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)