

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

دکتر امید رجبی^۱ - دکتر عبدالرضا وارسته^۲ - جواد دانای باغکی^۳ - علی براتیان^۳ - لیلا جهانگیری^۳

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 مونیو 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 ۰/۰۵M NH_4CO_3 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 کالیفرنای 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)

^۱ نویسنده مسؤل؛ دکترای داروسازی صنعتی؛ استادیار گروه آموزشی شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
آدرس: مشهد- دانشگاه علوم پزشکی مشهد- دانشکده داروسازی

تلفن: ۸۸۲۳۲۵۵-۹، ۰۵۱۱-۸۸۲۳۲۵۱. پست الکترونیکی:omidrajabi@yahoo.com

^۲ دکترای ایمونولوژی؛ مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی؛ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد

^۳ دانشجوی داروسازی؛ دانشکده داروسازی؛ دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

(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 لطیف کردن پوست
- ۲- صنایع غذایی (۱۳، ۱۴)
- استفاده در صنایع گوشت، جهت ترد کردن 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،

جنس فیکوس (*Ficus*) حدوداً 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، تری‌ترین‌ها و اسیدهای آلی موجود در آن مورد توجه محققان بوده است (۷، ۸). بررسی شیرابه درخت انجیر به کمک SDS-Page وجود پروتئین‌های با جرم مولکولی ۲۵ و ۴۸ کیلو دالتون 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 فعال شدن با عوامل کاهنده، خواص بسیار مشابه به پاپاین (*Papain*) (نام سنتتین 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 *Calimyrna* و *King*، *Stamforal*، *Black Mission* 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

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

میزان پروتئين موجود به روش برادفورد تعيين گرديد (۱۶). از پاپاين به عنوان پروتئين استاندارد در تعيين ميزان پروتئين استفاده شد.

جهت الکتروفورز، SDS-Page در شرایط احیاکننده با استفاده از ژل جداکننده هموزن ۱۲/۵٪ و ژل جمع کننده ۵٪ در ولتاژ ثابت به همراه شاخص استاندارد جرم مولکولی انجام گرديد (۱۳). رنگ آمیزی ژل ها با استفاده از روش نیترا ت نقره صورت گرفت.

دستگاه مورد استفاده از نوع Bio-Rad (آمریکا) بود. جرم مولکولی فیسین ها به کمک SDS-Page تخمین زده شد. منحنی استاندارد برای لگاریتم جرم مولکولی نشانگرها در مقابل مقادیر Rf رسم گرديد (۱۷).

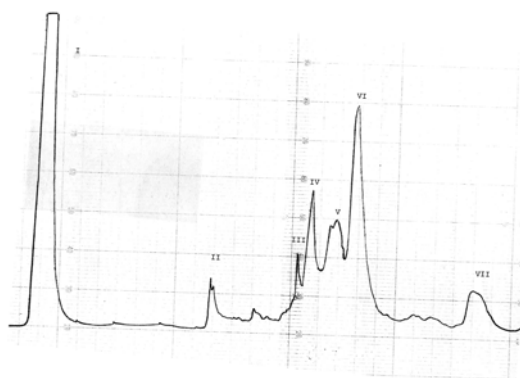
دیالیز توسط کیسه دیالیز با Cut Off=۱۰۰۰۰ شرکت Sigma (آمریکا) انجام شد. به منظور استخراج و خالص سازی، ۱۵ml شیرابه در ۲۵ml بافر فسفات pH=۷ سوسپانسیون شد. سوسپانسیون حاصله برای مدت سه ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد مخلوط و سپس سانتریفوژ گرديد تا مواد نامحلول آن جدا گردد. در مرحله بعد، عمل Salting Out با اضافه کردن ۱۷/۷ کلرید سدیم به ۱۰۰ml از محلول شفاف انجام گرديد. بعد از گذشت ۱۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، رسوب با سانتریفوژ جدا گرديد 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 گرديد.

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 گرديد 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 گرديد. بعد از گذشت ۱۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، رسوب با سانتریفوژ جدا گرديد 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 گرديد.

دستگاه مورد استفاده از نوع Bio-Rad (آمریکا) بود. جرم مولکولی فیسین ها به کمک SDS-Page تخمین زده شد. منحنی استاندارد برای لگاریتم جرم مولکولی نشانگرها در مقابل مقادیر Rf رسم گرديد (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 گرديد 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 گرديد. بعد از گذشت ۱۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، رسوب با سانتریفوژ جدا گرديد 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 گرديد.

دستگاه مورد استفاده از نوع Bio-Rad (آمریکا) بود. جرم مولکولی فیسین ها به کمک SDS-Page تخمین زده شد. منحنی استاندارد برای لگاریتم جرم مولکولی نشانگرها در مقابل مقادیر Rf رسم گرديد (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 گرديد 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 گرديد. بعد از گذشت ۱۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، رسوب با سانتریفوژ جدا گرديد 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 گرديد.

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] سديم کلرايد، سدیم فسفات، کلسیم کلرايد از شرکت Merck (آلمان) و نشانگر (Marker) استاندارد جرم مولکولی از شرکت Invitrogen (آمریکا) خریداری شد. میزان پروتئين موجود به روش برادفورد تعيين گرديد (۱۶). از پاپاين به عنوان پروتئين استاندارد در تعيين ميزان پروتئين استفاده شد. جهت الکتروفورز، SDS-Page در شرایط احیاکننده با استفاده از ژل جداکننده هموزن ۱۲/۵٪ و ژل جمع کننده ۵٪ در ولتاژ ثابت به همراه شاخص استاندارد جرم مولکولی انجام گرديد (۱۳). رنگ آمیزی ژل ها با استفاده از روش نیترا ت نقره صورت گرفت. دستگاه مورد استفاده از نوع Bio-Rad (آمریکا) بود. جرم مولکولی فیسین ها به کمک SDS-Page تخمین زده شد. منحنی استاندارد برای لگاریتم جرم مولکولی نشانگرها در مقابل مقادیر Rf رسم گرديد (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 گرديد 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 گرديد. بعد از گذشت ۱۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، رسوب با سانتریفوژ جدا گرديد 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 گرديد.



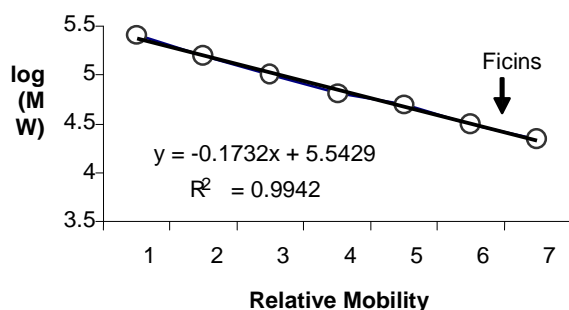
شکل ۱- کروماتوگرام رسوبات جدا شده از لاتکس (با استفاده از روش جداسازی با نمک) روی ستون Mono-S با گرادیان غلظت و pH بافر فسفات

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 ۰/۰۵M NH_4CO_3 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 پروتئولیتیک 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 ($P < 0.05$).



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

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).

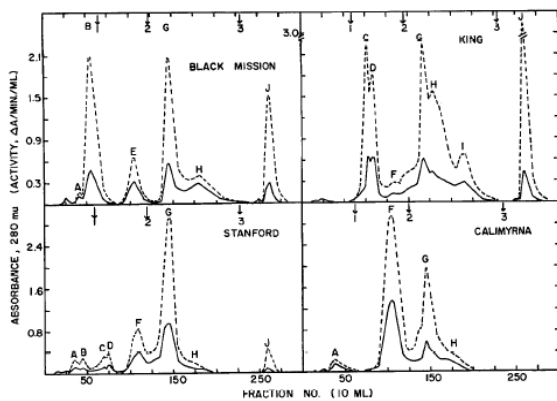
بررسی فعالیت پروتئولیتیک آنزیم‌ها به کمک روش Kuntiz انجام شد (۱۴). محلول ۰/۱ مولار بافر سدیم فسفات pH=۷ دارای غلظت‌های معینی از فیسین به همراه ۰/۰۰۱M NaEDTA و ۰/۵٪ از کازئین با حجم نهایی ۲۰ml برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. واکنش با اضافه کردن تری‌کلرو استیک اسید (۳ml و ۵٪ V/V) متوقف شد و بعد از انجام سانتریفیوژ، 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

مطالعات دقیق تری 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، پایین (از دسته سینتین 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

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 کالیفرنای 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 پروتئولیتیک ملاحظه نشده است (۱۱)؛ به هرحال جهت نشان دادن ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ این گیاه از نظر تنوع آنزیم‌های پروتئولیتیک موجود در آنها نیاز به

جدول ۱- خلاصه تخلص پروتئازهای موجود در شیرابه درخت انجیر

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

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

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. *Immunoheumatol* 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- Lampli 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.

Extraction and discrimination between four proteases from Khorasan native fig tree (*Ficus carica*)

O. Rajabi^{*}, A. Varaste^{**}, J. Danaee Baghaki^{***}, A. Baratian^{***}, L. Jahangiri^{***}

* Assistant Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

** Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

*** Student of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Abstract

Background and Aim: The protease activity of fig latex has been reported in several articles. This study was carried out aiming at a comparison between proteases of the latex of Khorasan native fig tree and those of carica subspecies.

Materials and Methods: In this experimental study, four latex proteases (Ficins) were extracted using salt fractionation and chromatography on Mono-S column (Ion exchange media). Parameters such as activity, concentration and molar extinction coefficient were determined at least 3 times per sample. The different samples were compared according to activity and molar extinction coefficient, using ANOVA statistical analysis. $P < 0.05$ was taken as significant.

Results: These proteases were similar with regard to molar extinction coefficient, activity and molecular weight. Activity and molecular weight were determined by casein precipitation and SDS-PAGE respectively. Besides, the enzymes showed different properties as to retention time on cation exchanging column. This is supposed to be because of little differences in their primary structures and peptide maps. Protein concentration and the activity of latex was calculated to be 110 (mg/ml) and 242 (IU/ml) respectively. Agents having enzymatic activity were found in fraction III-VI. Molecular weight of Ficins III- VI was estimated at about 26.5- 121. A 1% solution of proteins of Fractions III- VI in 0.05 M NH_4CO_3 had a molar absorption coefficient ($\epsilon_{280 \text{ nm}}$) of about 22, 21.5, 21, 21.9 respectively. Enzymatic activity of Ficins (fractions III-VI) using casein substrate was 61.6, 62.7, 63.4 and 67.2 (unit/mol) respectively.

Conclusion: According to this study, latex of Khorasan native Fig tree is relatively similar to Calimyrna subspecies growing in California/USA among the four subspecies.

Key Words: Fig latex; Ficin; Purification; Enzymatic activity