مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 27 (1)، 106-115، 2014

استخلاص و تنقية إنزيم الفيسين من أوراق التين واختبار كفاءته التحليلية

ام البشر حميد جابر و روضة محمود علي و مروة سلام سلمان

قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة، البصرة، العراق

المستخلص: شملت الدراسة الحالية استخلاص إنزيم الفيسين من أوراق التين التي جمعت من إحدى مواقع انتشار النبات الواقعة في كلية الزراعة / جامعة البصرة باستعمال سبعة محاليل تضمنت الماء المقطر ، محلول كلوريد الصوديوم بتركيزين 2 و 7% ، محلول دارئ الفوسفات مع السترات بتركيز 0.1 مولاري ودالة حامضية 7 ، الأسيتون المبرد ودارئ الفوسفات مع السترات ، الايثانول ومحلول Tris – HCl بتركيز 0.1 مولاري بدالة حامضية 9 لغرض تحديد أفضل محلول استخلاص وقد وجد إن محلول Tris – HCl أفضل محلول استخلاص حيث أعطى أعلى فعالية نوعية للإنزيم والتي بلغت 93.48 وحدة / ملغم . أضيفت كبريتات الامونيوم للمستخلص الإنزيمي بنسبة تشبع 20 – 90 % كخطوة أولى من خطوات التنقية إذ بلغت الفعالية النوعية 688.95 وحدة / غم بروتين بحصيلة إنزيمية 26.12 % وعدد مرات التنقية 6 مرة. بعدها مرر المستخلص الإنزيمي المركز على عمود الترشيح الهلامي Sephadex G100 فكانت الفعالية النوعية 769.23 وحدة / ملغم بروتين بحصيلة إنزيمية 25.09 % وعدد مرات التنقية 6.72 مرة بعدها مرر الإنزيم المنقى جزئيا والمديلز على عمود كروماتوغراقيا التبادل الايوني DEAE- Sephadex A-50 ، بلغت الفعالية النوعية 2733.36 وحدة / ملغم بروتين وعدد مرات التنقية 23.9 مرة و بحصيلة إنزيمية 15.43 %. بينت نتائج تحديد نقاوة إنزيم الفيسين عن وجود حزمة بروتينية واحدة للإنزيم عند الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بغياب العوامل الماسخة.

كلمات مفتاحية انز يم الفيسين، ورق التين، استخلاص، تنقية.

المقدمة

الإنزيمات هي عوامل مساعدة بايولوجية ذات طبيعة بروتينية ، تقوم بزيادة سرعة التفاعلات الكيميائية التي تحدث داخل الخلية الحية بدون أن تتغير خلال هذه التفاعلات . ويطلق على المواد المتفاعلة في التفاعلات الإنزيمية بالمواد الخاضعة Substrate (المواد التي يعمل عليها الإنزيم) (2). أستعملت الإنزيمات في مجالات علوم الأغذية والتقانات الاحيائية بشكل واسع ، ويمكن الحصول على الإنزيمات من الأنسجة النباتية والحيوانية ومن الأحياء المجهرية ، وذلك لان جميع الخلايا الحية تنتج الإنزيمات (1). تعد البروتييزات واحدة من أهم الإنزيمات الواسعة الانتشار في الطبيعة توجد في جميع الكائنات الحية كالنباتات والحيوانات والاحياء المجهرية، تضم مجموعة كبيرة من الانزيمات المحللة التي تقوم بتحليل البروتينات الى ببتيدات واحماض امينية ومن هذه الانزيمات انزيم الفيسين (EC 3.4.22.3) (7؛ 8). ينتمي التين إلى العائلة التوتية Moraceae family ،

يشمل أكثر من 1800 نوعا" معروفا" و منتشرا" على نطاق واسع في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية من العالم و ينتشر في العراق و خصوصا في مناطق الوسط والجنوب. يمتاز بسرعة نموه و كثرة تفرعاته، أكثر أنواع التين شيوعا الصالحة للأكل Fig (*Ficus carica*), the sycamore fig (*F. sycomorus*) , the banyan tree (*F. indica and F. benghalensis*) (10). ونظرا لما يمتاز به إنزيم الفيسين من تعدد استعمالاته التطبيقية في اغلب النظم الصناعية والغذائية والطبية ولا ينحصر وجوده في الثمار فقط وإنما يوجد في جميع أجزاء النبات (3)، لذلك هدفت الدراسة إلى استغلال أوراق التين في استخلاص إنزيم محلل للبروتين واختبار فعاليته التحليلية.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت أوراق التين الخضراء من إحدى مواقع انتشار النبات الواقعة في كلية الزراعة / جامعة البصرة ، في بداية شهر نيسان حيث تم حفظها في علب بلاستيكية محكمة الغلق أثناء جلبها للمختبر وغسلت بماء الحنفية ثم بالماء المقطر، وذلك لإزالة بقايا المواد والأتربة العالقة وتم فصل النصل عن الورقة لإجراء عملية الاستخلاص.

استخلاص الانزيم

استعملت محاليل عدة في استخلاص الإنزيم من الورقة والنصل كلا" على حدة واعتمدت الفعالية النوعية بوصفها مقياسا" لاختيار المحلول الأفضل في الاستخلاص .

أ : المحاليل المستعملة

1- ماء مقطر.

2- محلول كلوريد الصوديوم NaCl بتركيزين 2 و7 % (v/w).

3- محلول دارئ الفوسفات مع السترات Phosphate and citrate buffer بدالة حامضية7 المتكون من0.1 مولاري Tri sodium citrate ، 0.1 مولاري di sodium hydrogen phosphate ، 0.006 مولاري EDTA ، 0.006 مولاري L-Cysteine.

4- الاسيتون المبرد ودارئ الفوسفات مع السترات المذكور سابقا.

5- الايثانول.

6- محلول0.1 مولاري Tris-HCl بدالة حامضية 9 .

ب- طريقة العمل

اتبعت طريقة (6) لاستخلاص الإنزيم باستعمال محاليل الاستخلاص المذكورة اعلاه حيث اخذ 50 غم من الأوراق وأنصالها (25 غم من الورق و 25 غم من النصل) ثم فرمت ومزجت مع محلول الاستخلاص المبرد مسبقا{ الذي أعطى أعلى فعالية نوعية للإنزيم } بنسبة 5:1 (وزن : حجم) وجنست بخلاط كهربائي (blender) وتركت على محرك مغناطيسي لمدة 20 دقيقة في حمام ثلجي ثم اجري نبذ مركزي 10000 xg عند 4م° لمدة 10 دقائق، فصل الرائق وتم تقدير الفعالية الإنزيمية في كل من الرائق والراسب، بعدها خلط الراسب مع محلول الاستخلاص بنسبة 2:1 (وزن: حجم) وأجري النبذ المركزي عند درجة حرارة 4م بسرعة

xg 10000 لمدة 10 دقائق وكررت العملية مرات عدة لاستخلاص اكبر كمية من الانزيم في الرائق وقدرت الفعالية وتركيز البروتين فيه لاستخراج الفعالية النوعية .

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography

اجريت عملية الترشيح الهلامي باستعمال سيفادكس Sephadex G-100

كروماتوغرافيا التبادل الايوني Ion exchange

تقدير الفعالية للمستخلص الانزيمي

قدرت الفعالية التحليلية حسب طريقة (13).

أ- المحاليل المستعملة

1- محلول الفوسفات الدارئ phosphate buffer بتركيز 0.1 مولاري ودالة حامضية 7.

2- محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 1 مولاري

3- محلول 1% كازين.

4- محلول 10% TCA .

ب- طريقة العمل

أضيف 1 مل من المستخلص الإنزيمي إلى 1 مل من محلول رقم 3 وحضن في حمام مائي بدرجة حرارة 55 م ولمدة 20 دقيقة ثم أضيف 3 مل من محلول رقم 4 لإيقاف التفاعل ، أما العينة الضابطة فقد حضرت بالطريقة نفسها عدا إضافة 3 مل من محلول رقم 4 قبل إضافة المستخلص الإنزيمي أجريت بعد ذلك عملية النبذ المركزي xg 4500 لمدة 20 دقيقة وقيست الامتصاصية عند طول موجي 280 نانومتر.

تقدير تركيز البروتين اتبعت طريقة (12) لتقدير تركيز البروتين باستعمال البومين المصل البقري Bovine Serum Albumin .

تنقية الانزيم Enzyme purification

التركيز بكبريتات الامونيوم

تم تركيز المستخلص بكبريتات الامونيوم بنسبة تشبع 20-90% واجراء عملية الديلزة ضد الماء المقطر باستعمال اكياس التنافذ الغشائي.

Chromatography

اجريت هذه الخطوة باستعمال DEAE-Sephades A-50

تحديد نقاوة الانزيم Enzyme purity assay

اتبعت تقنية الترحيل الكهربائي في هلام متعدد اكريل امايد بغياب العوامل الماسخة لتحديد نقاوة الإنزيم Slab poly acryamide gel electrophoresisتبعا لطريقة (11) والموصوفة من قبل (9) في اختبار نقاوة الإنزيم .

النتائج والمناقشة

استخلاص الانزيم

تشير النتائج الموضحة في الشكل (1) إن أفضل محلول لاستخلاص إنزيم الفيسين من أوراق ومن نصل التين هو محلول Tris-HCl بتركيز 0.1 مولاري بدالة حامضية 9 فقد تميز على بقية محاليل الاستخلاص الأخرى وهو الأفضل ، إذ انه أعطى أعلى فعالية نوعية 93.48 و 106.5وحدة /ملغم بروتين لكل من الورق و النصل على التوالي مقارنة بمحاليل الاستخلاص الأخرى كما

يلاحظ ان الفعالية النوعية كانت متقاربة في كل من النصل والورقة لذلك تم دمج النصل مع الورقة واجريت عملية الاستخلاص باستعمال محلول Tris-HCl .

تنقية الانزيم

تركيز الانزيم باستعمال كبريتات الامونيوم

اظهر الشكل (2) خطوة الترسيب التدريجي للإنزيم باستعمال نسب إشباع متدرجة من كبريتات الامونيوم 20 – 90% ، إذ لوحظ حدوث ارتفاع واضح بشكل تدريجي للفعالية النوعية للإنزيم في الراسب الناتج لغاية نسبة إشباع 90% وقد أعطت هذه الخطوة فعالية نوعية مقدارها 686 وحدة / ملغم بروتين وحصيلة إنزيمية بلغت 26.12 % بعدد مرات تنقية مقدارها 6 مرة ، جدول (1). إن ارتفاع الفعالية والحصيلة الإنزيمية (%) في هذه الخطوة قد يعزى إلى دور أملاح كبريتات الامونيوم التنشيطي على فعالية الفيسين.

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (3) وجود خمس قمم بروتينية عند قياس الامتصاصية على طول موجي مقداره 280 نانومتر للأجزاء المستردة ، وعند قياس الفعالية الإنزيمية لأجزاء هذه القمم ظهر أن فعالية الإنزيم التحليلية كانت محصورة بالأنابيب من 30-52 و 100- 125 على التوالي ومن 125 – 149 أما القمة الأولى والقمة الأخيرة فكانت خالية تماما من اي فعالية . و وجد ان القمة الثانية احتوت على اعلى فعالية نوعية تحليلية مقدارها 769.23 وحدة / ملغم بروتين بحصيلة إنزيمية بلغت 25.09 % أما عدد مرات التنقية فبلغت6.91 مرة مقارنة بالقمم الاخرى التي اهملت حيث ان فعاليتها كانت اقل من القمة الثانية كما موضح في الجدول (1).

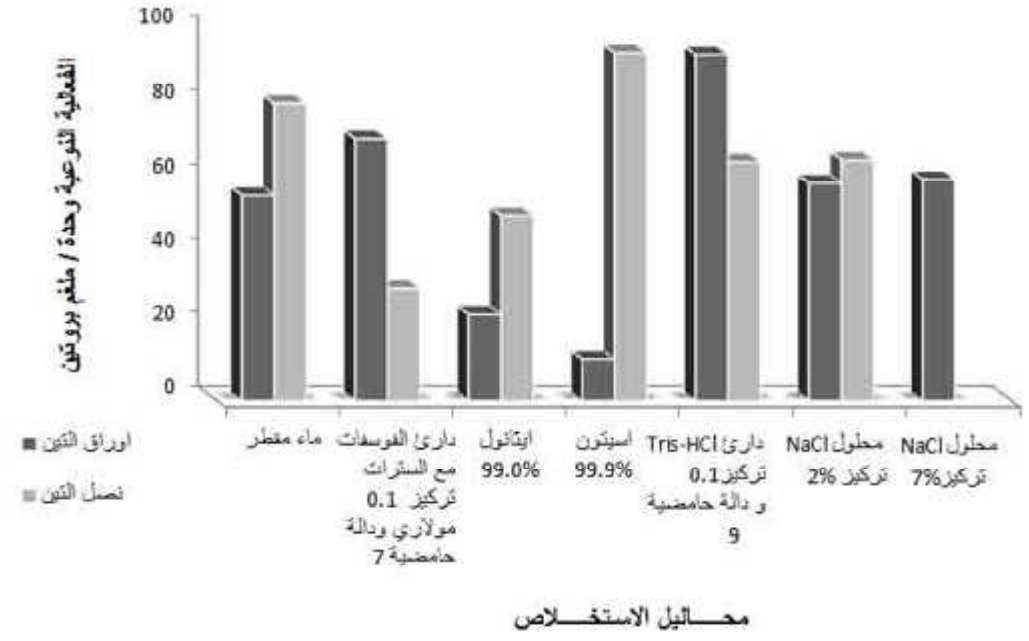
كرماتوغرافيا التبادل الايوني

بينت النتائج في الشكل (4) ظهور قمة بروتينية واحدة في مرحلة الغسل تخلو من الفعالية الإنزيمية مما يدل على أن هذه القمة تضم البروتينات ذات الشحنة الموجبة (Cation) وخروجها في مرحلة الغسل نتيجة لحصول تنافر للشحنات بينها وبين مادة المبادل، كما ان خلو هذه القمة من إنزيم الفيسين يدل على انه يحمل شحنة سالبة جعلته يرتبط بقوة بالمبادل الايوني ، لذلك أجريت عملية استرداد الإنزيم بأسلوب التدرج الملحي الخطي، اذ لوحظ ظهور عدة قمم بروتينية وان هناك قمة واحدة اعطت فعالية انزيمية تحليلية دون القمم الباقية، جمعت اجزاء هذه القمة التي تضم الانابيب من 108 -125 بفعالية نوعية تحليلية 2733.36 وحدة / ملغم بروتين وحصيلة انزيمية مقدارها 15.43 % على التوالي وعدد مرات التنقية 23.90 مرة جدول رقم (1).

تحديد نقاوة الانزيم

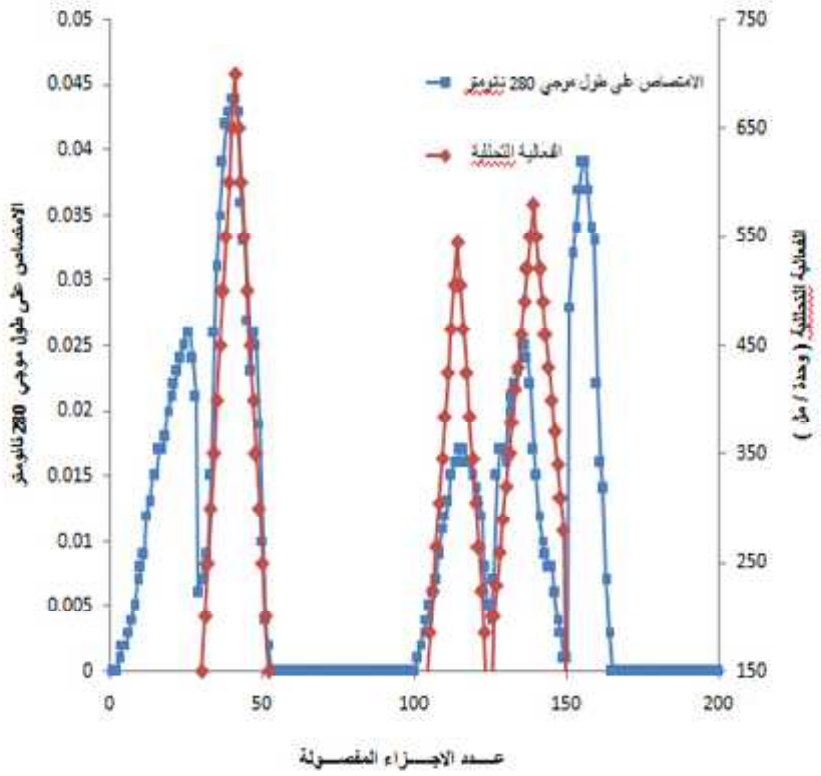
بينت النتائج في الشكل (5) الترحيل الكهربائي للمستخلص الإنزيمي في هلام الاكريل امايد، احتوى الجزء A على مجموعة من الحزم نتيجة لاحتواء المستخل الأنزيمي الخام على مجموعة من البروتينات، أما الجزء (B) فيظهر وجود سبع حزم في هلام الاكريل امايد خلال الترحيل الكهربائي

لمستخلص الإنزيم الناتج من الخطوة الثانية من خطوات التنقية وهي الترسيب بكبريتات الامونيوم، ويوضح الشكل (C) احتواء هلام الاكريل امايد على خمس حزم بروتينية للمحلول الإنزيمي الخارج من خطوة الترشيح الهلامي، أما الهلام (D) يمثل خطوة التبادل الايوني وظهرت فيه حزمة بروتينية واحدة وهذا يعطي صورة واضحة على مدى كفاءة عمليات التنقية الهادفة للتخلص من كل البروتينات المرافقة للإنزيم والحصول عليه بشكل منفرد ، مما دل على النقاوة العالية للأنزيم، إذ تعتمد حركة البروتينات في الهلام على محصلة الشحنات التي يحملها البروتين بالدرجة الرئيسة وعلى شكله وحجمه بالدرجة الثانية ويتحرك البروتين في دالة حامضية ثابتة في مجال كهربائي بين القطبين السالب والموجب (5).

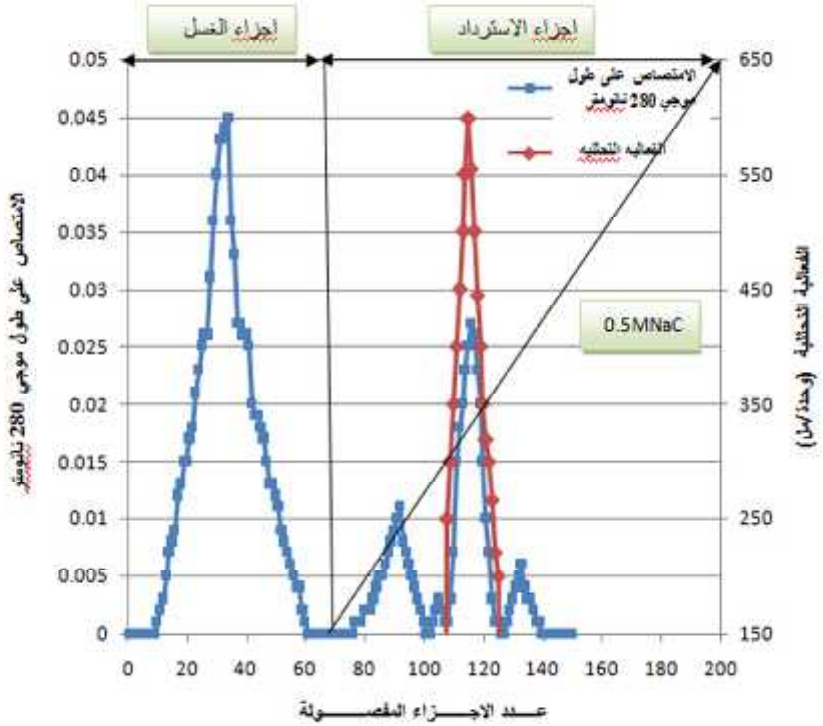


شكل (1): الفعالية النوعية لورق ونصل التين المستخلص باستعمال محاليل مختلفة.

شكل (2): الفعالية الانزيمية للفيسين المركز بوساطة كبريتات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت بين (20– 90).



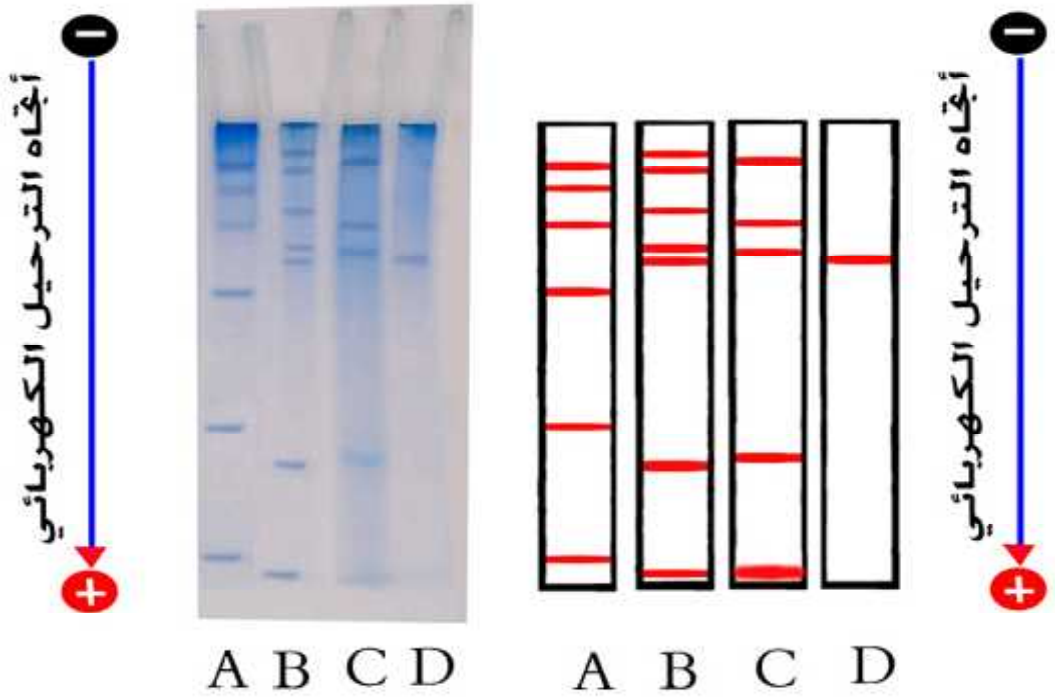
شكل (3): كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي لأنزيم الفيسين المنقى من أوراق التين بأستعمال عمود Sephadex G-100 بأبعاد(2×80) سم بمعدل جريان (30 مل ساعة) بواقع 3 مل /جزء .



شكل (4): كروموتوكرافيا التبادل الأيوني لإنزيم الفيسين المنقى من أوراق التين باستعمال المبادل الأيوني DEAE Sephadex A-50 بأبعاد(1.5 ×40) سم ، والموازن بمحلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولاري وبدالة حامضية 5.5 وتدرج ملحي (0.5-0) مولاري NaCl بمعدل جريان (30 مل /ساعة) بواقع 3 مل / أنبوب.

جدول (4 – 1): خطـوات تنقيـــة إنزيم الفيسيـــن من أوراق التيـن (الفعالية التحللية)

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة /مل)	البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة /ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	الحصيلة (%)	عدد مرات التنقية
المستخلص الخام	500	210.45	1.84	114.38	105225	100	1
الترسيب بكبريتات الامونيوم (20 - 90%)	38	723.40	1.05	688.95	27489	26.12	6
الترشيح الهلامي Sephadex G 100	66	400	0.52	769.23	26400	25.09	6.72
التبادل الايوني DEAE- Sephadex A50	54	300.67	0.11	2733.36	16236.18	15.43	23.90



شكل (5): الترحيل الكهربائي بغياب المواد الماسخة SDS في هلام متعدد الاكريل امايد للفيسين المنقى من اوراق التين

- **A : المستخلص الأنزيمي الخام**
- **B : المستخلص الأنزيمي المركز بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع (20–90) %**
- **C : الإنزيم المنقى بواسطة الترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G-100**
- **D : الإنزيم المنقى بواسطة التبادل الايوني باستعمال DEAE Sephadex A-50**

الاستنتاجات :

من خلال النتائج التي حصلنا عليها يمكن أن نستنتج إن إنزيم الفيسين موجود في نصل و أوراق التين.

المصادر

1-دلالي، باسل كامل (1983). فهم الإنزيمات .مطابع جامعة الموصل – جامعة الموصل.

2-دلالي ، باسل كامل والركابي، كامل حمود (1988). كيمياء الأغذية. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.

2-القريشى، عبد العال فرحان و احمد درويش جبار (2009). فصل انزيم الفيسين من الحليب النباتي للتين *Ficus carica* latex وتنقيته ودراسة بعض صفاتة. مجلة واسط للعلوم والطب، 2 (2) : 55-66.

3-Berridage, N. J. (1955). Purification and assay of rennin. In: Colowick, C. F. and Kaplan, N. O. (Eds.). Methods in Enzymology. Vol. 2. Academic press, New York.

4-Blackshear, L. J. (1984). Systems to polyacrylamide gel electrophoresis In Jakopy, W.B. (Ed.). Methods in Enzymology, Vol. 104, Academic Press. Inc. Harcourt Brace.

Javonovich Publishers, Pp: 237-256.

5-Dahot, M.U.; Khan, M. Y. and Memon, A. N. (1990). Screening of some pakistani plants for milk clotting activity. Journal of Islamic Academy of Sciences,3(4): 284-286.

6-Devaraj, K . B . ; Kumar, P. R. and Prakash, V. (2008). Purification, characterization , and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. J. Agric. Food Chem., 56: 11417-11423.

7-Englund, P.T. ;King, T. P.; Craig, L. C.and Walti, A. (1968). Studies on Ficin .I . Its isolation and characterization. Biochemistry, 7(1): 163-175.

8-Garfin, D. E. (1990). Purification procedures Electrophoretic Methods. In: Murray, E.D. and Dentscher, P. J. (Eds.). Methods in Enzymology. Academic Press, New York. Pp: 425-441.

9-Imran, A . ; Jat, R .K. and Varnika, S. (2011). A Review on traditional, pharmacological , pharmacognostic properties of *Ficus carica* (Anjir) . International Research Journal of Pharmacy , 2(12): 124 -127.

9-Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

10-Lowry, O.H.; Rosobrough, N.; Far, A.L.; and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. Journal Biological Chemistry, 193: 265-275.

11-Whitaker, J. R. (1957). Properties of the proteolytic enzymes of commercial ficin. J. Food Research, 22: 483-493.

Basrah J. Agric. Sci., 27 (1): 106-115, 2014

Extraction and Purification of Ficin from Leaves of Ficus and Study it's Proteolytic Efficiency

Aum-el-Basher, .H. Jaber, Raodah. M. Ali and Marwa, S. Salman

Department of Food Sciences, Agriculture College, Basrah University, Basrah, Iraq

Abstract: The present study aimed to extraction and purification ficin enzyme which extracted from leaves of Ficus and study it's proteolytic efficiency. Many solutions were used for extraction such as distilled water, sodium chloride (2 and 7%) solution ,Sodium Phosphate with citrate solution 0.1M and pH 7, Ethanol, cold acetone with citrate and phosphate solution and Tris-Hcl 0.1 M, pH 9 in order to find out the best extraction solution. Tris-HCl 0.1 M pH 9 solution was the best extraction solution which gave the highest specific activity being 93.48unit / mg Protein . Protein content for the crude enzyme extracts was precipitated by gradual addition of solid ammonium sulphate to final saturation of 20 -90% the activity being 688.95 unit / mg Purification Folds 6 time and 26.12% as a yield . Gel filtration followed by Sephadex G-100 and ion exchange chromatography through DEAE Sephadex A-50 columin were used to complete purification of ficin and tested proteolytic activity in each step of purification which exhibit 2733.36, Purification Folds 23.90 time and 15.43% as a yield. The purity of ficin was examined by poly acryl amide gel electrophoresis.

Key words: Ficin enzyme, Leaves of fig , Extraction, Purification.