Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 15:21 +0430 on Wednesday September 20th 2017

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره شانزدهم شماره ۵۴ مهر و آبان سال ۱۳۸۵ (۲۶-۲۱)

استخراج، شناسایی و بررسی فعالیت آنزیم پاپائین میوه Carica papaya ازایران

محمد آزادبخت(Ph.D.)*+ **محمدحسین طبایی** (Ph.D.)** **هوشنگ کیوانی** (Ph.D.)***

چکیده

سابقه و هدف: پاپائین یک آنزیم پروتئولیتیک بوده که از شیرابه خشک و خالص شده میوه خربزه درختی (Carica papaya) از خانواده Caricaceae به دست می‌آید. در پزشکی از پاپائین به عنوان هضم کننده و برداشتن نسوج فاسد و مرده و در داروسازی به عنوان عامل پخش کننده داروها استفاده می‌شود. بیش‌ترین مقدار مصرف پاپائین در صنایع گوشت و کالباس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، شیرابه خام میوه‌های کاملاً رشد کرده و نارس درخت خربزه درختی از ناحیه سرباز سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شد. برای جمع‌آوری شیرابه گیاه، با چاقو چندین برش روی میوه ایجاد کرده (عمق برش بسیار مهم است) ، و پس از جمع‌آوری شیرابه سفید رنگ خارج شده ، در حرارت مصنوعی (۳۰°C) خشک گردید.

به منظور استخراج پاپائین ابتدا عصاره تام توسط یک ماده جاذب (خاک دیاتومه) جذب و بعد با استفاده از سیستئین هیدروکلراید، پاپائین، کیمو پاپائین و پروتئین‌ها به شکل محلول در آمده و پس از صاف کردن به وسیله باز و رساندن به pH مناسب، پروتئین رسوب داده شد. سپس با استفاده از سولفات آمونیوم، کیموپاپائین را از پاپائین جدا نموده و در نهایت با استفاده از سدیم کلراید، پاپائین از محلول رسوب داده و خالص‌سازی گردید.

برای شناسایی پاپائین از روش الکتروفورز و بررسی طیف IR و مقایسه با پاپائین استاندارد استفاده شد. برای اندازه‌گیری فعالیت پاپائین استخراج شده از روش USP استفاده گردید.

یافته‌ها: در این تحقیق ، ۱/۲ گرم پاپائین از ۱۰۰ گرم شیرابه به دست آمد. همچنین نتایج نشان داده است که الگوی الکتروفورز و طیف IR پاپائین استخراج شده مشابه پاپائین استاندارد است.

استنتاج: فعالیت پاپائین استخراجی برابر ۵۸۰۰U/mg بود که در مقایسه با پاپائین استاندارد با فعالیت ۶۰۰۰U/mg در حد قابل قبولی است.

واژه های کلیدی : پاپائین، کاریکا پاپایا، خربزه درختی، آنزیم پروتئولیتیک

* متخصص فارماکوگنوزی، عضو هیأت علمی (دانشیار) مرکز تحقیقات علوم دارویی و دانشگاه علوم پزشکی مازندران
+ ساری : کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد- دانشکده بهداشت
** متخصص فارماکوگنوزی، عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
*** دکترای داروساز

تاریخ دریافت : ۸۴/۲/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۴/۴/۲۶ تاریخ تصویب : ۸۵/۳/۱۶

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 15:21 +0430 on Wednesday September 20th 2017

مقدمه

پاپائین یک آنزیم پروتئولیتیک است که از شیرابه میوه نارس گیاه خربزه درختی با نام علمی Carica Papaya L. از خانواده Caricaceae به دست می‌آید(۱). این گیاه درختی است همیشه سبز به ارتفاع ۸ – ۶ متر، دارای ساقه‌های اسفنجی با مرکز توخالی، با چوبی صاف و نرم است. برگ‌ها در انتهای ساقه نوک تیز قرار دارند و مستقیماً به ساقه متصل هستند. میوه‌های نارس آن سبز رنگ و به طول حدود ۳۰cm که مستقیماً به انتهای ساقه درخت چسبیده‌اند. میوه پس از رسیدن به رنگ زرد در می‌آید(۳-۲).

پاپائین پودری سفید یا سفید مایل به زرد دارای وزن مولکولی ۲۳/۰۰۰ که از ۲۱۲ اسیدآمینه تشکیل شده و اسیدهای آمینه به وسیله سه پل دی‌سولفیدی در سه محل به هم متصل شده و یک گروه سولفیدریل آزاد نیز دارد. پاپائین در آب و گلیسیرین محلول بوده و قدرت تجزیه پروتئین آن بسیار بیش‌تر از پپسین است. ۰/۱ قسمت از این آنزیم توانایی حل کردن ۲۰۰ – ۱۰۰ قسمت از فیبرین لخته شده را دارد(۶-۴).

از پاپائین به عنوان هضم‌کننده پروتئین‌ها استفاده می‌شود چون فعالیتی شبیه به پپسین دارد. همچنین از آن برای جدا کردن قسمت Fab از Fc ایمنوگلوبولین‌ها استفاده می‌شود(۸-۷). محلول موضعی پاپائین(۱۰ درصد) برای درمان ضایعات پوستی‌مثل دمل‌های چرکی و در از بین بردن پروتئین‌های رسوب کرده روی لنزهای چشمی بکار برده می‌شود. پاپائین در صنایع گوشت و کالباس استفاده وسیعی دارد. همچنین در صنایع دباغی برای تمیز کردن ابریشم و پشم قبل از خشک کردن و برای جدا کردن موها ازچرم قبل‌از دباغی استفاده می‌شود(۴،۱۰-۹).

برای تهیه پاپائین از میوه خربزه درختی، شیارهایی در چهار سمت میوه کاملاً رشد یافته ولی نارس ایجاد می‌شود. شیرابه چند ثانیه به راحتی جاری می‌شود ولی بزودی به صورت توده سفتی در می‌آید. توده سفت در معرض آفتاب و یا حرارت مصنوعی خشک می‌گردد (حرارت مصنوعی، پاپائین خام با درجه بهتری بدست می‌دهد). جهت استخراج و خالص‌سازی پاپائین از روش‌های مختلفی استفاده شده است که از جمله آنها حل کردن پاپائین خام در آب و رسوب دادن با الکل، حل کردن در محلول‌های اسیدهای آمینه و رسوب دادن با املاح مختلف می‌باشد(۱۱).

پاپائین خام دارای چندین آنزیم می‌باشد ولی مهم‌ترین آنها آنزیم‌های پروتئولیتیک (پروتئیناز) شامل پاپائین، کیموپاپائین A و B ، پروتئیناز A و B ، پاپایا پپتیداز A می‌باشد. در پاپائین خام علاوه بر آنزیم‌های پروتئولیتیک، آنزیم‌های دیگری از جمله گلیکوزیدازها، پکتین استرازها، لیپازها و فسفاتازها نیز وجود دارند(۸،۴،۱).

از پاپائین خام،پاپائین خالص وکیمو پاپائین‌استخراج می‌گردد. از کیمو پاپائین جهت درمان فتق دیسک مهره‌ای کمری استفاده می‌گردد(۴).

هدف این‌تحقیق استخراج پاپائین ازشیره میوه نارس گیاه خربزه درختی ایرانی، همچنین شناسایی فعالیت پروتئولیتیک آن بوده است.

مواد و روش ها

خاک دیاتومه (Art. 2693)، سیستئین هیدروکلراید (Art. 2839) آمونیوم سولفات (Art. 1216) ، سدیم فسفات دی بازیک، EDTA ، تری کلرواستیک اسید، سیتریک اسید، کازئین سدیم کلراید، پاپائین استاندارد و تیروزین همگی از نوع مرک تهیه شده است.

دستگاه شامل: IR مدل Bruker X – 100 ، الکتروفورز (ژل الکتروفورز مدل Beckman و از نوع پلی‌اکریلامید/SDS)، اسپکتروفتومتر مدل Cecil 2000

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 15:21 +0430 on Wednesday September 20th 2017

تهیه نمونه: در این تحقیق، با مراجعه به منطقه سرباز از شهرستان چاه بهار در استان سیستان و بلوچستان، روی میوه نارس درخت خربزه درختی، با یک چاقو در چند سمت با عمق معین برش داده و شیرابه در شیشه‌ها جمع‌آوری گردید و در حرارت مصنوعی($30^{\circ C}$) خشک شد. نام علمی گیاه با توجه به نمونه هرباریومی و توسط بخش گیاه‌شناسی دانشکده علوم شیراز تایید گردید.

استخراج پاپائین: برای استخراج پاپائین از روش کیم[1] و اسمیت (۱۹۵۴) با کمی اصلاحات استفاده گردید(۱۲). جهت استخراج، ابتدا ۱۰۰ گرم شیره خشک شده با ۵۵ گرم خاک دیاتومه و ۹۰ گرم شن شسته شده در یک هاون مخلوط کرده و پس از اضافه کردن ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سیستئین هیدروکلراید ۰/۰۴ مولار (در سود ۰/۰۵۴ مولار)، مخلوط تکان داده شد. سوسپانسیون را مدتی ساکن قرار داده و پس از جدا کردن محلول رویی، به محلول و رسوب مجدداً محلول سیستئین اضافه شد طوری که حجم کل استخراج به یک لیتر رسید. محلول با فیلتر واتمن[2] و با استفاده از قیف بوخنر[3] و یک فشار مکش ملایم صاف گردید. محلول صاف شده به رنگ سبز روشن با pH ۵/۵ است (فراکسیون ۱). محلول صاف شده با سود نرمال به آهستگی به pH ۹ رسانده شد (سود باعث رسوب پروتئین‌ها می‌گردد). رسوب حاصل با سانتریفوژ با دور ۲۶۰۰rpm و به مدت یک ساعت جدا شد. به مایع صاف شده (فراکسیون ۲) به آرامی آمونیوم سولفات اضافه گردید تا پاپائین رسوب کرده و کیموپاپائین به شکل محلول باقی ماند. رسوب (فراکسیون۳) توسط سانتریفوژ با دور ۲۵۰۰rpm به مدت یک ساعت جدا گردید. فراکسیون ۳ دوباره با ۴۰۰cc محلول آمونیوم سولفات شسته شده و رسوب مثل مرحله قبل با سانتریفوژ جدا شد. رسوب حاصل در ۳۵۰cc محلول ۰/۰۲ مولار سیستئین هیدروکلراید (ایجاد pH ۷ – ۷/۵) حل شده و ۴۰ گرم سدیم کلراید به آن اضافه گردید. پاپائین به صورت دانه‌های سفید رنگ رسوب می‌کند. این سوسپانسیون به مدت یکساعت در دمای $4^{\circ C}$ قرار داده شد. و سپس با دور ۲۵۰۰rpm به مدت یک ساعت سانتریفوژ شد. رسوب در ۲۵۰ml محلول سیستئین هیدروکلراید ۰/۰۲ مولار (pH ۶/۵) حل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اطاق قرار داده شد. کریستال‌های درخشنده پاپائین در این مدت ظاهر شد که توسط سانتریفوژ با دور ۲۵۰۰rpm جدا گردید.

شناسایی پاپائین: برای شناسایی پاپائین از الکتروفورز سلولز استات، ژل الکتروفورز، و تهیه طیف IR و مقایسه آنها با پاپائین استاندارد استفاده گردید.

تعیین فعالیت پاپائین استخراجی: برای بررسی فعالیت پاپائین از روش USP استفاده گردید. دراین روش از کازئین به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود. با اثر مقادیر مختلف و استاندارد پاپائین بر روی کازئین، تیروزین آزاد شده و با تری‌کلرواستیک اسید ایجاد کمپلکس رنگی می‌نماید. جذب کمپلکس رنگی مذکور در طول موج ۲۸۰nm اندازه‌گیری شده و نمودار بیر- لامبرت رسم می‌شود. با انجام روش فوق روی پاپائین استخراج شده و استفاده از نمودار مذکور، میزان فعالیت پاپائین استخراجی تعیین گردید(۵).

یافته ها

در این تحقیق ۱/۲ گرم پاپائین از ۱۰۰ گرم شیرابه به دست آمد.

شناسایی پاپائین

برای شناسایی پاپائین استخراج شده از دو نوع الکتروفورز و همچنین مقایسه طیف IR پاپائین استخراج شده و پاپائین استاندارد استفاده شد.

1. Kim and smith
2. Wathman
3. Bokhner

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 15:21 +0430 on Wednesday September 20th 2017

در الکتروفورز، از دو الکتروفورز سلولز استات و ژل الکتروفورز استفاده گردید. الگوی به دست آمده از پاپائین استخراج شده و پاپائین استاندارد، دقیقاً تائیدی بر پاپائین استخراجی بود. ژل الکتروفورز برای پروتئین‌ها نسبت به الکتروفورز سلولز استات دارای مزایای بیش‌تری است زیرا به راحتی تهیه می‌شود، ضمناً شفاف بوده و می‌توان تحت اشعه UV ماکزیمم جذب آن را مطالعه نمود و همچنین دوباره حل کردن آن بهتر انجام می‌گیرد. شرایط الکتروفورز در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

جدول شماره ۱ : شرایط الکتروفورز برای پاپائین

شرایط / نوع	بافر	جریان (mA)	ولتاژ (V)	زمان (H)
ژل الکتروفورز	استات pH = ۴ و نیروی یونی(μ =۰/۱)	۱۰	۲۰۰	۲/۵
الکتروفورز سلولز استات	استات pH = ۴ و نیروی یونی(μ =۰/۱)	۲	۲۲۰	۴

نمودار شماره ۱ و ۲ به ترتیب طیف IR پاپائین استاندارد و پاپائین استخراج شده را نشان می‌دهد. همان‌طوری‌که در این دو تصویر ملاحظه می‌شود، پیک‌های IR مربوط به پاپائین استاندارد و پاپائین استخراجی دقیقاً مشابه هم است.

نمودار شماره ۱ : طیف IR پاپائین استاندارد

نمودار شماره ۲ : طیف IR پاپائین استخراجی

تعیین فعالیت پاپائین استخراج شده:

به علت غلظت کم آنزیم‌ها،اندازه‌گیری با روش‌های شیمیایی مانند آنچه در اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌ها به کار می‌رود، کم‌تر امکان‌پذیر می‌باشد. لذا میزان آنزیم‌ها را با واحد قراردادی مشخص می‌نمایند. یک واحد بین‌المللی (IU) مقدار آنزیمی است که بتواند در مدت زمان یک دقیقه واکنش یک میکرومول سوبسترا را کاتالیز نماید. طبق تعریف USP، فعالیت آنزیم پاپائین، فعالیتی است که معادل ۱ میکروگرم تیروزین را از سوبسترای کازئین در شرایط معین آزاد کند.

در اندازه‌گیری فعالیت پاپائین، سیستئین باعث احیا شدن باندهای دی‌سولفیدی به گروه آزاد سولفیدریل می‌شود و به‌عنوان عامل فعال‌کننده عمل می‌کند. هنگامی که سیستئین بدون EDTA به کار برده می‌شود، فعالیت پاپائین کم‌تر از موقعی است که هر دو با هم به کار برده می‌شوند. با اثر پاپائین بر روی کازئین، اسید آمینه تیروزین آزاد می‌گردد که این اسید آمینه با تری‌کلرو استیک اسید ایجاد کمپلکس رنگی می‌کند. میزان جذب این کمپلکس در طول موج ۲۸۰nm به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. جدول ۲ غلظت و میزان جذب استانداردها (پاپائین) و نمونه پاپائین استخراجی را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 15:21 +0430 on Wednesday September 20th 2017

جدول شماره ۲ : غلظت و میزان جذب استانداردها (پاپائین) و نمونه پاپائین استخراجی

نمونه	S_1	S_2	S_3	پاپائین استخراجی
غلظت	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۴۰	۰/۰۲۹
میزان جذب	۰/۰۵	۰/۰۷۵	۰/۱۰۰	۰/۰۷۴

با استفاده از مقادیر جذب و غلظت مربوط به استانداردهای پاپائین، نمودار بیر- لامبرت رسم گردید و با توجه به میزان جذب، فعالیت پاپائین استخراج شده با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:

$$\text{فعالیت پاپائین استخراجی (U/mg)} = \frac{A_2}{A_1} * ۶۰۰۰$$

A_1 و A_2 به ترتیب میزان جذب محلول آبکی پاپائین استاندارد و استخراجی است که در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید، عدد ۶۰۰۰ میزان فعالیت پاپائین استاندارد براساس U/mg است. طبق فرمول میزان فعالیت پاپائین استخراجی برابر است با:

$$\frac{۰/۰۲۹}{۰/۰۳۰} * ۶۰۰۰ = ۵۸۰۰ \text{U/mg}$$

لذا میزان فعالیت نمونه پاپائین استخراجی، ۵۸۰۰ واحد در هر میلی‌گرم می‌باشد.

بحث

پاپائین و کیموپاپائین دو آنزیم پروتئولیتیک با منشأ طبیعی می‌باشند که از میوه خربزه درختی تهیه می‌شوند (۱۴،۱۳،۱). از آن جایی که پاپائین و کیموپاپائین استفاده وسیعی در صنایع و پزشکی دارند، مطالعه و بررسی روش‌های استخراج، جداسازی وشناسایی آن‌ها می‌تواند در کشور گامی ارزشمند باشد. استفاده از پاپائین در صنایع گوشت و فرآورده‌های غذایی، همچنین وجود فرآورده‌های موضعی از پاپائین از جمله فرآورده جهت درمان سوختگی اطفال، استفاده از کیموپاپائین به عنوان تنها دارو جهت درمان فتق دیسک مهره‌ای کمری، اهمیت این دو ماده حاصل از شیرابه میوه نارس درخت Carica Papaya را به وضوح نشان می‌دهد(۱۰،۹،۴).

جهت استخراج آنزیم‌های پروتئولیتیک از جمله پاپائین از روش‌های مختلف استفاده شده است(۱۴،۱) از جمله این روش‌ها استفاده از تکنیک استخراج با یک حلال و رسوب به‌وسیله یک حلال(پدیده salting out) می‌باشد. همچنین جهت جداسازی و شناسایی این ترکیبات از روش‌های مختلف کروماتوگرافی همانند کروماتوگرافی تمایلی، کروماتوگرافی تعویض آنیون، ژل فیلتراسیون استفاده شده است(۱۵).

مهم‌ترین روش جهت جداسازی پاپائین و کیموپاپائین، استفاده از یک حلال جهت استخراج و رسوب به‌وسیله یک حلال می‌باشد. بدین منظور از آب به‌عنوان حلال و الکل به‌عنوان رسوب دهنده همچنین از محلول‌های اسید آمینه جهت استخراج و رسوب به‌وسیله انواع املاح (سولفات آمونیوم، سدیم کلراید) استفاده می‌شود(۴،۱). در این تحقیق از محلول اسید آمینه سیتئین هیدروکلراید (۰/۰۴ مولار) جهت استخراج و سپس رسوب پروتئین‌ها به‌وسیله محلول هیدروکسید سدیم و نهایتاً رسوب پاپائین به‌وسیله سولفات آمونیوم استفاده گردید. جهت خالص‌سازی، مجدداً پاپائین استخراج شده در محلول سیستئین هیدروکلراید حل شده و در این مرحله جهت به دست آوردن کریستال‌های پاپائین از سدیم کلراید استفاده شده است. با شناسایی پاپائین به روش‌های الکتروفورز استات، ژل الکتروفورز و تهیه طیف IR و مقایسه با پاپائین استاندارد مشخص شد که پاپائین استخراجی دقیقاً مشابه پاپائین استاندارد است. فعالیت پاپائین استخراجی در مقایسه با پاپائین استاندارد ۹۳درصد بوده است. مرینالینی[1](۲۰۰۲) فعالیت‌آنزیم‌های پروتئولیتیک استخراجی را بین ۱۰۰-۹۰ درصد فعالیت آنزیم استاندارد مورد قبول می‌داند لذا فعالیت پاپائین

1. Mrinalini

www.SID.ir
Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 15:21 +0430 on Wednesday September 20th 2017

استخراجی در این تحقیق در حد قابل قبول می‌باشد(۱۴). در طیف IR هر دو پاپائین حضور گروه‌های OH – (۳۶۰۰-۳۱۰۰)، CH– آلیفاتیک (۲۹۰۰)، گروه‌های کربونیل (C=O) (۱۷۰۰) و به ویژه تشابه پیک‌ها در ناحیه اثر انگشت (Finger Print) (۱۴۰۰-۱۱۰۰) موید تشابه دو ترکیب می‌باشد.

فهرست منابع

1. Buttle D.J, Kembhavi A.A, Sharp S.L, Shute R.E, Rich D.H, Barrett A.J. Affinity purification of the novel cysteine proteinase papaya proteinase IV, and papain from papaya latex, ***Biochem. J.*** 1989; 261: 469-476.

۲. قهرمان احمد: ***کورموفیت‌های ایران،*** جلد۲- تهران، مرکز نشر دانشگاه تهران، ۶۵۹ -۶۵۶ (۱۳۷۷).

3. Bhattacharya J, Khuspe S.S. In vitro and in vivo germination of papaya (Carica papaya L.) seeds, ***Scientia Horticulturae,*** 2001; 91: 39-49.
4. Samuelsson G. ***Drugs of natural origin,*** 4th ed., Apotekarsocieteten, Swedish Pharmaceutical Press, 1999, 360-366.
5. USP 25: ***The United States Pharmacopoeia,*** Convention, Inc., 2002, P. 1306-1307.
6. Edwin F, Jagannadham M.V. Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state, ***Biochemica et Biophysica Acta,*** 2000; 1479: 68-82.
7. Adamczyk M, Gebler J.C, Wu J. Papain digestion of different mouse IgG subclasses as studied by electrospray mass spectrometry, ***Journal of Immunological Methods,*** 2000; 237: 95-104.
8. Dermarderosian A, Beutler J.A. ***The review of natural produces,*** published by Facts & Comparisons, 2 nd. ed., 2002, 286-7.
9. Stareley I.F, Mohammed P, Schneider G, Bickler S.W. The treatment of paediatric burns using topical papaya, ***Burns,*** 1999; 25: 636-639.
10. Lee W.C,Chen T.C.Functional characteristics of egg white solids obtained from papain treated albumen, ***Journal of Food Enginering,*** 2002; 51: 263-266.

۱۱. کیوانی،هوشنگ:استخراج، شناسایی و بررسی فعالیت آنزیم پاپائین از میوه درخت کاریکا پاپایا واقع در مناطق جنوب ایران، ***پایان‌نامه دکتری داروسازی شیراز،*** به راهنمایی دکتر محمد آزادبخت و دکتر سید محمد حسین طبائی، زمستان ۱۳۷۸.

12. Kimmw J, Smith E. Crystalin papain, preparation specificity and activation, ***J. Chem.*** 1954; 207: 515.
13. Cherian T. Effect of papaya latex extract on gravid and non-gravid rat uterine preparations in vitro, ***Journal of Ethnopharmacology,*** 2000; 70: 205-212.
14. Mrinalini Menon M, Vithayathil P.J, Raju S.M, Ramadoss C.S. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of Synadenium grantii Hook, ***Plant Science,*** 2002; 163: 131-139.
15. Hostettmann K, Marston A, Hostettmann M. ***Preparative chromatography techniques. Application in natural product isolation,*** Springer-Verlag, Berlin, 1998, 206-214.

Archive of SID

www.SID.ir