اکتینیدین میوه کیوی: خالص‌سازی و بررسی مقدار آن در واریته‌های داخلی

علی مصطفایی[۱] و مریم چلبی[۲]

چکیده

پروتئازها جایگاه مهمی در صنایع غذایی و دارویی دارند. اکتینیدین یک سیستئین پروتئاز است که در میوه کیوی به وفور یافت می‌شود. در این مطالعه محتوای پروتئین و میزان نسبی آنزیم اکتینیدین در چهار واریته کیوی رایج در کشور بررسی شد و آنزیم اکتینیدین با روشی مناسب برای استفاده‌های بعدی تخلیص گردید. عصاره میوه کیوی از چهار واریته هیوارد، مونتی، برونو و آبوت تهیه شد. تخلیص اکتینیدین از عصاره با دو مرحله رسوب‌دهی توسط سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض یون در ستون دی اتیل آمینو اتیل سفارز انجام گرفت. برای تعیین وزن مولکولی و سنجش فعالیت آنزیمی، به ترتیب از الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE) و آزمون هضم کازیین استفاده شد. غلظت پروتئین تام عصاره با سه روش برادفورد، لوری و UV و میزان نسبی اکتینیدین در هر واریته با تراکم‌سنجی باندهای پروتئین در ژل تعیین گردید. راندمان عمل و درجه خلوص اکتینیدین به دست آمده در این مطالعه، به ترتیب ۶۵ و ۹۵ درصد بود. نتیجه آزمون SDS-PAGE احیایی نشان داد که وزن مولکولی آنزیم به دست آمده حدود ۲۹ کیلودالتون است. اندازه‌گیری محتوای پروتئین با سه روش برادفورد، لوری و UV که نتایج آنها تفاوت زیادی با یکدیگر داشت، نشان داد که غلظت پروتئین و اکتینیدین در کیوی کمتر از گزارش‌های مربوطه است و روش برادفورد روش دقیق‌تری برای محاسبه پروتئین در کیوی نسبت به دو روش دیگر است.

واژه‌های کلیدی: کیوی، اکتینیدین، خالص‌سازی، پروتئین

مقدمه

میوه کیوی حاوی مقدار زیادی از یک نوع آنزیم پروتئاز است که ابتدا توسط آرکوس مشخص گردید (۲). تا کنون بخش قابل توجهی از خصوصیات ساختمانی و عملکردی این آنزیم که به نام اکتینیدین (EC:3.4.22.14) خوانده می‌شود، توسط محققین مختلف مشخص شده است (۶، ۹ و ۱۲).

اکتینیدین یک سیستئین پروتئاز است که از نظر خصوصیات کلی مشابه سایر سیستئین پروتئازهای گیاهی همچون پاپایین می‌باشد (۵، ۶، ۹ و ۱۰). پیش‌ساز اکتینیدین، پلی‌پپتیدی با ۳۰۲ اسید آمینه است که پس از تبدیل به شکل فعال آنزیمی، ۲۲۰ اسید آمینه آن باقی می‌ماند (۳). برای این آنزیم حداقل ۶ ایزوآنزیم که وزن مولکولی مشابه و نقطه ایزوالکتریک

۱. دانشیار ایمنولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.3.18.2]

نزدیکی دارند، گزارش نموده‌اند (۱۷). مقدار اکتینیدین و میزان فعالیت پروتئولیتیکی آن در گونه‌ها و واریته‌های کیوی که با روش‌های رنگ‌سنجی و الکتروفورز تعیین شده، با یکدیگر متفاوت است (۱۸). اگرچه نقش بیولوژیک اکتینیدین به رغم وفور آن در میوه کیوی، به طور دقیق شناخته نشده است، ولی این آنزیم می‌تواند کاربردهای متنوعی در صنعت و پزشکی داشته باشد. برای مثال از آن می‌توان به عنوان یک پروتئاز مناسب در تردکردن گوشت یا سایر مواد پروتئینی یا به صورت کپسول در هضم مواد پروتئینی در بیماران دارای مشکلات گوارشی استفاده نمود (۴). در این مطالعه مقدار اکتینیدین و محتوای پروتئین در چهار واریته کیوی رایج در کشور بررسی گردید و به هدف دست‌یابی به آنزیم خالص برای استفاده‌های بعدی، این آنزیم به روشی ساده و مناسب تخلیص گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

در این مطالعه از میوه واریته‌های کیوی موجود در ایران شامل چهار واریته هیوارد، مونتی، برونو و آبوت، نمونه‌گیری به عمل آمد و پس از تأئید نمونه‌ها، مقدار کافی از هر نمونه به محل آزمایش در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی منتقل گردید.

عصاره‌گیری

ابتدا پوست میوه‌ها کنده شد. سپس بخش گوشتی میوه از دانه‌ها جدا گردید. بخش گوشتی (یک کیلوگرم) با مخلوط‌کن کاملا" یک‌نواخت گردید. عصاره به دست آمده از چند لایه صافی پارچه‌ای عبور داده شد. به عصاره صاف شده ویتامین C در غلظت نهایی یک میلی‌مولار اضافه‌گردید و مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. عصاره به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در g× ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری و رسوب دور ریخته شد.

رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم

به نمونه‌های مختلف عصاره کیوی سولفات آمونیوم در غلظت نهایی ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۵ یا ۹۰ درصد به آرامی و در حال هم‌زدن اضافه شد. نمونه یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۳۰ دقیقه در g×۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب به دست آمده در بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH ۵/۵ یا سایر بافرهای مورد نظر (بسته به هدف آزمایش) حل و سپس یک شب در مقابل بافر مربوطه دیالیز شد (کیسه دیالیز با اندازه سوراخ ۱۲ کیلودالتون). محلول دیالیز شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در g×۲۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. مایع رویی جدا و برای مرحله بعد نگه‌داری شد (۱۴).

کروماتوگرافی تعویض یون

این آزمایش بر اساس روش مک‌دوال (۱۴) با بعضی تغییرات انجام گرفت. مقدار کافی از رزین دی‌اتیل آمینواتیل سفارز (فارماسیا) در بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH ۵/۵ شسته شد و در یک ستون شیشه‌ای به قطر ۵ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر ریخته شد. بعد از به تعادل رسیدن ستون با بافر سیترات، نمونه پروتئینی دیالیز شده در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر وارد آن گردید. پس از ورود نمونه به ستون، بافر سیترات با جریان ۱۰۰ میلی‌لیتر در ساعت برقرار گردید. نمونه‌ها در حجم‌های ۲۵ میلی‌لیتری توسط دستگاه جمع‌کننده لوله جمع‌آوری و جذب آنها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید. پس از رسیدن جذب خروجی ستون به کمتر از ۰/۰۵، شیب خطی ۰/۵-۰ مولار کلرید سدیم در بافر سیترات به ستون وارد گردید.

الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE)

جهت بررسی میزان خلوص، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های جدا شده از عصاره میوه کیوی طی مراحل تخلیص، از روش الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد. این

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.3.18.2]

آزمون بر اساس روش لاملی (۱۱) در ژل جداکننده ۱۲ یا ۱۵ درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد انجام شد. در این آزمون ۴۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰ میکرولیتر بافر نمونه (۵X) مخلوط و به مدت ۱۰- ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در g × ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه در هر چاهک دستگاه قرار داده شد و در ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت تفکیک پروتئین‌ها صورت گرفت. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با رنگ کوماسی آبی R-۳۵۰ (فارماسیا) رنگ‌آمیزی شد (۱). در صورت لزوم، باندهای پروتئین در ژل اسکن (اسکنر هلنا) گردید. برای تعیین وزن مولکولی اکتینیدین از پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین (فارماسیا) استفاده شد. این پروتئین‌ها شامل فسفوریلاز- بی، آلبومین گاوی، آلبومین مرغی، کربنیک انهیداز، مهارکننده تریپسین و آلفا لاکتالبومین با اوزان به ترتیب ۹۷، ۶۶، ۴۵، ۳۰، ۲۰/۱ و ۱۴/۴ کیلودالتون بودند.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

برای تعیین مقدار پروتئین از سه روش برادفورد (۸)، لوری (۱۳) و UV (۱۶) استفاده شد. در روش برادفورد با معرف برادفورد (شامل ۰/۱ گرم کوماسی G-۲۵۰، ۵۰ میلی‌لیتر اتانل ۹۵ درصد، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدفسفوریک ۸۵ درصد در حجم نهایی یک لیتر)، غلظت پروتئین در واریته‌های مختلف کیوی بر اساس غلظت‌های مشخص آلبومین سرم گاوی (سیگما) اندازه‌گیری شد. در این روش با استفاده از جذب غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی در دامنه ۱-۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر منحنی استاندارد رسم گردید و بر اساس منحنی استاندارد، غلظت پروتئین در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. در روش لوری که اساس آن احیای یون مس دو ظرفیتی توسط واحدهای تیروزین و تریپتوفان است، نیز از آلبومین سرم گاوی (سیگما) در دامنه غلظت ۰/۵- ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای رسم منحنی استاندارد و تعیین غلظت پروتئین در نمونه‌ها استفاده شد. در روش UV جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر، اندازه‌گیری و طبق فرمول زیر غلظت پروتئین محاسبه شد.

[۱] غلظت پروتئین (mg/ml) = (جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر) - (۱/۴۴× جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر) ×۰/۷۶)

سنجش پروتئین در هر واریته بر روی ۵ نمونه مختلف از آن واریته و هر نمونه حداقل ۲ بار قبل و بعد از دیالیز در مقابل بافر انجام گرفت. پس از محاسبه میانگین و انحراف معیار در هر نمونه، تفاوت غلظت پروتئین قبل و بعد از دیالیز با آزمون آماری Paired t-test بررسی گردید.

اندازه‌گیری فعالیت پروتئازی اکتینیدین

برای بررسی فعالیت پروتئازی اکتینیدین از آزمون هضم کازئین شیر استفاده شد (۱۷). برای این کار، آنزیم در pH ۴ به نسبت وزنی یک درصد (وزن آنزیم به سوبسترا) به محلول کازئین اضافه شد. محلول ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. سپس محتوای لوله‌های آزمون و شاهد، الکتروفورز و درصد هضم کازئین با تراکم سنجی باندها تعیین گردید.

نتایج

غلظت پروتئین تام عصاره کیوی واریته‌های هیوارد، برونو، مونتی و آبوت با سه روش لوری، برادفورد و UV در جدول ۱ آمده است. همان گونه که این اطلاعات نشان می‌دهد، نتایج غلظت پروتئین در عصاره دیالیز نشده هر واریته در روش لوری و UV تفاوت بسیار زیادی (تا چهار برابر) با روش برادفورد دارد. بعد از دیالیز هر عصاره در مقابل بافر و اندازه‌گیری مجدد پروتئین با سه روش فوق غلظت پروتئین هر واریته کاهش کمی در روش برادفورد و کاهش شدیدی در روش لوری و UV نشان داد، به نحوی که نتیجه اندازه‌گیری پروتئین هر عصاره با این سه روش به هم دیگر و به نتایج روش برادفورد نزدیک گردید.

آنالیز محتوای پروتئینی عصاره کیوی با SDS-PAGE نشان داد که الگوی الکتروفورزی چهار واریته مورد مطالعه تشابه زیادی

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.3.18.2]

جدول ۱. میانگین غلظت پروتئین در واریته‌های مختلف کیوی به سه روش متفاوت قبل و بعد از دیالیز عصاره‌ها

روش / واریته	Bradford ($mg/_{ml}$)		UV($mg/_{ml}$)		Lowry ($mg/_{ml}$)	
	قبل از دیالیز	بعد از دیالیز	قبل از دیالیز	بعد از دیالیز	قبل از دیالیز	بعد از دیالیز
Hayward	۲/۷ ± ۰/۲	۲/۱ ± ۰/۴	۱۰/۵ ±۰/۷	۲/۷ ± ۱/۴	۱۱/۷ ±۰/۶	۲ ±۰/۶
Bruno	۲/۷ ± ۰/۴	۲ ± ۰/۲	۱۰/۲ ±۰/۸	۲/۲ ± ۰/۵	۱۱/۶ ±۱/۲	۲ ± ۰/۳
Monty	۲/۸ ±۰/۵	۲/۲ ± ۰/۲	۱۰/۲ ±۰/۸	۲/۴ ± ۰/۵	۱۱/۸±۱/۲	۲/۳ ± ۰/۵
Abbott	۳/۲ ± ۰/۸	۱/۷ ± ۰/۲	۱۱/۲ ±۰/۸	۲ ±۰/۴	۱۱/۱ ±۱/۸	۱/۶ ± ۰/۴

Mean ± SE

با هم دارد. تراکم‌سنجی این الگو که به طور عمده شامل پروتئین‌های در دامنه وزنی ۳۰-۱۰ کیلودالتون بود، در شکل ۱ آمده است. این نتایج نشان داد که پرمقدارترین پروتئین میوه کیوی، مربوط به پروتئین موقعیت حدود ۳۰ کیلودالتونی است که همان آنزیم اکتینیدین می‌باشد. مقدار نسبی این پروتئین به پروتئین تام عصاره در واریته‌های آبوت، مونتی، هیوارد و برونو به ترتیب ۴۴، ۴۲، ۳۹ و ۳۸ درصد بود.

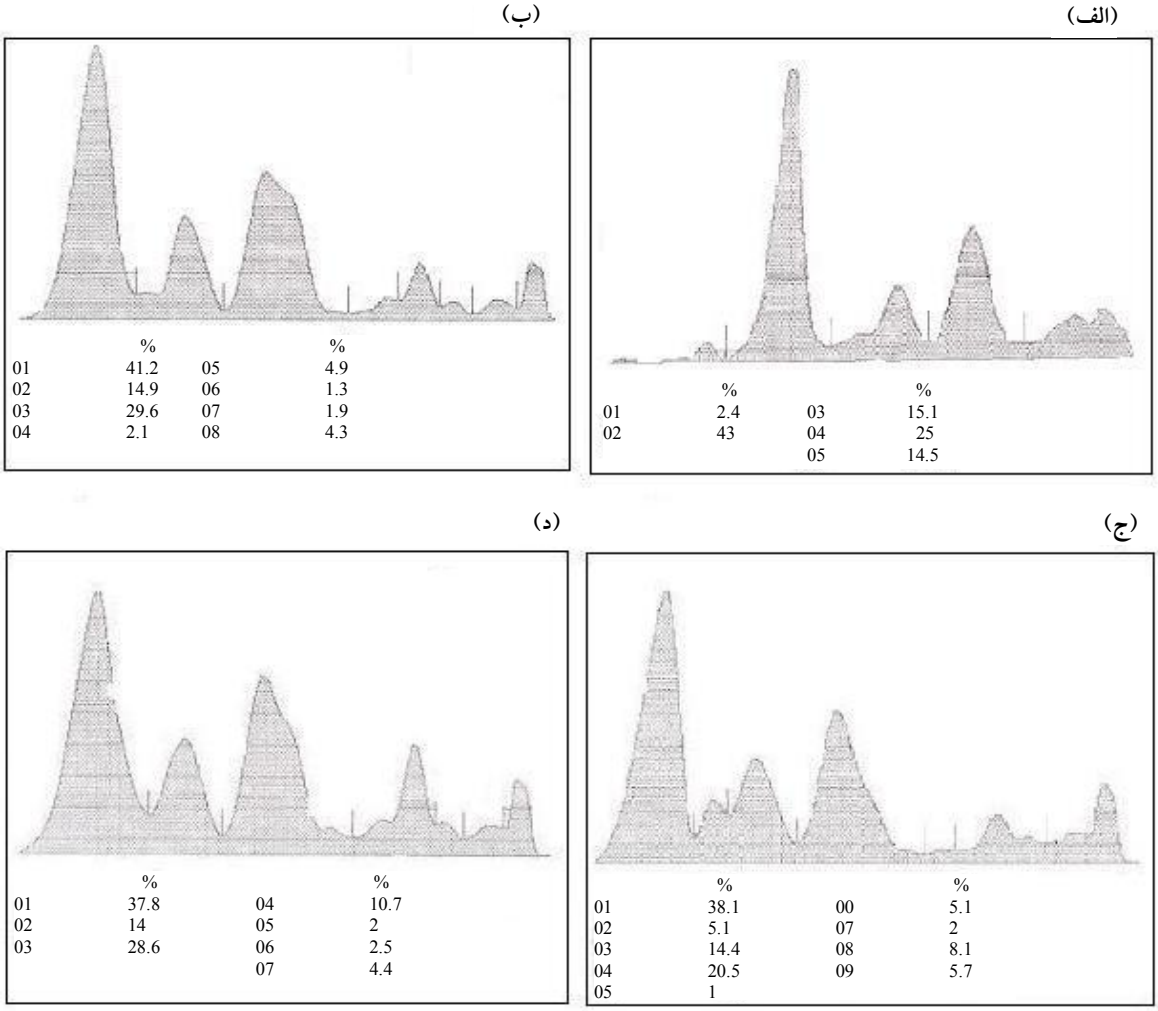
به منظور خالص‌نمودن اکتینیدین، ابتدا عصاره میوه کیوی با سولفات آمونیوم در غلظت‌های ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۵ و ۹۰ درصد رسوب داده شده، محتوای هر بخش رسوب داده شده، با روش SDS-PAGE و آزمون هضم کازئین با عصاره اولیه مقایسه گردید. نتایج نشان داد که در غلظت معادل یا بیشتر از ۶۰ درصد سولفات آمونیوم تمام اکتینیدین و در غلظت ۵۰ درصد سولفات آمونیوم بیش از ۹۰ درصد آنزیم رسوب می‌نماید. بدین لحاظ رسوب‌دهی در سولفات آمونیوم با غلظت ۶۰ درصد به عنوان مرحله اول در جداسازی آنزیم از عصاره انتخاب گردید. بعد از کروماتوگرافی تعویض یون در ستون دی‌اتیل آمینواتیل سفارز، دو بخش (قله) جدا شد. بخش اول همراه با بافر شوینده و بخش دوم بعد از شیب کلرید سدیم در بافر از ستون خارج گردید (شکل ۲).

الکتروفورز نمونه‌های مربوط به بخش‌های مختلف دو قله حاصل از کروماتوگرافی تعویض یون در شکل ۳ آمده است.

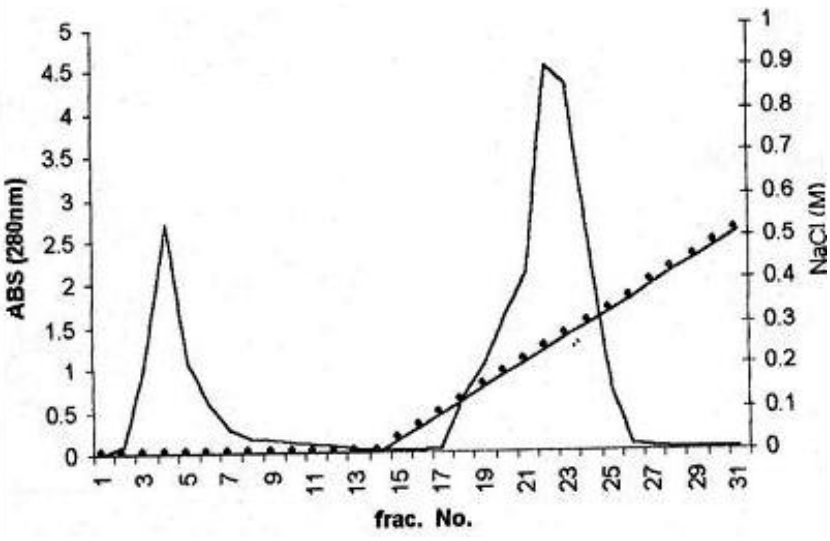
در این شکل ستون‌های ۱ و ۴ مربوط به الگوی عصاره کیوی، ستون‌های ۲ و ۵ مربوط به قله اول و ستون‌های ۳ و ۶ مربوط به قله دوم کروماتوگرافی است. محتوای قله اول تقریباً شامل تمام پروتئین‌های عصاره غیر از باند پرمقدار موقعیت ۲۹ کیلودالتونی است (ستون‌های ۲ و ۵). باند ناحیه ۲۵ کیلودالتونی بیشترین پروتئین این بخش را تشکیل می‌دهد. در این بخش باند ضعیفی نیز در ناحیه حدود ۳۰ کیلودالتونی دیده می‌شود. در ستون‌های ۳ و ۶ که مربوط به محتویات قله دوم است، عمدتاً یک باند پروتئینی قوی در ناحیه حدود۳۰ کیلودالتونی با خلوص بالا دیده می‌شود. در این ستون‌ها یک باند بسیار ضعیف در محدوده ۲۵ کیلودالتونی نیز مشاهده می‌گردد که مقدار آن محسوس و قابل توجه نیست. جهت تشخیص باند مربوط به آنزیم در دو قله جدا شده از ستون تعویض یون، از آزمون هضم کازیین استفاده شد. نتایج نشان داد، فراکسیون دوم مسئول فعالیت پروتئولیتیکی میوه کیوی است. با توجه به خاصیت پروتئولیتیکی این بخش در مقایسه با عصاره کیوی، آشکار گردید که باند ناحیه حدود ۳۰ کیلودالتونی مربوط به آنزیم اکتینیدین می‌باشد. خلوص این آنزیم در محصول به

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.3.18.2]



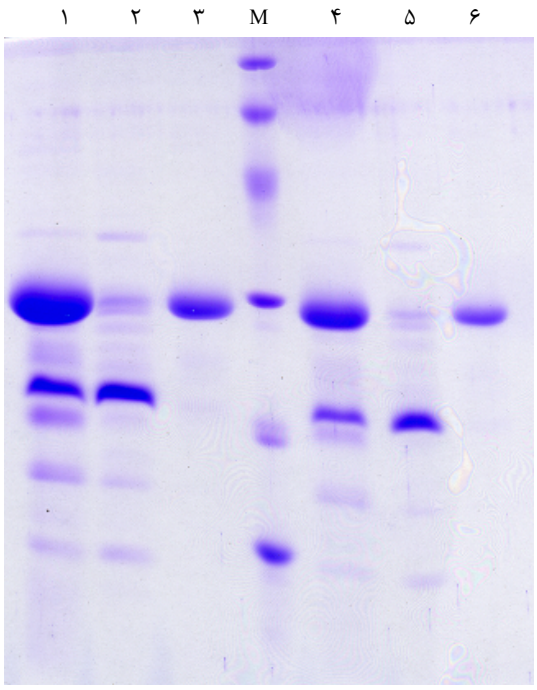
شکل ۱. تراکم‌سنجی الگوی SDS-PAGE عصاره واریته آبوت (الف)، مونتی (ب)، هیوارد (ج) وبرونو (د)



شکل ۲. کروماتوگرام تعویض یون عصاره میوه کیوی در ستون دی‌اتیل آمینو اتیل سفارز

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.3.18.2]



شکل ۳. SDS-PAGE عصاره کیوی (ستون‌های ۱و۴)، بخش اول (ستون‌های ۲و۵) و بخش دوم (ستون‌های ۳ و ۶) حاصل از کروماتوگرافی تعویض یون. ستونM شامل مارکرهای وزنی به‌ترتیب ۹۷، ۶۶، ۴۵، ۳۰، ۲۰/۱ و ۱۴/۴ کیلودالتون. در ستون‌های ۱، ۲ و ۳ غلظت پروتئین دو برابر ستون‌های ۴، ۵ و ۶ است.

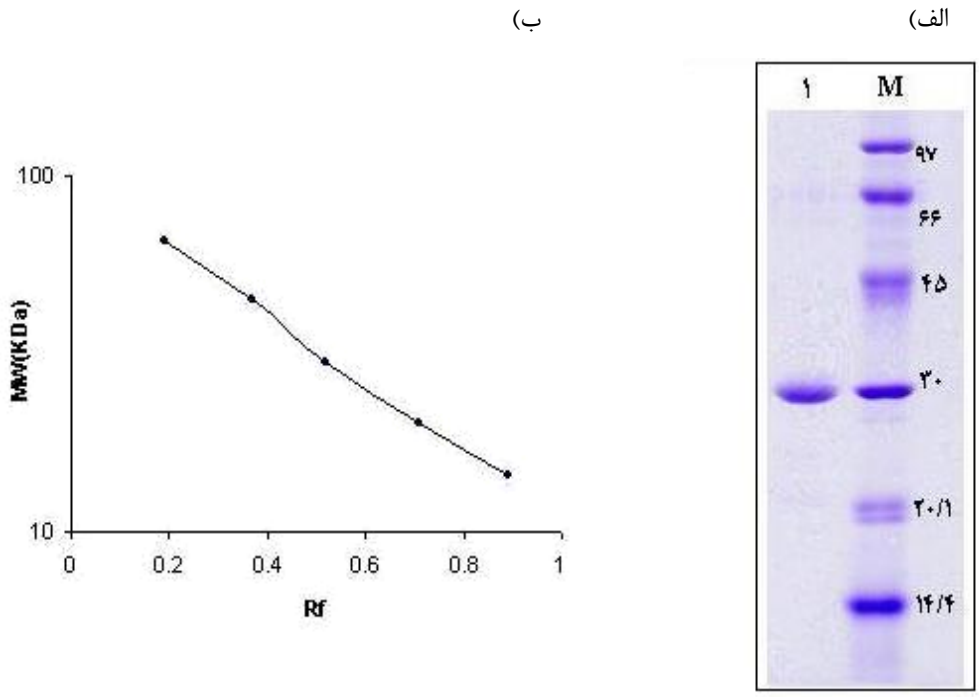
دست آمده از روی اسکن باندهای پروتئینی ژل بیش از ۹۵ درصد برآورد گردید. در ضمن راندمان روش خالص‌سازی بیش از ۶۵ درصد بود. در حالتی که آنزیم خالص شده اکتینیدین با روش SDS-PAGE در شرایط احیایی در مقایسه با مارکرهای وزن مولکولی پایین (فارماسیا) الکتروفورز گردید (شکل ۴- الف)، حرکت نسبی (R_f) آن نسبت به این پروتئین‌ها معادل ۰/۵۲ بود. براساس منحنی استاندارد به دست‌آمده (شکل ۴- ب)، وزن مولکولی آنزیم تحت شرایط احیایی معادل ۲۹ کیلودالتون تخمین زده شد.

بحث

محتوای پروتئینی میوه کیوی که مقدار نسبی آن ۱-۰/۸ درصد گزارش شده (۱۹) شامل انواع معدودی پروتئین در دامنه وزنی ۳۰-۱۰ کیلودالتون است (ستون‌های ۱ و ۴، شکل ۳). پرمقدارترین پروتئین این میوه، آنزیم اکتینیدین است که در بعضی واریته‌ها بیش از نیمی از محتوای پروتئینی میوه را تشکیل می‌دهد (۷). این آنزیم در چهار واریته مورد مطالعه ۴۵-۳۸ درصد محتوای پروتئینی عصاره میوه را تشکیل می‌دهد. به طور کلی غلظت پروتئین در کیوی و میزان نسبی اکتینیدین به عواملی همچون نوع واریته، سن میوه، شرایط اقلیمی و روش اندازه‌گیری پروتئین بستگی دارد (۷ و ۱۹). نکته قابل توجهی که در اندازه‌گیری پروتئین در کیوی و میزان نسبی اکتینیدین وجود دارد و یکی از اهداف این مطالعه بوده، این است که میوه کیوی برخلاف اغلب میوه‌ها غلظت بالایی از پروتئین دارد. محاسبه پروتئین به روش لوری و UV در این مطالعه نیز نشان داد که غلظت پروتئین در عصاره واریته‌ها نزدیک و یا بیش از یک درصد است (جدول ۱). بر این اساس و با توجه به درصد نسبی اکتینیدین که حدود نیمی از محتوای پروتئینی عصاره میوه را تشکیل می‌دهد، انتظار این بود که چندین میلی‌گرم از این آنزیم از هر میلی‌لیتر عصاره استخراج

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.3.18.2]



شکل ۴. (الف) SDS-PAGE اکتینیدین کیوی و (ب) تعیین وزن آن با منحنی استاندارد بر اساس مارکرهای وزنی

گردد. برخلاف تصور فوق، نتایج نشان داد که علی‌رغم راندمان بالا در استخراج آنزیم و اتلاف درصد کمی از آن در مرحله جداسازی، مقدار اکتینیدین به دست آمده کمتر از حد انتظار است. برای روشن شدن موضوع غلظت پروتئین عصاره‌ها به روش برادفورد نیز اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده از این روش تفاوت قابل توجهی با روش لوری و UV داشت (جدول ۱). با دیالیز عصاره‌ها در مقابل بافر و اندازه‌گیری مجدد پروتئین با سه روش فوق، روشن گردید که غلظت پروتئین کاهش شدیدی (تا ۴ برابر) در روش لوری و UV و کاهش ضعیفی در روش برادفورد دارد، به طوری که تفاوت غلظت پروتئین عصاره قبل و بعد از دیالیز در دو روش لوری و UV معنی‌دار ($P<۰/۰۰۵$) است ولی در روش برادفورد تفاوت معنی‌داری در این خصوص دیده نمی‌شود (جدول ۱). اگرچه دیالیز در کیسه‌های دیالیز معمولی (با اندازه سوراخ حدود ۱۲ کیلودالتون) باعث خروج پروتئین‌های کم‌وزن (کمتر از ۱۲ کیلودالتون) از محیط عمل می‌گردد، با این حال با توجه درصد اندک پروتئین‌های کم‌وزن در عصاره کیوی (شکل ۳)، محتوای پروتئین و اکتینیدین میوه کیوی کمتر از مقداری است که در گزارش‌های مربوطه با روش لوری یا UV ارائه شده‌است (۷ و ۱۲). بنابراین به نظر می‌رسد برخلاف نتایج بویس و همکارانش (۷) که مدعی هستند، روش برادفورد غلظت پروتئین در کیوی را کمتر از میزان طبیعی نشان می‌دهد، نتایج این پژوهش حاکی از آن است که این روش، روش دقیق‌تری نسبت به روش لوری یا UV برای تعیین غلظت پروتئین‌های کیوی است و کمتر تحت تأثیر عوامل مداخله‌گر همچون مشتقات حلقوی، کربوهیدارت‌ها و مواد تیول‌دار موجود در عصاره قرار می‌گیرد (۸). لذا غلظت پروتئین و آنزیم اکتینیدین در عصاره کیوی برخلاف گزارش‌های مربوطه، به ترتیب کمتر از ۰/۵ و ۰/۲۵ درصد می‌باشد.

هدف عمده دیگر از مطالعه حاضر، دست‌یابی به شکل خالص اکتینیدین برای استفاده در مطالعات بعدی، از جمله بررسی اثر پروتئولیتیک آن بر پروتئین‌های مختلف بود. برای تخلیص آنزیم که روش آن شکل تغییریافته‌ای از روش مک‌داول (۱۴) بود. سرعت، سادگی و خلوص بالای محصول

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.3.18.2]

در روش فوق از عواملی است که خالص‌سازی اکتینیدین را در هر مقیاسی عملی می‌سازد. نتایج SDS-PAGE در شرایط احیایی نشان داد که اکتینیدین خالص وزنی معادل ۲۹ کیلودالتون دارد. این نتیجه که مشابه نتایج مطالعه بویس و همکاران (۷)، پاستورلو و همکاران (۱۵) و متفاوت از نتایج به دست آمده هاردمن و بولاند (۵) سوگی‌یاما و همکارانش (۱۷) و مک‌داول (۱۴) است، وزن آنزیم را ۲۳/۵ یا ۲۶ کیلودالتون گزارش نموده‌اند. به نظر می‌رسد، این نتایج مختلف به طور عمده مربوط به استفاده از روش‌های متفاوت اندازه‌گیری وزن و یا مارکرهای وزنی مختلف است. برای مثال هاردمن و بولاند (۵) برای تعیین وزن مولکولی از روش تعادلی با سرعت بالا، مک‌داول (۱۴) از روش ژل فیلتراسیون در سفادکس یا سوگی‌یاما و همکاران (۱۷) از روش SDS-PAGE ولی با مجموعه مارکرهای وزنی متفاوتی نسبت به مطالعه حاضر استفاده نمودند.

منابع مورد استفاده

۱. مصطفایی، ع. ۱۳۷۸. *راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل*. چاپ دوم، انتشارات یادآوران، تهران.

2. Arcus. A. C. 1959. Proteolytic enzyme of *Actinida chinensis*. Biochim. Biophys. Acta 33: 242-244.
3. Baker. E. N. 1980. Structure of actinidin, after refinement at 1.7 °A resolution. J. Mol. Biol. 141: 441-448.
4. Boland. M. and D. Burns. 1980. Production of actinidin; a proteolytic enzyme from kiwifruit. Internal report 1. Auckland N. Z.: DSIR. Mt. Albert Research Center.
5. Boland, M. J. and M. J. Hardman. 1972. Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis*. FEBS Lett. 27 (2): 282-284.
6. Boland, M. J. and M. J. Hardman. 1973. The actinidin-catalyzed hydrolysis of N-α-benzyloxycarbonyl-L-lysine ρ-nitrophenyl ester. Europ. J. Biochem. 36: 575-582.
7. Boyes, S., P. Strubi and H. Marsh. 1997. Actinidin levels in fruit of *Actinidia* species and some *Actindia arguta* rootstock- scion combinations. Lebensm. – Wiss. U. – Technol. 30: 379-389.
8. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
9. Brocklehurst, K., B. S. Baines and J. P. Malthouse. 1981. Differences in the interactions of catalytic groups of the active centers of actinidin and papain. Biochem. J. 197: 739-746.
10. Czaplewski C., Z. Grazonka, M. Jaskolski, F. Kasprzykowski, M. Kozak, E. Politowska and J. Ciarkowski. 1999. Binding modes of a new epoxysuccinyl-peptide inhibitor of cystein proteases. Where and how do cysteine proteases express their selectivity? Biochem. Biophys. Acta 1431(2): 290-305
11. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature, 227: 680-685.
12. Lewis, D. A. and B. S. Luh. 1988. Development and distribution of actinidin in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) and its partial characterization. J. Food Biochem. 12: 109-116.
13. Lowry, O. H., H. G. Rosebrough, A. L. Farr and R. G. Randall. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-268.
14. McDowall, M. A. 1970. Anionic proteinase from *Actinida chinensis,* Preparation and properties of the crystalline enzyme. Europ. J. Biochem. 14: 214-221.
15. Pastorello, E. A., A. Conti, V. Pravettoni, L. Farioli, F. Rivolta, R. Ansaloni and et al. 1998. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. J. Allergy Clin. Immunol. 101(4 pt 1): 531-7.
16. Roe, S. Protein Purification Techniques. Second edition. 2001. pp.28-32. Oxford University Press. Weimer, Texas.
17. Sugiyama, S., K. Ohtsuki, K. Sato and M. Kawabata. 1996. Purification and characterization of six kiwifruit proteases isolated with two ion-exchange resins Toyopearl-SuperQ and Baker bond WP-PEI. Biosci. Biotech. Biochem. 60(12): 1994-2000.
18. Vazques-Lara, l., SR. Tello-solis, L. Gomez-ruiz, M. Garcia-Garbibay and S. G. Rodriguez. 2003. Degradation of α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin by actinidin. Food Biotechnol. 17(2): 117-128.
19. Wang, Z. Y., E. A. MacRae, M. A. Wright, K. M. Bolitho, G. S. Ross and R. G. Atkinson. 2000. Polygalacturonase gene expression in kiwifruit: relationship to fruit softening and ethylene production. Plant Mol. Biol. 42(2): 317-28.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.3.18.2]