

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแหล่งของเอนไซม์ซีเอสเตอิน โปรติเนส ในฝักและผลไม้บางชนิด ทำการศึกษาในผลไม้จำนวน 42 ตัวอย่าง และฝักจำนวน 73 ตัวอย่าง พบว่าผลไม้ให้ผลบวก จำนวน 17 ตัวอย่าง และฝักให้ผลบวก จำนวน 39 ตัวอย่าง เมื่อทำการตรวจสอบชนิดของเอนไซม์โปรติเนสด้วยสารยับยั้ง พบว่าเอนไซม์โปรติเนสที่พบในตัวอย่างสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ เซรีน โปรติเนส และซีเอสเตอิน โปรติเนส ในงานวิจัยนี้ได้สนใจที่จะนำเอนไซม์ไฟเซนจากมะเดื่อปล้อง (*Ficus hispida* L.) มาศึกษาแยกให้บริสุทธิ์ และลักษณะจำเพาะบางส่วนเนื่องจากมีรายงานการศึกษาที่ยังไม่แพร่หลายมาก โดยนำไฟเซนจาก *Ficus hispida* มาแยกให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 และแยกให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนเดียวด้วยเทคนิค covalent chromatography ผ่านคอลัมน์ Thiopropyl Sepharose 6B เอนไซม์ที่แยกได้จากมะเดื่อปล้องถูกยับยั้งด้วย 2,2' dipyridyl disulphide (2PDS) และ iodoacetamide แสดงว่าอยู่ในกลุ่มซีเอสเตอิน โปรติเนส เมื่อนำมาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าซีเอสเตอิน โปรติเนส จากมะเดื่อปล้องให้แถบโปรตีน 4 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 23,000 ถึง 45,000 ดาลตัน เอนไซม์ที่แยกได้เป็นไกลโคโปรตีนเนื่องจากให้ผลบวกกับชุดทดสอบ GelCode® glycoprotein staining ทั้ง 4 แถบ แสดงว่าเอนไซม์จากมะเดื่อปล้องเป็นไกลโคโปรตีนและอยู่ในรูป multiple form เมื่อนำโปรตีนขนาด 23,000 ดาลตัน ไปวิเคราะห์กรดอะมิโนโดย Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) พบกรดอะมิโน จำนวน 55 ตัว ที่มีความคล้ายคลึงกับ Chain A จาก *Carica papaya* chymopapain และได้ทำนายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ chymopapain โดยใช้โปรแกรม Discovery Studio® Visualizer Version 2.01, Accelrys Software และนำกรดอะมิโนทั้ง 55 ตัวมาเปรียบเทียบพบว่าบริเวณ catalytic sites มีความเหมือนกับ chymopapain แสดงว่ามีความใกล้เคียงกันอย่างยิ่ง เมื่อทำการศึกษากายย่อย ซับสเตรตสังเคราะห์ของเอนไซม์ไฟเซนจาก *Ficus hispida* พบว่าเอนไซม์ไฟเซนสามารถย่อย ซับสเตรตสังเคราะห์คือ Gyl-Arg-p-nitroanilide dihydroxychloride, N-Benzoyl-L-Arginine-p-nitroanilide hydrochloride, Ala-Ala-Phe-p-nitroanilide, N-succinyl-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilide และ N-succinyl-L-Phenylalanine-p-nitroanilide ได้ดีตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง subsite P₁ เอนไซม์ไฟเซนจากมะเดื่อปล้องมีความจำเพาะสำหรับกรดอะมิโน arginine

The aim of this study is to screen source of cysteine proteinase from some vegetables and fruits. The fruit sample showed positive result on AZCL-casein plate 17 from 42 samples and vegetable showed 39 from 73 samples. The enzyme from fruit and vegetable can be classified into two types proteinase; serine and cysteine proteinases by using specific inhibitors. In this study we focus in ficain from *Ficus hispida* L. because it has been a very few studies. Ficain (EC3.4.22.3), cysteine proteinase from latex of *Ficus hispida* was purified by 80% saturated ammonium sulphate precipitation and single-step Thiopropyl Sepharose 6B covalent chromatography. The enzyme activity was completely inhibited by 2,2' dipyridyl disulphide (2PDS) and iodoacetamide, indicating that the purified enzyme is a member of cysteine proteinase. The molecular weight of purified enzyme was determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The cysteine proteinase from *Ficus hispida* had four major bands with molecular weight range of 23,000 to 45,000 dalton. The purified multiple form enzymes were glycoprotein because each band showed positive with GelCode® glycoprotein staining kit. Major band from SDS-PAGE at 23,000 dalton was determined for amino acid residue by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS). The major band of purified enzyme had 55 amino acids matched to Chain A from *Carica papaya* chymopapain. The three-dimensional structure of chymopapain was generated by Discovery Studio® Visualizer Version 2.01, Accelrys Software. A comparison of the short amino acid sequences around the catalytic sites of the chymopapain indicates a high degree of similarity. In investigating the ficain from *Ficus hispida* L. can rapidly catalyze the hydrolysis of Gyl-Arg-p-nitroanilide dihydroxychloride, N-Benzoyl-L-Arginine-p-nitroanilide hydrochloride, Ala-Ala-Phe-p-nitroanilide, N-succinyl-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilide, and N-succinyl-L-Phenylalanine-p-nitroanilide. This result indicated that P₁ subsite of ficain specific for amino acid arginine.