ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):53-60

# Effect of Metal Ions on Activity, Stability, and Structure of Purified Aspartic Protease from Paneerbad

ARTICLE INFO

*Article Type*
Original Research

*Authors*
Salehi M.[1] *PhD*,
Aghamaali M.R.*[1] *PhD*,
Hassan Sajedi R.[2] *PhD*,
Asghari S.M.[1] *PhD*,
Jorjani I.[3] *PhD*

**How to cite this article**
Salehi M, Aghamaali M R, Hassan Sajedi R, Asghari S M, Jorjani I. Effect of Metal Ions on Activity, Stability, and Structure of Purified Aspartic Protease from Paneerbad. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):53-60.

ABSTRACT

The fruit of paneerbad has a lot of acidic proteases and its extract has been used in cheese manufacturing. However, there are few studies about purification and characterization of this enzyme. Following conditions must be satisfied for the enzyme to be used in industry: 1- stability of enzymes against metal ions and 2- Ability to sustain proper function and stability in the absence of metal ion. Accordingly, in this investigation, the effect of various ions at different concentrations on activity, stability and somewhat on structural properties of the purified protease were studied. Based on the results, it was shown that the enzyme was relatively stable against NaCl and CaCl2, but by increment of these salts, stability and activity of enzyme was decreased. Also, the enzyme was stable against low concentration of various metal ions and only Hg2+ significantly reduces enzyme stability and activity. By studying the role of Ca2+ on thermostability of enzyme, it was found that ca2+ didn't have any role in thermal stability of enzyme at 67˚C. Likewise, by observing the effect of metal ions on intrinsic fluorescence of enzyme it was cleared that all tested ions increased intensity of emission and caused to shift maximum wave length toward lower wave length. In all, results of these study showed that the purified enzyme from paneer bad is very stable against various metal ions especially heavy metals and therefor it is favorable for industrial application.

**Keywords** Aspartic Acid Protease; Paneerbad; Metal Ions

Archive of SID

CITATION LINKS

[1] Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering [2] Recent advances in milk clotting enzymes [3] Clotting characteristics of milk by Withania coagulans: Proteomic and biochemical study [4] Characterization of milk coagulating properties from the extract of Withania coagulans [5] Influence of Withania coagulans protease as a vegetable rennet on proteolysis of Iranian UF white cheese [6] Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts [7] Metal ion and pH stable protease production using agro-industrial waste [8] Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast Cryptococcus sp. S-2 [9] Why the properties of proteins in salt solutions follow a Hofmeister series [10] Hofmeister effects: An explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis [11] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [12] Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [13] Milk-clotting enzyme from Mucor pusillus var. Lindt [14] Purification of antibodies using ammonium sulfate fractionation or gel filtration [15] Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins [16] Milk-clotting enzyme from microorganisms: V. purification and crystallization of Mucor rennin from Mucor pusillus var [17] Use of principal component analysis to study the relationship between physical/chemical properties and the milk-clotting to proteolysis activity ratio of some aspartyl proteinases [18] A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (Sardinella aurita): Purification and characterisation [19] Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of Cynara cardunculus [20] Salt in cheese: Physical, chemical and biological aspects [21] Homology modelling of two subtilisin-like proteases from the hyperthermophilic archaea Pyrococcus furiosus and Thermococcus stetteri [22] Purification and characterization of an aspartic protease from the Rhizopus oryzae protease extract

[1]Biology Department, Basic Sciences Faculty, University of Guilan, Rasht, Iran
[2]Biochemistry Department, Biological Sciences Favulty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Biology Department, Basic Sciences & Engineering Faculty, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

**Correspondence*
*Address*: University of Guilan, Khalij Fars Highway (5Kilometer of Qazvin Road), Rasht, Guilan, Iran. Postal Code: 4199613776
*Phone*: +98 (13) 13220066
*Fax*: +98 (13) 13243630
aghamaali@guilan.ac.ir

*Article History*
Received: February 05, 2017
Accepted: April 10, 2018
ePublished: March 16, 2019

*Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.*

www.SID.ir

# اثر یون‌های فلزی بر فعالیت، پایداری و ساختار آسپارتیک‌پروتئاز خالص‌شده از میوه گیاه پنیرباد

**محمود صالحی PhD**
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
**محمودرضا آقامعالی* PhD**
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
**رضا حسن‌ساجدی PhD**
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
**سیدمحسن اصغری PhD**
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
**عیسی جرجانی PhD**
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران

## چکیده
میوه گیاه پنیرباد (*Withania coagulans*) سرشار از پروتئازهای اسیدی است و عصاره آبی آن از دیرباز برای تولید پنیر استفاده شده است. با این وجود، مطالعات اندکی در خصوص خالص‌سازی و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی این آنزیم صورت گرفته است. از جمله شرایط مهم برای استفاده صنعتی از آنزیم می‌توان به دو مورد شامل پایداری آنزیم نسبت به یون‌های فلزی و عدم نیاز به یون برای پایداری و عملکرد اشاره کرد. بر این اساس، در این پژوهش، تاثیر غلظت‌های مختلف انواع یون‌های فلزی بر فعالیت، پایداری و تا حدی بر خصوصیات ساختاری پروتئاز خالص‌شده مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشاهده شد که آنزیم نسبت به سدیم‌کلرید و کلسیم‌کلرید نسبتاً پایدار است، ولی با افزایش بیشتر غلظت این نمک‌ها پایداری و فعالیت آنزیم به تدریج کاهش می‌یابد. همچنین، مشاهده شد که آنزیم نسبت به انواع یون‌های فلزی در غلظت‌های پایین پایدار است و تنها $Hg^{2+}$ فعالیت و پایداری آنزیم را به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد. با مطالعه نقش $Ca^{2+}$ در پایداری دمایی آنزیم مشخص شد که این یون هیچ نقشی در پایداری بالای آنزیم در دمای ۶۷°C ندارد. علاوه بر این، با بررسی تاثیر یون‌های فلزی بر طیف فلوئورسانس ذاتی آنزیم مشاهده شد که تمامی یون‌های آزمایش‌شده شدت نشر را افزایش و موجب انتقال طول موج ماکزیمم به طول موج‌های کوتاه‌تر شدند. در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه نشان از پایداری بالای این آنزیم در مقابل انواع یون‌های فلزی به‌ویژه یون‌های فلزات سنگین داشته و از این لحاظ برای استفاده در صنعت مطلوب است.

**کلیدواژه‌ها:** آسپارتیک‌اسیدپروتئاز، پنیرباد، یون‌های فلزی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۱/۲۱
*نویسنده مسئول: aghamaali@guilan.ac.ir

## مقدمه
استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک در تولید پنیر یکی از اصلی‌ترین و قدیمی‌ترین موارد کاربرد آنزیم در فرآوری مواد غذایی است. علاوه بر این در سال‌های اخیر پروتئازها کاربردهای دیگری نیز در صنعت لبنیات داشته‌اند که شامل تسریع در رسیدن پنیر و تهیه محصولات رژیمی هستند[1]. پروتئازهای گیاهی پتانسیل بالایی برای استفاده در فرآوری مواد غذایی دارند، بنابراین تلاش‌های زیادی برای استفاده از این پروتئازها در تولید پنیر انجام شده است، اما اغلب این آنزیم‌ها به‌دلیل فعالیت پروتئولیزی بالا، عملکرد غیراختصاصی و همچنین ایجاد مزه تلخ در پنیر تولیدی برای استفاده در صنعت پنیرسازی نامناسب هستند[2]. البته چند مورد استثنا در این زمینه وجود دارد که یکی از آنها گیاه پنیرباد با نام علمی *ویتانا کوآگولانس* (*Withania coagulans*) است. عصاره آبی میوه این گیاه که سرشار از پروتئازهای اسیدی است، به‌طور سنتی در مناطق جنوب شرق ایران در تهیه پنیرهای محلی مورد استفاده قرار می‌گیرد[3]. *ناز* و همکاران نشان دادند که پروتئازهای این گیاه پتانسیل خوبی برای تولید پنیرهای کاتیج و چدار دارند[4]. همچنین، نتایج به‌دست‌آمده از بررسی ویژگی‌های بافتی و حسی پنیر سفید فراپالایش‌شده تولیده‌شده به‌وسیله عصاره آنزیمی این گیاه، حاکی از مناسب‌بودن پروتئازهای آن در تولید پنیرهای پروسس و موزارلا است[5].

محققان، به‌منظور بهبود کارآیی آنزیم‌ها در تولید مواد غذایی، بیشتر بر افزایش پایداری دمایی، افزایش محدوده pH کاتالیتیکی، کاهش نیاز به یون‌های فلزی و غلبه بر مهار توسط عوامل مهارکننده معمول آنزیم تمرکز کرده‌اند[6]. بنابراین، دو ویژگی پایداری آنزیم نسبت به یون‌های فلزی و عدم نیاز به آنها برای عملکرد، از عوامل مهم در استفاده صنعتی آنزیم‌های پروتئولیتیک هستند. در مطالعات مرتبط با اثر یون‌های فلزی بر فعالیت انعقادی شیر (MCA) و فعالیت پروتئولیتیک (PA) پروتئازها، مشاهده شده است که یون‌های فلزی اثرات متفاوتی بر فعالیت آنزیم‌های به‌دست‌آمده از منابع مختلف داشته‌اند، به‌عنوان مثال، مطالعه انجام‌شده روی آسپارتیک‌پروتئاز خالص‌شده از یک باسیلوس نشان داده است که فعالیت پروتئولیتیک در حضور همه یون‌های فلزی در غلظت‌های ۵ و ۱۰میلی‌مولار افزایش یافته است[7]. در مطالعه انجام‌شده روی آسپارتیک‌پروتئاز خالص‌شده از مخمر کریپتوکوکوس (*Cryptococcus sp. S-2*) نشان داده شده است که یون‌های $Cu^{2+}$ و $Fe^{3+}$ به میزان کمی باعث مهار آنزیم شده‌اند، در حالی که یون‌های $Ca^{2+}$ و $Na^{+}$ فعالیت آنزیمی را افزایش دادند و سایر یون‌ها تاثیری بر فعالیت آنزیمی نداشتند[8]. به‌صورت اختصاصی، یک یون ممکن است کارآیی آنزیم را از طریق عمل‌نمودن به‌عنوان فعال‌کننده یا مهارکننده تحت تاثیر قرار دهد، اما به‌صورت عمومی‌تر به‌منظور بررسی اثرات یون‌ها باید توانایی‌شان در تغییر ساختار توده آب، تاثیر روی برهم‌کنش پروتئین-آب و تاثیر روی برهم‌کنش مستقیم با مولکول‌های آنزیم را در نظر گرفت[9]. همچنین، یون‌ها می‌توانند با گروه‌های عاملی موجود در سطح پروتئین‌ها به‌ویژه گروه‌های عاملی موجود در جایگاه فعال، برهم‌کنش‌های قوی داشته باشند و بنابراین باعث ایجاد تغییرات شیمیایی و فیزیکی در جایگاه فعال آنزیم شده و منجر به تعدیل فعالیت کاتالیزی آنزیم شوند[10]. از آنجایی که حضور مقادیری از یون‌های فلزی به‌ویژه فلزات سنگین در صنایع امری اجتناب‌ناپذیر است، برای استفاده صنعتی، باید آنزیم‌ها نسبت به یون‌های فلزی پایدار باشند و همچنین بهتر است برای عملکرد خود نیازی به یون‌های فلزی نداشته باشند. در مطالعه حاضر تلاش شده است اثرات انواع یون‌های فلزی در غلظت‌های مختلف بر فعالیت، پایداری و ساختار آسپارتیک‌پروتئاز خالص‌شده از میوه گیاه پنیرباد مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها
**تهیه نمونه گیاهی:** در مطالعه تجربی حاضر نمونه‌های گیاهی، از نواحی اطراف شهرستان سراوان (خاستگاه طبیعی این گیاه) جمع‌آوری و در دمای اتاق خشک شدند.
**مواد شیمیایی:** آلبومین سرم گاوی (BSA)، پودر شیر بدون چربی (سیگما-آلدریچ؛ ایالات متحده)؛ کازئین (مرک؛ آلمان)، رزین کروماتوگرافی تعویض کاتیونی UNOsphere™ S (بایورد؛ ایالات متحده) و تمام مواد شیمیایی دیگر در درجه آنالیتیکال تهیه شدند.
**خالص‌سازی آنزیم**
**استخراج آنزیم:** میوه‌های خشک‌شده گیاه پنیرباد، در نیتروژن مایع



Archive of SID
www.SID.ir

خرد شدند و به نسبت یک به ۱۰ در بافر استیک‌اسید/استات‌سدیم ۱۰۰میلی‌مولار، میزان pH برابر با ۵/۰، سدیم‌کلرید ۰/۸۵% (وزنی/حجمی) در دمای ۴°C به‌مدت یک‌ساعت هموژنیزه شدند. عصاره به‌دست‌آمده در ۹۰۰۰rpm به‌مدت ۲۰دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد و پس از آن pH در دمای ۴°C به‌مدت ۶ساعت در سه نوبت ۲ساعته دیالیز و سپس غلظت پروتئین، PA و MCA عصاره اندازه‌گیری شد. نمونه‌های به‌دست‌آمده به‌منظور انجام مراحل بعدی در دمای ۴°C نگهداری شدند.

**کروماتوگرافی تعویض کاتیونی:** محلول رویی به‌دست‌آمده از سانتریفیوژ نمونه دیالیزشده، به‌منظور انجام کروماتوگرافی به ستون تعویض کاتیونی S، که به‌وسیله بافر استیک‌اسید/استات‌سدیم ۳۰میلی‌مولار با میزان pH برابر ۴/۵ متعادل شده بود، منتقل شد. سپس، به‌منظور خارج‌کردن پروتئین‌های متصل‌نشده به رزین، ستون با بافر متعادل‌سازی شسته و بعد پروتئین‌های متصل‌شده به رزین در چند مرحله به روش ایزوکراکتیک با استفاده از غلظت‌های صفر تا ۰/۲، ۰/۲ تا ۰/۳، ۰/۳ تا ۰/۴ و ۰/۴ تا ۰/۶ مولار سدیم‌کلرید از ستون جدا شدند. نمونه‌های خارج‌شده از ستون در میکروتیوپ‌های ۲میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند و نمونه‌های دارای فعالیت بالا با یکدیگر به‌صورت یک جزء ذخیره شدند. سپس با استفاده از فالکون دارای کات‌آف ۱۰کیلودالتون (Milipore ؛ فرانسه) تغلیظ و برای انجام آنالیزهای بعدی در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

**تعیین غلظت پروتئین و الکتروفورز:** غلظت پروتئین طبق روش برادفورد[11] به کمک آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE) نمونه آنزیمی، طبق روش لاملی[12] تحت شرایط احیایی به‌وسیله ژل تغلیظ‌کننده ۴% و ژل تفکیک‌کننده ۱۲/۵% انجام شد. نمونه‌ها، در بافر دناتوره‌کننده دارای سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS) و بتامرکاپتواتانول تیمار و قبل از الکتروفورز به‌مدت ۵دقیقه جوشانده شدند. پس از اتمام الکتروفورز و رنگ‌آمیزی، وزن مولکولی پروتئین با استفاده از نرم‌افزار TotalLab 1D 21 CFR به دست آمد.

**اندازه‌گیری فعالیت انعقادی شیر (MCA):** فعالیت انعقادی شیر طبق روش تغییریافته آریما[13] اندازه‌گیری شد. محلول سوبسترا (شیر خشک بدون چربی ۱۰ % در آب مقطر) تهیه و pH آن روی ۶/۵ تنظیم شد. یک‌میلی‌لیتر سوبسترا به‌مدت ۵دقیقه در دمای ۵۵°C انکوبه شد. سپس ۰/۱میلی‌لیتر آنزیم خالص به آن اضافه و تشکیل لخته از طریق چرخش دستی لوله آزمایش در فواصل زمانی کوتاه بررسی شد. نقطه پایانی آزمایش، زمانی است که ذرات به‌صورت مجزا قابل مشاهده باشند. فعالیت انعقادی شیر، برابر است با مقدار آنزیم مورد نیاز برای انعقاد ۱۰میلی‌لیتر سوبسترا در مدت‌زمان ۴۰دقیقه و طبق فرمول زیر به دست می‌آید:

فاکتور رقت × (زمان انعقاد(ثانیه)/2400) = فعالیت انعقادی شیر(واحد بر میلی‌لیتر)

**اندازه‌گیری فعالیت پروتئازی (PA):** واکنش آنزیمی با مخلوط‌کردن ۱۰میکرولیتر آنزیم با ۲۴۰میکرولیتر کازئین ۱% (وزنی/حجمی) در بافر مخلوط (۰/۲مولار دی‌سدیم‌فسفات، ۰/۱مولار سیتریک‌اسید)، میزان pH برابر با ۵/۵، در دمای ۵۵°C آغاز و پس از گذشت ۲۰دقیقه با افزودن ۲۵۰میکرولیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰% (وزنی/حجمی) متوقف شد. پس از ۱۰دقیقه انکوبه‌کردن در دمای ۴°C، تیوپ‌های آزمایش در ۹۰۰۰rpm به‌مدت ۱۰دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ و سپس، جذب مایع رویی در ۲۸۰نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر مدل ultrospect 3000 (Pharmacia Biothch؛ انگلستان) اندازه‌گیری شد. به‌طور قراردادی یک واحد فعالیت آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که باعث افزایش یک واحد جذب در مدت یک‌دقیقه در طول موج ۲۸۰نانومتر می‌شود.

**اندازه‌گیری فعالیت و پایداری آنزیم در مقابل غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید و کلسیم‌کلرید:** به‌منظور بررسی اثر سدیم‌کلرید و بر کلسیم‌کلرید فعالیت پروتئولیتیک، ۲۴۰میکرولیتر محلول کازئین ۱% (وزنی/حجمی)، میزان pH برابر با ۵/۵ در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید و کلسیم‌کلرید (صفر تا ۳مولار) به‌مدت ۵دقیقه در ۵۵°C انکوبه شد. سپس، فعالیت آنزیمی با افزودن ۱۰میکرولیتر آنزیم خالص (۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر) طبق روش فوق‌الذکر، در دمای ۵۵°C اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی به‌صورت درصد فعالیت باقی‌مانده در غیاب نمک‌ها گزارش شد. به‌منظور اندازه‌گیری پایداری آنزیم، مقدار معینی آنزیم در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید و کلسیم‌کلرید به‌مدت یک‌ساعت در دمای محیط قرار گرفت و سپس فعالیت آنزیمی در غیاب نمک (به‌صورتی که پیشتر ذکر شد) اندازه‌گیری شد.

**بررسی پایداری دمایی آنزیم در حضور یون کلسیم:** به‌منظور اندازه‌گیری پایداری دمایی، مقدار معینی آنزیم خالص (۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر) در حضور و عدم حضور یون کلسیم در غلظت نهایی ۲۰میلی‌مولار در دمای ۶۷°C انکوبه و سپس در فواصل زمانی مشخص (صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰دقیقه) فعالیت پروتئولیتیک طبق شرایط ذکرشده اندازه‌گیری شد.

**اثر انواع یون‌های فلزی بر فعالیت و پایداری آنزیم:** به‌منظور بررسی اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم، هیدرولیز کازئین در حضور انواع یون‌های فلزی ($Al^{2+}$، $Li^{2+}$، $Fe^{3+}$، $Mg^{2+}$، $Co^{2+}$، $Cd^{2+}$، $Fe^{2+}$، $Mg^{2+}$، $Ca^{2+}$، $K^{+}$، $Na^{+}$، $Hg^{2+}$، $Cu^{2+}$، $Mn^{2+}$، $Zn^{2+}$ و $Cr^{3+}$) به‌صورت نمک‌های کلرید و سولفات، در غلظت‌های یک، ۵ و ۱۰میلی‌مولار در میزان pH برابر با ۵/۵ و دمای ۵۵°C اندازه‌گیری شد. برای بررسی اثر یون‌های فلزی بر پایداری آنزیم، پروتئاز خالص در حضور هر یک از یون‌های فلزی ذکرشده در غلظت‌های نهایی یک، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار به‌مدت یک‌ساعت در دمای محیط انکوبه و سپس فعالیت آنزیمی در غیاب یون‌های فلزی اندازه‌گیری شد.

**بررسی اثر یون‌های فلزی بر طیف فلورسانس آنزیم:** به‌منظور بررسی اثر یون‌های فلزی بر طیف نشری آنزیم، مقدار معینی آنزیم خالص در غلظت نهایی ۳۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با انواع یون‌های فلزی (۵میلی‌مولار) به‌مدت یک‌ساعت در دمای محیط انکوبه و سپس، طیف فلورسانس آنزیم با استفاده از دستگاه اسپکترولومینسانس مدل LS55 (PerkinElmer؛ ایالات متحده) ثبت شد. در این آزمایش به‌منظور برانگیختگی، از طول موج ۲۸۰نانومتر استفاده شد که باعث تحریک همزمان تریپتوفان و تیروزین می‌شود. طول موج نشر ۳۰۰ تا ۴۰۰نانومتر، سرعت طیف‌گیری ۵۰۰ و شکاف برانگیختگی ۱۰نانومتر بود. آزمایشات در دمای محیط صورت گرفت و با سیگنال زمینه تصحیح شد.

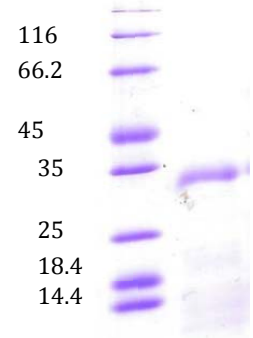
## نتایج و بحث

**خالص‌سازی:** ۱۴میلی‌گرم پروتئین به ستون کروماتوگرافی تعویض کاتیونی UNOsphere™ S متعادل‌شده با بافر استیک‌اسید/استات‌سدیم ۳۰میلی‌مولار، میزان pH برابر با ۴/۵ منتقل شد؛ سپس نمونه‌های پروتئینی متصل‌نشده به رزین توسط

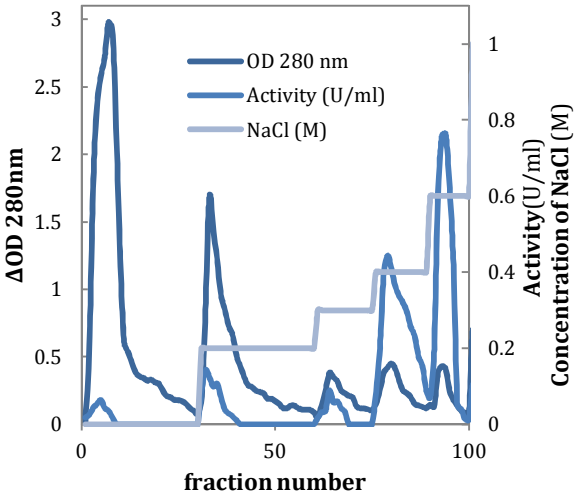


Archive of SID
www.SID.ir

همان بافر متعادل‌سازی از ستون جدا شدند. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، در این مرحله مقدار بسیار کمی آنزیم از ستون خارج شد که نشان‌دهنده اتصال قوی آنزیم به رزین و انتخاب مناسب بافر است. سپس نمونه‌های متصل‌شده به ستون در ۵ مرحله در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید به‌صورت ایزوکراکتیک از ستون شسته شدند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، فرکشن‌های جداشده در غلظت‌های ۰/۳-۰/۴ و ۰/۴-۰/۶ مولار سدیم‌کلرید دارای فعالیت آنزیمی هستند. در ادامه، پروتئین‌های هر دو فرکشن فعال ادغام و بعد از دیالیز با استفاده از فالکن کات‌آف ۱۰کیلودالتون تغلیظ شدند. نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه به‌دست‌آمده نشان‌دهنده خلوص بالای آنزیم است (شکل ۱). وزن مولکولی آنزیم با استفاده از نرم‌افزار TotalLab 1D 21 CFR، ۳۱کیلودالتون تخمین زده شد. خلاصه مراحل خالص‌سازی در جدول ۱ نشان داده شده است. استفاده از آمونیوم‌سولفات برای رسوب‌دهی پروتئین‌ها به‌دلیل سریع‌بودن و هزینه پایین و همچنین خروج آسان نمک توسط دیالیز، یکی از مراحل اصلی و رایج در فرآیند تخلیص پروتئین به شمار می‌رود[14]. با این حال، در برخی موارد رسوب پروتئینی ایجادشده به‌وسیله آمونیوم‌سولفات، مجدداً به حالت محلول بر نمی‌گردد. در مطالعه قبلی (نتایج نشان داده نشده است)، استفاده از آمونیوم‌سولفات ۵۰% فعالیت آنزیمی را به شکل برگشت‌ناپذیری از بین برد؛ بنابراین، در این مطالعه از مرحله رسوب‌دهی توسط آمونیوم‌سولفات صرف نظر شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشاهده می‌شود که آسپارتیک‌پروتئاز مورد نظر به‌آسانی و طی یک مرحله خالص‌سازی، به‌طور قابل قبولی خالص شد (۴/۵ مرتبه خالص) و نتایج به‌دست‌آمده بهتر از نتایج خالص‌سازی با استفاده از مرحله اضافی رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بازدهی خالص‌سازی تقریبا ۳۶% است که نشان‌دهنده بازیافت مناسب فعالیت آنزیمی است.




**شکل ۱)** الگوی SDS-PAGE آسپارتیک‌پرتئاز خالص‌شده از گیاه پنیرباد




**نمودار ۱)** کروماتوگرافی تعویض کاتیونی عصاره دیالیزشده میوه پنیرباد؛ ۷۵ واحد فعالیت آنزیم به ستون UNOspher S منتقل و طبق روش ذکرشده از ستون شسته شد.

**جدول ۱)** مراحل خالص‌سازی آسپارتیک‌پروتئاز از میوه گیاه پنیرباد

| مرحله خالص‌سازی | فعالیت انعقادی شیر (MCA) | فعالیت پروتئولایتیک (PA) | MCA/PA | بازیافت فعالیت (%) | پروتئین (میلی‌گرم) | بازیافت پروتئین (%) | فعالیت ویژه (واحد بر میلی‌گرم پروتئین) | خالص‌سازی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| عصاره آنزیمی | ۱۰۷۴٦±۳۸۹ | ۸۲/۱۷±٦/٤ | ۱۳۰/۷۷ | ۱۰۰ | ۲۰/٥٤ | ۱۰۰ | ٤ | ۱ |
| دیالیز | ۹۸۹۲±۳٥۰ | ۷٥/٦٥±٦/۱ | ۱۳۰/۷ | ۹۲/۰٦ | ۱۳/۸۳ | ٦۷/۳۳ | ٥/٤٦ | ۱/۳٦ |
| کروماتوگرافی تعویض کاتیونی | ۳۸۳٦±۱۳۲ | ۲۹/۳٦±۲/٤ | ۱۳۰/٦٦ | ۳٥/۷۳ | ۱/٦٤ | ۷/۹۷ | ۱۷/۹۳ | ٤/٤۸ |

در هر مرحله خالص‌سازی درصد بازیافت فعالیت و پروتئین نشان داده شده است؛ داده‌ها میانگین سه تکرار±انحراف استاندارد هستند.

یکی از شاخص‌های ارزیابی پتانسیل یک آنزیم برای استفاده در تولید پنیر نسبت MCA/PA است. یک پروتئاز با نسبت بالای MCA/PA بهتر می‌تواند لخته تشکیل دهد، کارآیی بالاتری داشته باشد و همچنین، طی فرآیند رسیدن پنیر، از تلخ‌شدن آن جلوگیری کند، در حالی که نسبت پایین MCA/PA ممکن است راندمان تشکیل لخته را کاهش داده و لخته‌های سست‌تری تولید کند و همچنین باعث ایجاد مزه تلخ در محصول شود[15]. کایموزین بالاترین نسبت MCA/PA در مقایسه با سایر منعقدکننده‌های آنزیمی را دارد. به‌طور مثال، این نسبت در مایه پنیر *Mucor*، مایه پنیر میکروبی *Pfizer* و *Papain* در مقایسه با کایموزین به‌ترتیب ۱/۶، ۲/۸ و ۲۰ برابر کوچک‌تر است[16]. پپسین یک مایه پنیر جایگزین مناسب برای تولید پنیر است، هر چند که نسبت MCA/PA آن بسته به pH بین ۲ تا ۵۰ برابر نسبت به کایموزین کمتر است. در مقابل، این نسبت در تریپسین ۱۵۰۰ برابر کمتر از کایموزین است و بنابراین در تولید پنیر استفاده نمی‌شود[17]. از آنجایی که نسبت MCA/PA آسپارتیک‌پروتئاز به‌دست‌آمده از گیاه پنیرباد حدود ۴ تا ۱۰ مرتبه ( بسته به pH و دما) کوچک‌تر از کایموزین است، پتانسیل لازم به‌عنوان مایه پنیر جایگزین در صنعت پنیرسازی را دارد.

**بررسی فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف یون‌های سدیم و کلسیم:** یون‌های سدیم و کلسیم نقش مهمی در فرآیند تولید پنیر دارند، بنابراین اثر این یون‌ها بر فعالیت کازئینولیتیک مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در نمودار ۲- الف نشان داده شده است، فعالیت پروتئولیتیک آنزیم با افزایش غلظت سدیم‌کلرید تا ۰/۲۵مولار به‌صورت تدریجی افزایش یافته است، اما با افزایش بیشتر غلظت این نمک، فعالیت به سرعت کاهش یافت، به‌طوری که در غلظت‌های ۱/۰ و ۱/۷۵مولار سدیم‌کلرید فعالیت آنزیمی به‌ترتیب به ۵۰% و ۱۰% فعالیت آغازی کاهش یافت (نمودار ۲-



Archive of SID
www.SID.ir

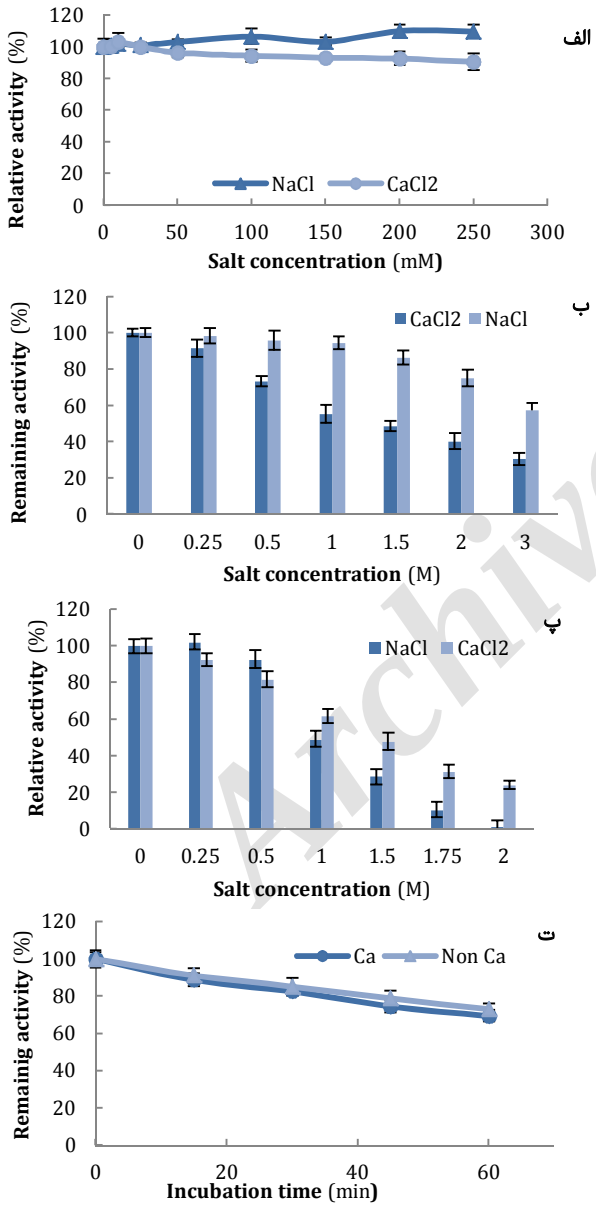
ب). براساس نتایج گزارش‌شده توسط محققان دیگر، مشاهده می‌شود که سدیم‌کلرید اثرات متفاوتی بر پروتئازهای مختلف دارد. به‌عنوان مثال، فعالیت آنزیمی پروتئاز استخراج‌شده از ماهی کاد گرینلند (Greenland cod) به‌طور قابل ملاحظه‌ای در حضور سدیم‌کلرید افزایش می‌یابد، در حالی که پروتئولیز کازئین به‌وسیله عصاره *سینارا کاردونکولوس* (*Cynara cardunculus*) در حضور سدیم‌کلرید ۵% (وزنی/حجمی) کاهش می‌یابد. کاهش فعایت آنزیم، ممکن است به‌دلیل غیرفعال‌شدن آنزیم از طریق پدیده رسوب‌دادن با نمک اتفاق افتاده باشد. دلیل این پدیده این است که در غلظت‌های بالاتر، سدیم‌کلرید احتمالاً در اتصال به آب با آنزیم رقابت می‌کند که منجر به ایجاد برهم‌کنش‌های قوی‌تر پروتئین-پروتئین شده و نهایتاً موجب رسوب پروتئین می‌شود[18, 19]. علاوه بر این، پیشنهاد شده است که سدیم‌کلرید و ترکیبات مشابهی مثل کلسیم‌کلرید، بیشتر از طریق تغییرات کنفورماسیونی کازئین بر هیدرولیز کازئین تاثیر می‌گذارد تا مولکول آنزیم[20]. با توجه به نمودار ۲- ب مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت یون‌های کلسیم، فعالیت آنزیمی به‌تدریج کاهش می‌یابد، به این صورت که با افزایش غلظت کلسیم تا ۲۵۰میلی‌مولار، فعالیت آنزیمی ۱۰% کاهش می‌یابد. به همین ترتیب، با افزایش غلظت یون کلسیم فعالیت آنزیمی به تدریج و با شیب ثابت کاهش می‌یابد؛ به‌طوری که در غلظت‌های ۱/۰ و ۲/۰مولار یون کلسیم، فعالیت آنزیمی به‌ترتیب تا حدود ۴۰% و ۸۰% کاهش نشان می‌دهد.

**بررسی پایداری آنزیم در غلظت‌های مختلف یون‌های سدیم و کلسیم:** با توجه به نمودار ۲- پ مشاهده می‌شود که آنزیم در غلظت‌های کمتر از یک‌مولار سدیم‌کلرید کاملاً پایدار است و تنها ۵% از فعالیت آنزیم کاسته شده است و با افزایش غلظت این نمک، پایداری آنزیم نیز به تدریج کاهش می‌یابد. با این حال در غلظت ۳مولار سدیم‌کلرید تقریبا ۶۰% فعالیت آنزیم حفظ می‌شود که نشان‌دهنده پایداری بسیار بالای این آنزیم، در حضور سدیم‌کلرید است. در مقابل، پایداری آنزیم در مقابل نمک کلسیم‌کلرید چندان بالا نیست و با افزایش غلظت این نمک، پایداری آنزیم کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشاهده می‌شود که در غلظت ۱/۵مولار کلسیم‌کلرید حدود ۵۰% فعالیت آنزیمی و در غلظت ۳مولار این نمک، ۷۰% فعالیت آنزیمی از میان رفته است.

همان‌طور که در بخش قبل مشاهده شد فعالیت آنزیم در حضور غلظت یک‌مولار سدیم‌کلرید ۵۰% کاهش یافت در صورتی که پایداری آنزیم در مقابل این نمک ۵% کاهش یافت، بنابراین کاهش فعالیت آنزیم در حضور سدیم‌کلرید احتمالاً به‌دلیل اثر سدیم‌کلرید بر کازئین است تا خود آنزیم. همچنین، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از پایداری و فعالیت آنزیم نسبت به نمک کلسیم‌کلرید مشاهده می‌شود که پایداری و فعالیت در حضور این نمک به یک نسبت کاهش می‌یابد، به این معنی که این نمک علاوه بر سوبسترا، خود مولکول آنزیم را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد.

**بررسی اثر کلسیم بر پایداری دمایی:** با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از اثر کلسیم بر پایداری دمایی (نمودار ۲- ت)، مشاهده می‌شود که پایداری دمایی آنزیم در دمای ۶۷°C بالا است، به‌طوری که بعد از گذشت یک‌ساعت انکوباسیون در این دما، تنها حدود ۲۵% فعالیت آنزیمی از بین رفته است، غیرفعال‌سازی آنزیم در دماهای بالا، اساساً به‌دلیل دناتوره‌شدن دمایی و تغییرات شیمیایی رخ می‌دهد[21] و همان‌طور که مشاهده می‌شود یون‌های کلسیم تاثیری در پایداری دمایی آنزیم نداشته است.

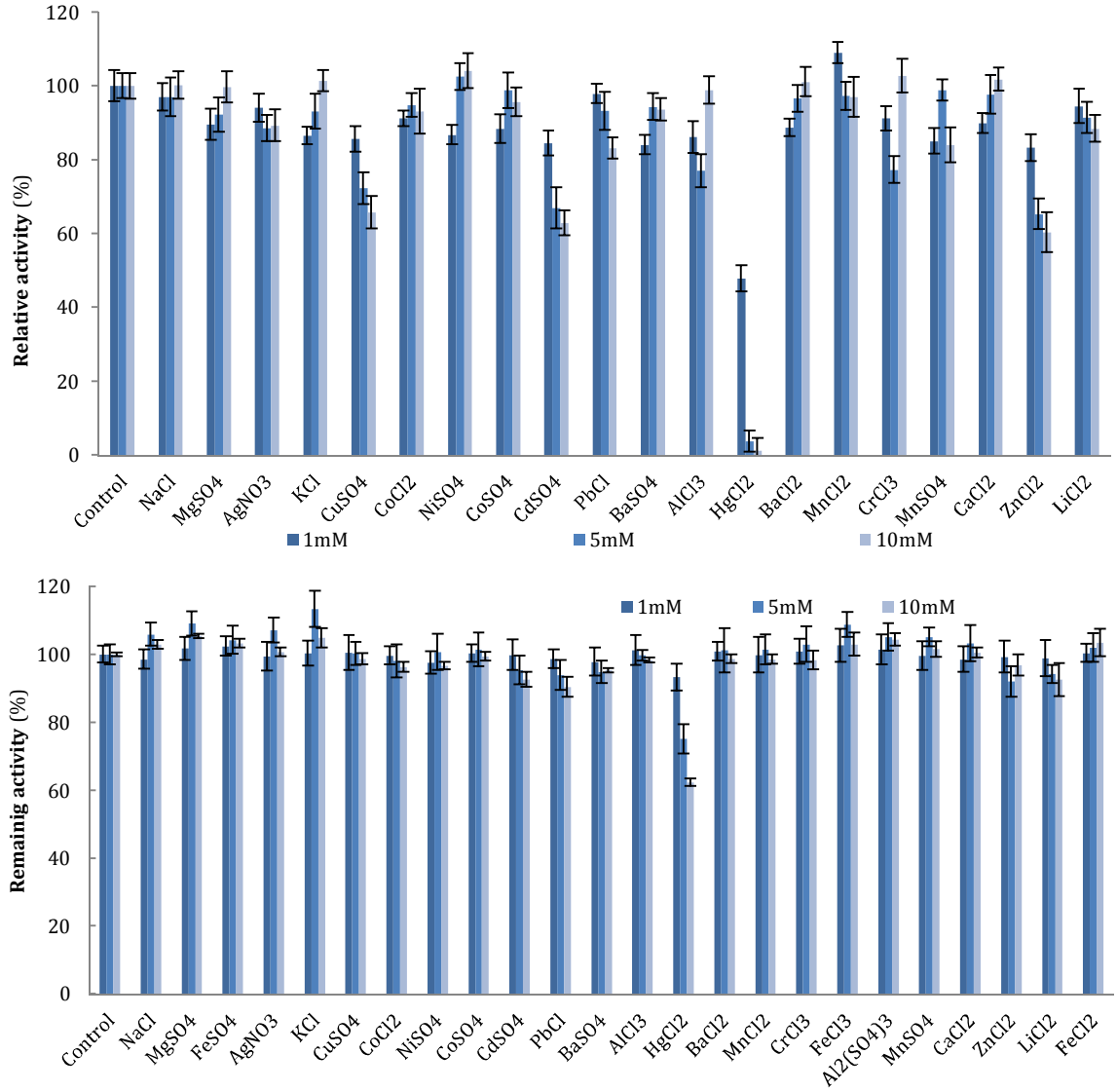
**تاثیر انواع یون‌های فلزی بر پایداری و فعالیت آنزیم:** فعالیت و پایداری آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف انواع یون‌های فلزی با سوبسترای کازئین ۱% در دمای ۵۵°C اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در نمودار ۳- الف مشاهده می‌شود که اغلب یون‌های فلزی تاثیر چندانی بر فعالیت آنزیمی ندارند، اما $Hg^{+2}$ شدیداً موجب مهار آنزیم می‌شود. همچنین، یون‌هایی از قبیل $Cd^{+2}$ و $Cu^{+2}$ نیز در غلظت‌های بالاتر فعالیت آنزیمی را در حدود ۴۰% کاهش دادند. سایر یون‌های فلزی تاثیر چندانی بر فعالیت آنزیمی ایجاد نکرده‌اند. پایداری آنزیم توسط $Hg^{+2}$ در غلظت ۱۰میلی‌مولار تقریباً ۴۰% کاهش یافت در صورتی که سایر یون‌ها هیچ تاثیری در پایداری آنزیم نداشتند (نمودار ۳- ب). از آنجایی که فعالیت و پایداری آنزیم در حضور هیچ‌کدام از یون‌های فلزی افزایش نیافت، آنزیم برای عملکرد و پایداری به یون‌های فلزی نیاز ندارد.




**نمودار ۲)** اثر نمک‌های سدیم‌کلرید و کلسیم‌کلرید بر فعالیت و پایداری آنزیم؛ الف) اثر نمک در غلظت‌های صفر تا ۰/۲۵ مولار بر فعالیت آنزیم، ب) اثر نمک در غلظت‌های صفر تا ۳مولار بر پایداری آنزیم، پ) اثر نمک در غلظت صفر تا ۲مولار بر فعالیت آنزیم ، ت) اثر کلسیم در غلظت ۲۰میلی‌مولار بر پایداری حرارتی آنزیم خالص



Archive of SID
www.SID.ir




**نمودار ۳)** اثر انواع یون های فلزی در غلظت های مختلف بر الف) فعالیت و ب) پایداری آنزیم خالص

مطالعات نشان داده‌اند که یون‌های فلزی اثرات متفاوتی بر فعالیت آسپارتیک‌پروتئازهای مختلف دارند، به‌عنوان مثال، *ریزوپوس پپسین* (Rhizopus pepsin) استخراج‌شده از *ریزوپوس شیننزیس* (*Rhizopus chinesis*) به‌طور قابل ملاحظه‌ای به‌وسیله $Fe^{3+}$ مهار می‌شود؛ در حالی که با $Fe^{2+}$، $Hg^{2+}$، $Cu^{2+}$ و $Pb^{2+}$ هیچ اثر مهاری مشاهده نشد. آسپارتیک‌پروتئاز به‌دست‌آمده از *آسپرژیلوس نیگرا* *Aspergillus niger BCRC BCRC 32720* (*32720*) توسط $Fe^{2+}$ به شدت فعال می‌شود، اما $Pb^{2}$، $Cr^{3+}$، $Fe^{3+}$ و $Ag^{+}$ آنزیم را به‌طور کامل مهار می‌کنند. یون $Cu^{2+}$ نیز آسپارتیک‌پروتئاز استخراج‌شده از *آسپرژیلوس نیگرا* *I1* را به‌شدت مهار می‌کند[22]. همچنین، اثر برخی از یون‌های فلزی در غلظت ۵میلی‌مولار بر فعالیت آسپارتیک‌پروتئاز خالص‌شده از *ساردینلا آئوریتا* (*Sardinelle aurita*) مطالعه شده است. یون‌های $Na^{+}$، $Ca^{2+}$ و $K^{+}$ اثری بر فعالیت آنزیم نداشتند در حالی که فعالیت آنزیم به‌وسیله $Mn^{2+}$، $Ba^{2+}$، $Zn^{2+}$، $Mg^{2}$، $Cu^{2+}$ و $Hg^{2+}$ به مقدار بسیار کمی کاهش یافته است[18].

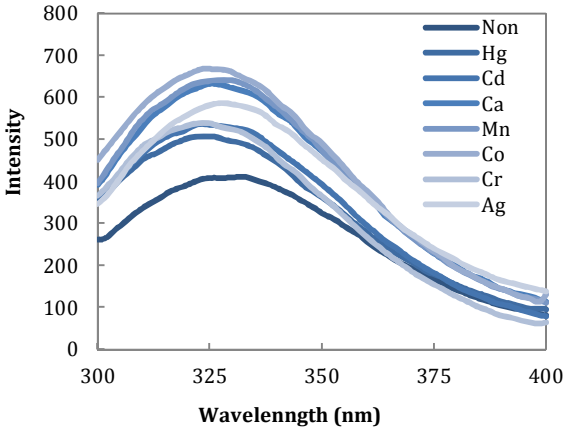
**اثر یون‌های فلزی بر طیف فلوئورسانس آنزیم:** نتایج به‌دست‌آمده از اثر یون‌های فلزی بر خصوصیات طیف نشری آسپارتیک‌پروتئاز خالص‌شده، در نمودار ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود تمام یون‌های فلزی بررسی‌شده، موجب افزایش شدت فلوئورسانس و همچنین به میزان کمی موجب انتقال طول موج ماکزیمم به طول موج‌های کوتاه‌تر شد. از میان یون‌های آزمایش‌شده، $Co^{2+}$ بیشترین تاثیر را داشت؛ به‌گونه‌ای که شدت نشر آنزیم از ۴۱۱ در غیاب یون به ۶۶۸/۷ در حضور یون افزایش یافت. یون کلسیم نیز تاثیر قابل توجهی در طیف نشری آنزیم ایجاد کرد، به‌طوری که شدت جذب در حضور این یون به مقدار ۲۲۱/۵ واحد افزایش نشان داد. افزایش شدت جذب و انتقال به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر، نشان‌دهنده غیرقطبی‌ترشدن ریزمحیط‌های اطراف کرموفورهای موجود در آنزیم است؛ به این معنی که یون‌های فلزی در غلظت ۵میلی‌مولار، موجب القای تغییرات ساختاری در آنزیم شده‌اند.

از جمله محدودیت‌های پژوهش حاضر دردسترس‌نبودن همیشگی نمونه‌های گیاهی به‌دلیل رویش این گیاهان در فصل‌های خاصی از سال است.

پیشنهاد می‌شود با توجه به مقاومت بالای آنزیم خالص‌شده در مقابل یون‌های فلزی، لازم است مقاومت آنزیم در مقابل سایر دناتوره‌کننده‌ها، حلال‌های آلی و دماهای بالا بررسی شود تا پتانسیل آنزیم برای استفاده در صنعت به‌خوبی ارزیابی شود.



www.SID.ir




**نمودار ۴)** اثر یون‌های فلزی بر طیف فلوئورسانس ذاتی آنزیم خالص؛ یون‌های فلزی در غلظت نهایی ۵میلی‌مولار بر آنزیم خالص با غلظت ۳۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر استیک‌اسید/استات‌سدیم ۵۰میلی‌مولار، میزان pH برابر با ۴/۵ در دمای محیط ارزیابی شدند.

## نتیجه‌گیری

از آنجایی که میوه گیاه پنیرباد دارای مقادیر فراوانی آسپارتیک پروتئاز است و نیز به‌صورت سنتی در تهیه پنیر استفاده می‌شود، جایگزین بالقوه‌ای برای کایموزین (که بنا به دلایلی تولید آن کاهش یافته است) محسوب می‌شود. فرآیند استخراج و خالص‌سازی به‌دلیل عدم نیاز به رسوب‌دهی توسط آمونیوم‌سولفات، کوتاه و سریع است و نیز، بازدهی و کارآیی فرآیند تخلیص با این روش قابل قبول است. با مطالعه اثر انواع یون‌های فلزی با غلظت‌های مختلف بر فعالیت و پایداری آنزیم، مشخص شد که آنزیم نسبت به تمامی یون‌های فلزی آزمایش‌شده به‌جز $Hg^{2+}$، پایدار بوده که نشان‌دهنده مقاومت بسیار بالای این آنزیم است. پروتئاز خالص‌شده از گیاه پنیرباد را بنا به دلایلی مانند استخراج آسان، پایداری بالا و فعالیت مناسب در حضور نمک‌هایی از قبیل کلسیم‌کلرید و سدیم‌کلرید؛ عدم نیاز به یون‌های فلزی برای عملکرد مطلوب و مقاومت بالا در برابر دما و نیز پایداری در مقابل فلزات سنگین، می‌توان در تولید صنعتی پنیر استفاده کرد.

**تشکر و قدردانی:** نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان و دانشگاه تربیت مدرس به‌دلیل فراهم‌نمودن امکانات آزمایشگاهی کمال تشکر را دارند.

**تاییدیه‌اخلاقی:** موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** محمود صالحی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۰%)؛ محمودرضا آقامعالی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰%)؛ رضا حسن‌ساجدی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰%)؛ سیدمحسن اصغری (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۲۰%)؛ عیسی جرجانی (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰%)

**منابع مالی:** پژوهش حاضر تحت حمایت مالی دانشگاه گیلان بوده است.

## منابع

1- Yegin S, Dekker P. Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. Dairy Sci Technol. 2013;93(6):565-94.
2- Jacob M, Jaros D, Rohm H. Recent advances in milk clotting enzymes. Int J Dairy Technol. 2011;64(1):14-33.
3- Kazemipour N, Salehi Inchebron M, Valizadeh J, Sepehrimanesh M. Clotting characteristics of milk by Withania coagulans: Proteomic and biochemical study. Int J Food Prop. 2017;20(6):1290-301.
4- Naz Sh, Masud T, Nawaz MA. Characterization of milk coagulating properties from the extract of Withania coagulans. Int J Dairy Technol. 2009;62(3):315-20.
5- Pezeshki A, Hesari J, Ahmadi Zonoz A, Ghambarzadeh B. Influence of Withania coagulans protease as a vegetable rennet on proteolysis of Iranian UF white cheese. J Agric Sci Technol. 2011;13:567-76.
6- Fernandes P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. Enzyme Res. 2010;2010:862537.
7- Saxena R, Singh R. Metal ion and pH stable protease production using agro-industrial waste. J Ecobiotechnol. 2010;2(4):1-5.
8- Rao S, Mizutani O, Hirano T, Masaki K, Iefuji H. Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast Cryptococcus sp. S-2. J Biosci Bioeng. 2011;112(5):441-6.
9- Boström M, Williams DRM, Ninham BW. Why the properties of proteins in salt solutions follow a Hofmeister series. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2004;9(1-2):48-52.
10- Yang Z. Hofmeister effects: An explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. J Biotechnol. 2009;144(1):12-22.
11- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
12- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
13- Arima K, Yu J, Iwasaki Sh. Milk-clotting enzyme from Mucor pusillus var. Lindt. Methods Enzymol. 1970;19:446-59.
14- Kent UM. Purification of antibodies using ammonium sulfate fractionation or gel filtration. In: Javois LC, editor. Immunocytochemical methods and protocols, methods in molecular biology™. 115th Volume. New York City: Humana Press; 1999. pp. 11-8.
15- Vallejo JA, Ageitos JM, Poza M, Villa TG. Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins. J Dairy Sci. 2012;95(2):609-13.
16- Arima K, Yu J, Iwasaki S, Tamura G. Milk-clotting enzyme from microorganisms: V. purification and crystallization of Mucor rennin from Mucor pusillus var. Lindt. Appl Microbiol. 1968;16(11):1727-33.
17- Yada RY, Nakai Sh. Use of principal component analysis to study the relationship between physical/chemical properties and the milk-clotting to proteolysis activity ratio of some aspartyl proteinases. J Agric Food Chem. 1986;34(4):675-9.
18- Khaled HB, Ghorbel-Bellaaj O, Hmidet N, Jellouli K, El-Hadj Ali N, Ghorbel S, et al. A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (Sardinella aurita): Purification and characterisation. Food Chem. 2011;128(4):847-53.
19- Sousa MJ, Malcata FX. Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from

Archive of SID



www.SID.ir

flowers of Cynara cardunculus. Enzyme Microb Technol. 1998;22(5):305-14.
20- Guinee TP, Fox PF. Salt in cheese: Physical, chemical and biological aspects. In: Fox PF, Mc Sweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP, editors. Cheese: Chemistry, physics and microbiology. 1st Volume. Cambridge MA: Academic Press; 2004. pp. 207-59.
Guinee T.P., Fox P.F. (1993) Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In: Fox P.F. (eds) Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Springer, Boston, MA
21- Voorhorst WG, Warner A, De Vos WM, Siezen RJ. Homology modelling of two subtilisin-like proteases from the hyperthermophilic archaea Pyrococcus furiosus and Thermococcus stetteri. Protein Eng. 1997;10(8):905-14.
22- Hsiao NW, Chen Y, Kuan YC, Lee YC, Lee SK, Chan HH, et al. Purification and characterization of an aspartic protease from the Rhizopus oryzae protease extract, Peptidase R. Electron J Biotechnol. 2014;17(2):89-94.

Archive of SID



www.SID.ir