

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

## ARTICLE INFO

### Article Type

Original Research

### Authors

Salehi M.<sup>1</sup> PhD,  
Aghamaali M.R.\*<sup>1</sup> PhD,  
Hassan Sajedi R.<sup>2</sup> PhD,  
Asghari S.M.<sup>1</sup> PhD,  
Jorjani I.<sup>3</sup> 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.

<sup>1</sup>Biology Department, Basic Sciences Faculty, University of Guilan, Rasht, Iran

<sup>2</sup>Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup>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

## 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 CaCl<sub>2</sub>, 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 Hg<sup>2+</sup> significantly reduces enzyme stability and activity. By studying the role of Ca<sup>2+</sup> on thermostability of enzyme, it was found that Ca<sup>2+</sup> 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

## 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 *Sardinella* (*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

## اثر یون‌های فلزی بر فعالیت، پایداری و ساختار آسپارتیک پروتئاز خالص شده از میوه گیاه پنیرباد

محمود صالحی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

محمود رضا آقامعالی \* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

رضا حسن ساجدی 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 گنبد کاووس، گنبد کاووس، 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، تأثیر غلظت‌های مختلف انواع یون‌های فلزی بر فعالیت، پایداری و تا حدی بر خصوصیات ساختاری پروتئاز خالص شده مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشاهده شد که آنزیم نسبت به سدیم کلرید و کلسیم کلرید 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  $67^{\circ}C$  ندارد. علاوه بر این، با بررسی تأثیر یون‌های فلزی بر طیف فلوروسانس 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<sup>[1]</sup>. 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<sup>[2]</sup>. 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

زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس

می‌گیرد<sup>[3]</sup>. ناز و همکاران نشان دادند که پروتئازهای این گیاه پتانسیل خوبی برای تولید پنیرهای کاتیج و چدار دارند<sup>[4]</sup>. همچنین، نتایج به‌دست‌آمده از بررسی ویژگی‌های بافتی و حسی پنیر سفید فرآپالایش‌شده تولیدشده به‌وسیله عصاره آنزیمی این گیاه، حاکی از مناسب بودن پروتئازهای آن در تولید پنیرهای پروس و موزارلا است<sup>[5]</sup>.

محققان، به‌منظور بهبود کارایی 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<sup>[6]</sup>. 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 خالص شده از یک باسیلوس نشان داده است که فعالیت پروتئولیتیک در حضور همه یون‌های فلزی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار افزایش یافته است<sup>[7]</sup>. در مطالعه انجام‌شده روی آسپارتیک‌پروتئاز خالص‌شده از مخمر کریپتوکوکوس (*Cryptococcus sp. S-2*) نشان داده شده است که یون‌های  $Fe^{3+}$  و  $Cu^{2+}$  به میزان کمی باعث مهار آنزیم شده‌اند، در حالی که یون‌های  $Ca^{2+}$  و  $Na^{+}$  فعالیت آنزیمی را افزایش دادند و سایر یون‌ها تأثیری بر فعالیت آنزیمی نداشتند<sup>[8]</sup>. به‌صورت اختصاصی، یک یون ممکن است کارایی آنزیم را از طریق عمل‌نمودن به‌عنوان فعال‌کننده یا مهارکننده تحت تأثیر قرار دهد، اما به‌صورت عمومی‌تر به‌منظور بررسی اثرات یون‌ها باید توانایی‌شان در تغییر ساختار توده آب، تأثیر روی برهم‌کنش پروتئین-آب و تأثیر روی برهم‌کنش مستقیم با مولکول‌های آنزیم را در نظر گرفت<sup>[9]</sup>. 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<sup>[10]</sup>. 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 خالص شده 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:** آلومین سرم گاوی (BSA)، پودر شیر بدون چربی (سیگما-آلدريج؛ 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

اتاق سانتریفیوژ و سپس، جذب مایع رویی در ۲۸۰ نانومتر 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 یک دقیقه در طول موج ۲۸۰ نانومتر می‌شود.

**اندازه‌گیری فعالیت و پایداری آنزیم در مقابل غلظت‌های مختلف سدیم کلرید و کلسیم کلرید:** به‌منظور بررسی اثر سدیم کلرید و بر کلسیم کلرید فعالیت پروتئولیتیک، ۲۴۰ میکرولیتر محلول کازئین ۱٪ (وزنی/حجمی)، میزان pH برابر با ۵/۵ در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید و کلسیم کلرید (صفر تا ۳ مولار) به‌مدت ۵ دقیقه در ۵۵°C انکوبه شد. سپس، فعالیت آنزیمی با افزودن ۱۰ میکرولیتر آنزیم خالص (۱۰۰ میکروگرم 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 سدیم کلرید و کلسیم کلرید به‌مدت یک ساعت 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 (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در حضور و عدم حضور یون کلسیم در غلظت نهایی ۲۰ میلی‌مولار در دمای ۶۷°C انکوبه و سپس در فواصل زمانی مشخص (صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه) فعالیت پروتئولیتیک طبق شرایط ذکر شده 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 ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Li}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  و  $\text{Cr}^{3+}$ ) به‌صورت نمک‌های کلرید و سولفات، در غلظت‌های یک، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار 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 ذکر شده در غلظت‌های نهایی یک، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار به‌مدت یک ساعت 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 ۳۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با انواع یون‌های فلزی (۵ میلی‌مولار) به‌مدت یک ساعت در دمای محیط انکوبه و سپس طیف فلورسانس آنزیم با استفاده از دستگاه اسپکتروفلورومینسانس مدل LS55 (PerkinElmer؛ ایالات متحده) ثبت شد. در این آزمایش به‌منظور برانگیختگی، از طول موج ۲۸۰ نانومتر استفاده شد که باعث تحریک همزمان تریپتوفان و تیروزین می‌شود. طول موج نشر ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر، سرعت طیف‌گیری ۵۰۰ و شکاف برانگیختگی ۱۰ نانومتر بود. آزمایشات در دمای محیط صورت گرفت و با سیگنال زمینه تصحیح شد.

## نتایج و بحث

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

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

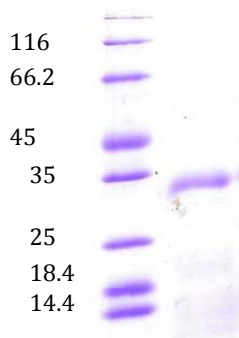
**کروماتوگرافی تعویض کاتیونی:** محلول رویی به‌دست‌آمده از سانتریفیوژ نمونه دیالیز شده، به‌منظور انجام کروماتوگرافی به ستون تعویض کاتیونی S، که به‌وسیله بافر استیک اسید/استات سدیم ۳۰ میلی‌مولار با میزان pH برابر ۴/۵ متعادل شده بود، منتقل شد. سپس، به‌منظور خارج کردن پروتئین‌های متصل‌نشده به رزین، ستون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

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

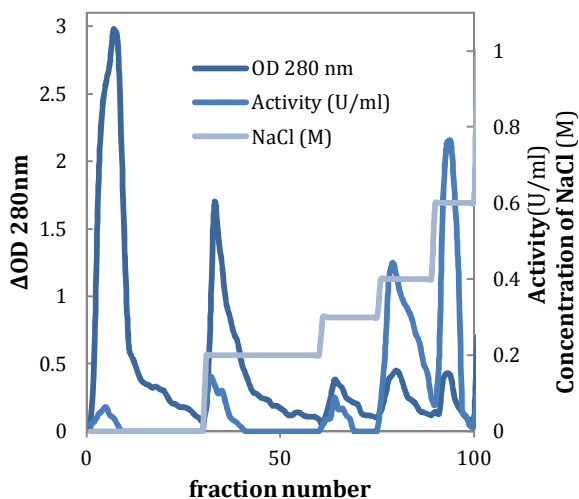
**اندازه‌گیری فعالیت انعقادی شیر (MCA):** فعالیت انعقادی شیر طبق روش تغییر یافته آریما<sup>[13]</sup> اندازه‌گیری شد. محلول سوبسترا (شیر خشک بدون چربی ۱۰٪ در آب مقطر) تهیه و pH آن روی ۶/۵ تنظیم شد. یک میلی‌لیتر سوبسترا به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۵۵°C انکوبه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آنزیم خالص به آن اضافه و 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 ۱۰ میلی‌لیتر سوبسترا در مدت زمان ۴۰ دقیقه و طبق فرمول زیر به دست می‌آید:

$$\text{فاکتور رقت} \times (\text{زمان انعقاد (ثانیه)}) / (2400) = \text{فعالیت انعقادی شیر (واحد بر میلی‌لیتر)}$$

**اندازه‌گیری فعالیت پروتئازی (PA):** واکنش آنزیمی با مخلوط کردن ۱۰ میکرولیتر آنزیم با ۲۴۰ میکرولیتر کازئین ۱٪ (وزنی/حجمی) در بافر مخلوط (۰/۲ مولار دی‌سدیم فسفات، ۰/۱ مولار سیتریک اسید)، میزان pH برابر با ۵/۵، در دمای ۵۵°C آغاز و پس از گذشت ۲۰ دقیقه با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ (وزنی/حجمی) متوقف شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوبه کردن در دمای ۴°C، تیوپ‌های آزمایش در ۹۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای



شکل ۱) الگوی SDS-PAGE آسپارتیک پروتئاز خالص شده از گیاه پنیرباد



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

همان بافر متعادل سازی از ستون جدا شدند. همان طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، در این مرحله مقدار بسیار کمی آنزیم از ستون خارج شد که نشان دهنده اتصال قوی آنزیم به رزین و انتخاب مناسب بافر است. سپس نمونه های متصل شده به ستون در ۵ مرحله در غلظت های مختلف سدیم کلرید به صورت ایزوکراتیک از ستون شسته شدند. همان طور که مشاهده می شود، فرکشن های جدا شده در غلظت های ۰/۴-۰/۶ و ۰/۳-۰/۴ مولار سدیم کلرید دارای فعالیت آنزیمی هستند. در ادامه، پروتئین های هر دو فرکشن فعال ادغام و بعد از دیالیز با استفاده از فالکن کات آف ۱۰ کیلودالتون تغلیظ شدند. نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه به دست آمده نشان دهنده خلوص بالای آنزیم است (شکل ۱). وزن مولکولی آنزیم با استفاده از نرم افزار TotalLab 1D 21 CFR، ۳۱ کیلودالتون تخمین زده شد. خلاصه مراحل خالص سازی در جدول ۱ نشان داده شده است. استفاده از آمونیوم سولفات برای رسوب دهی پروتئین ها به دلیل سریع بودن و هزینه پایین و همچنین خروج آسان نمک توسط دیالیز، یکی از مراحل اصلی و رایج در فرآیند تخلیص پروتئین به شمار می رود [14]. با این حال، در برخی موارد رسوب پروتئینی ایجاد شده به وسیله آمونیوم سولفات، مجدداً به حالت محلول بر نمی گردد. در مطالعه قبلی (نتایج نشان داده نشده است)، استفاده از آمونیوم سولفات ۵۰٪ فعالیت آنزیمی را به شکل برگشتناپذیری از بین برد؛ بنابراین، در این مطالعه از مرحله رسوب دهی توسط آمونیوم سولفات صرف نظر شد. با توجه به نتایج به دست آمده مشاهده می شود که آسپارتیک پروتئاز مورد نظر به آسانی و طی یک مرحله خالص سازی، به طور قابل قبولی خالص شد (۴/۵ مرتبه خالص) و نتایج به دست آمده بهتر از نتایج خالص سازی با استفاده از مرحله اضافی رسوب دهی با آمونیوم سولفات است. همان طور که مشاهده می شود، بازدهی خالص سازی تقریباً ۳۶٪ است که نشان دهنده باز یافت مناسب فعالیت آنزیمی است.

جدول ۱) مراحل خالص سازی آسپارتیک پروتئاز از میوه گیاه پنیرباد

| مرحله خالص سازی            | فعالیت انعقادی شیر (MCA) | فعالیت پروتئولیتیک (PA) | MCA/PA | بازیافت فعالیت (%) | پروتئین (میلی گرم) | بازیافت پروتئین (%) | فعالیت ویژه (واحد بر میلی گرم پروتئین) | خالص سازی |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------------------------|-----------|
| عصاره آنزیمی               | ۱۰۷۶±۳۸۹                 | ۸۲/۱۷±۶/۴               | ۱۳۰/۷۷ | ۱۰۰                | ۲۰/۵۴              | ۱۰۰                 | ۴                                      | ۱         |
| دیالیز                     | ۹۸۹۲±۳۵۰                 | ۷۵/۶۵±۶/۱               | ۱۳۰/۷  | ۹۲/۰۶              | ۱۳/۸۳              | ۶۷/۳۳               | ۵/۴۶                                   | ۱/۳۶      |
| کروماتوگرافی تعویض کاتیونی | ۳۸۳۶±۱۳۲                 | ۲۹/۳۶±۲/۴               | ۱۳۰/۶۶ | ۳۵/۷۳              | ۱/۶۴               | ۷/۹۷                | ۱۷/۹۳                                  | ۴/۴۸      |

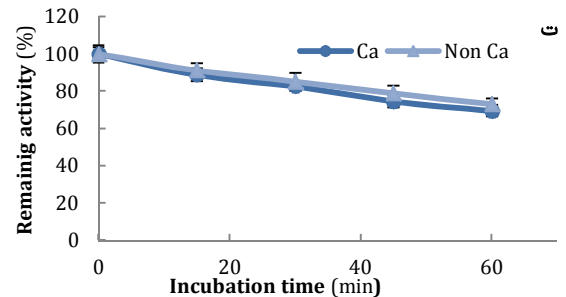
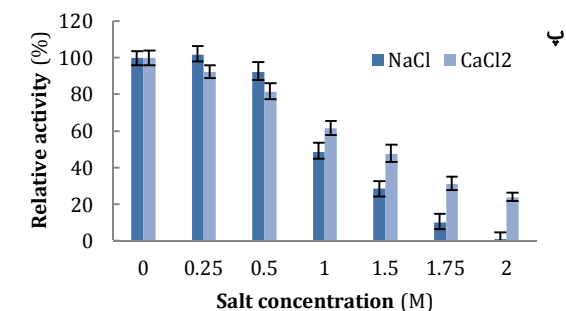
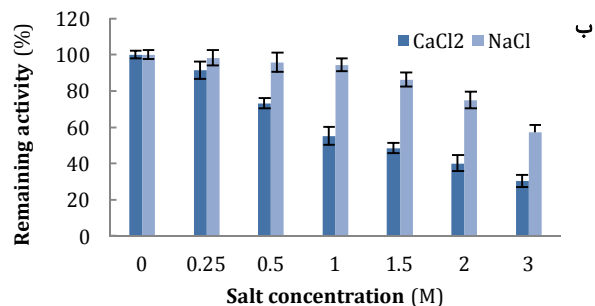
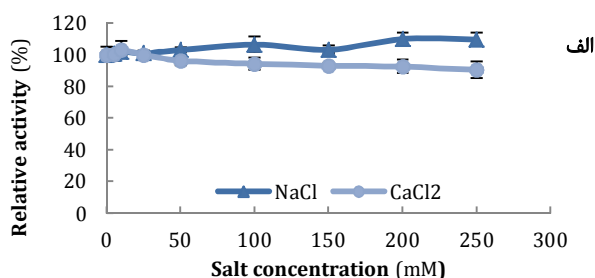
در هر مرحله خالص سازی درصد بازیافت فعالیت و پروتئین نشان داده شده است؛ داده ها میانگین سه تکرار با انحراف استاندارد هستند.

کایموزین است و بنابراین در تولید پنیر استفاده نمی شود [17]. از آنجایی که نسبت MCA/PA آسپارتیک پروتئاز به دست آمده از گیاه پنیرباد حدود ۴ تا ۱۰ مرتبه (بسته به pH و دما) کوچک تر از کایموزین است، پتانسیل لازم به عنوان مایه پنیر جایگزین در صنعت پنیر سازی را دارد.

**بررسی فعالیت آنزیم در حضور غلظت های مختلف یون های سدیم و کلسیم:** یون های سدیم و کلسیم نقش مهمی در فرآیند تولید پنیر دارند، بنابراین اثر این یون ها بر فعالیت کازئینولیتیک مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در نمودار ۲- الف نشان داده شده است، فعالیت پروتئولیتیک آنزیم با افزایش غلظت سدیم کلرید تا ۰/۲۵ مولار به صورت تدریجی افزایش یافته است، اما با افزایش بیشتر غلظت این نمک، فعالیت به سرعت کاهش یافت، به طوری که در غلظت های ۱/۰ و ۱/۷۵ مولار سدیم کلرید فعالیت آنزیمی به ترتیب به ۵۰٪ و ۱۰٪ فعالیت آغازی کاهش یافت (نمودار ۲- ب).

یکی از شاخص های ارزیابی پتانسیل یک آنزیم برای استفاده در تولید پنیر نسبت MCA/PA است. یک پروتئاز با نسبت بالای MCA/PA بهتر می تواند لخته تشکیل دهد، کارایی بالاتری داشته باشد و همچنین، طی فرآیند رسیدن پنیر، از تلخ شدن آن جلوگیری کند، در حالی که نسبت پایین MCA/PA ممکن است راندمان تشکیل لخته را کاهش داده و لخته های سست تری تولید کند و همچنین باعث ایجاد مزه تلخ در محصول شود [15]. کایموزین بالاترین نسبت MCA/PA در مقایسه با سایر منعقد کننده های آنزیمی را دارد. به طور مثال، این نسبت در مایه پنیر *Mucor*، مایه پنیر میکروبی *Papain* و *Pfizer* در مقایسه با کایموزین به ترتیب ۱/۶، ۲/۸ و ۲۰ برابر کوچک تر 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

**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 ۱۰ میلی‌مولار 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.



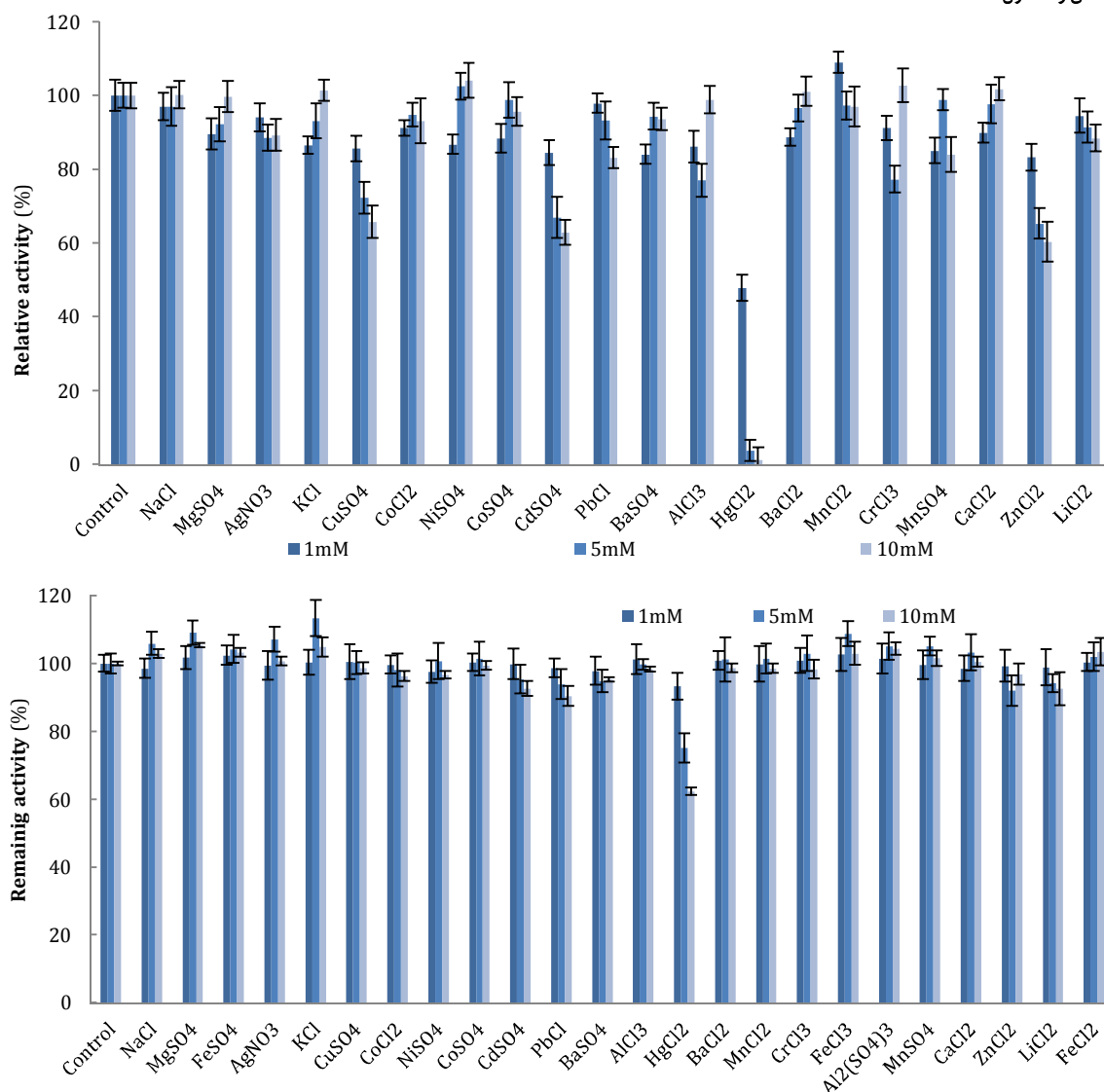
**نمودار ۲) اثر نمک‌های سدیم کلرید و کلسیم کلرید بر فعالیت و پایداری آنزیم:** (الف) اثر نمک در غلظت‌های صفر تا ۰/۲۵ مولار بر فعالیت آنزیم، (ب) اثر نمک در غلظت‌های صفر تا ۳ مولار بر پایداری آنزیم، (پ) اثر نمک در غلظت صفر تا ۲ مولار بر فعالیت آنزیم، (ت) اثر کلسیم در غلظت ۲۰ میلی‌مولار بر پایداری حرارتی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

ب). براساس نتایج گزارش‌شده توسط محققان دیگر، مشاهده می‌شود که سدیم کلرید اثرات متفاوتی بر پروتئازهای مختلف دارد. به‌عنوان مثال، فعالیت آنزیمی پروتئاز استخراج‌شده از ماهی کاد گرینلند (Greenland cod) به‌طور قابل ملاحظه‌ای در حضور سدیم کلرید افزایش می‌یابد، در حالی که پروتئولیز کازئین به‌وسیله عصاره *سینارا کاردونکولوس* (*Cynara cardunculus*) در حضور سدیم کلرید ۵٪ (وزنی/حجمی) کاهش می‌یابد. کاهش فعالیت آنزیم، ممکن است به‌دلیل غیرفعال‌شدن آنزیم از طریق پدیده رسوب‌دادن با نمک اتفاق افتاده باشد. دلیل این پدیده این است که در غلظت‌های بالاتر، سدیم کلرید 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 سدیم کلرید و ترکیبات مشابهی مثل کلسیم کلرید، 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 ۲۵۰ میلی‌مولار، 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 ۲/۰ مولار 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 سدیم کلرید 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 ۳ مولار سدیم کلرید تقریباً ۶۰٪ فعالیت آنزیم حفظ می‌شود که نشان‌دهنده پایداری بسیار بالای این آنزیم، در حضور سدیم کلرید است. در مقابل، پایداری آنزیم در مقابل نمک کلسیم کلرید چندان بالا نیست و با افزایش غلظت این نمک، پایداری آنزیم کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشاهده می‌شود که در غلظت ۱/۵ مولار کلسیم کلرید حدود ۵۰٪ فعالیت آنزیمی و در غلظت ۳ مولار این نمک، ۷۰٪ فعالیت آنزیمی از میان رفته است.

همان‌طور که در بخش قبل مشاهده شد فعالیت آنزیم در حضور غلظت یک‌مولار سدیم کلرید ۵۰٪ کاهش یافت در صورتی که پایداری آنزیم در مقابل این نمک ۵٪ کاهش یافت، بنابراین کاهش فعالیت آنزیم در حضور سدیم کلرید احتمالاً به‌دلیل اثر سدیم کلرید بر کازئین است تا خود آنزیم. همچنین، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از پایداری و فعالیت آنزیم نسبت به نمک کلسیم کلرید 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.



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

مشاهده می شود تمام یون های فلزی بررسی شده، موجب افزایش شدت فلوئورسانس و همچنین به میزان کمی موجب انتقال طول موج ماکزیم به طول موج های کوتاه تر شد. از میان یون های آزمایش شده،  $\text{Co}^{2+}$  بیشترین تاثیر را داشت؛ به گونه ای 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، به طوری که شدت جذب در حضور این یون به مقدار ۲۲۱/۵ واحد افزایش نشان داد. افزایش شدت جذب و انتقال به سمت طول موج های کوتاه تر، نشان دهنده غیرقطبی تر شدن ریزمحیط های اطراف کرموفورهای موجود در آنزیم است؛ به این معنی که یون های فلزی در غلظت ۵ میلی مولار، موجب القای تغییرات ساختاری در آنزیم شده اند.

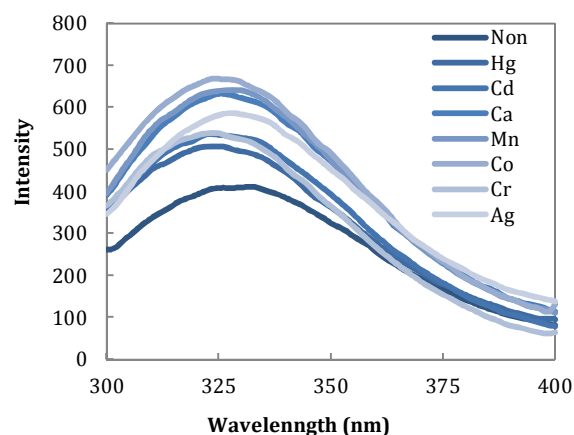
از جمله محدودیت های پژوهش حاضر در دسترس نبودن همیشگی نمونه های گیاهی به دلیل رویش این گیاهان در فصل های خاصی از سال است.

پیشنهاد می شود با توجه به مقاومت بالای آنزیم خالص شده در مقابل یون های فلزی، لازم است مقاومت آنزیم در مقابل سایر دنا توره کننده ها، حلال های آلی و دما های بالا بررسی شود تا پتانسیل آنزیم برای استفاده در صنعت به خوبی ارزیابی شود.

مطالعات نشان داده اند که یون های فلزی اثرات متفاوتی بر فعالیت آسپارتیک پروتئازهای مختلف دارند، به عنوان مثال، ریزوپوس پیپسین (*Rhizopus pepsin*) استخراج شده از ریزوپوس شیننزیس (*Rhizopus chinesis*) به طور قابل ملاحظه ای به وسیله  $\text{Fe}^{3+}$  مهار می شود؛ در حالی که با  $\text{Cu}^{2+}$ ،  $\text{Hg}^{2+}$ ،  $\text{Fe}^{2+}$  و  $\text{Pb}^{2+}$  هیچ اثر مهاری مشاهده نشد. آسپارتیک پروتئاز به دست آمده از *آسپرژیلوس نیگرا* (*Aspergillus niger BCRC BCRC 32720*) توسط  $\text{Fe}^{2+}$  به شدت فعال می شود، اما  $\text{Cr}^{3+}$ ،  $\text{Pb}^{2+}$  و  $\text{Fe}^{3+}$  آنزیم را به طور کامل مهار می کنند. یون  $\text{Cu}^{2+}$  نیز آسپارتیک پروتئاز استخراج شده از *آسپرژیلوس نیگرا* I1 را به شدت مهار می کند [22]. همچنین، اثر برخی از یون های فلزی در غلظت ۵ میلی مولار بر فعالیت آسپارتیک پروتئاز خالص شده از *ساردینلا آئوریتا* (*Sardinelle aurita*) مطالعه شده است. یون های  $\text{Na}^{+}$ ،  $\text{Ca}^{2+}$  و  $\text{K}^{+}$  اثری بر فعالیت آنزیم نداشتند در حالی که فعالیت آنزیم به وسیله  $\text{Mn}^{2+}$ ،  $\text{Ba}^{2+}$ ،  $\text{Zn}^{2+}$ ،  $\text{Mg}^{2+}$  و  $\text{Hg}^{2+}$  به مقدار بسیار کمی کاهش یافته است [18].

**اثر یون های فلزی بر طیف فلوئورسانس آنزیم:** نتایج به دست آمده از اثر یون های فلزی بر خصوصیات طیف نشری آسپارتیک پروتئاز خالص شده، در نمودار ۴ نشان داده شده است. همان طور که

- proteinas 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™*. 115<sup>th</sup> 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 *Sardinella* (*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



**نمودار ۴)** اثر یون‌های فلزی بر طیف فلوئورسانس ذاتی آنزیم خالص؛ یون‌های فلزی در غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار بر آنزیم خالص با غلظت ۳۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر استیک اسید/استات سدیم ۵۰ میلی‌مولار، 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 به صورت 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 به دلیل عدم نیاز به رسوب‌دهی توسط آمونیوم سولفات، کوتاه و سریع است و نیز، بازدهی و کارایی 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 به جز  $Hg^{2+}$ ، 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 کلسیم کلرید و سدیم کلرید؛ 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 به دلیل فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی کمال تشکر را دارند.

**تأییدیه اخلاقی:** موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ گونه 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

- Yegin S, Dekker P. Progress in the field of aspartic

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.

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*. 1<sup>st</sup> 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,