مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره 2، تابستان 1392، صفحات 40-31

خالص‌سازی جزئی و توصیف ویژگی‌های آنزیم منعقدکننده‌ی شیر از میوه‌های گیاه پنیرباد (*ویتانیا کواگولانس*)

مریم بیگمی[1]، محمد امین محمدی فر[2]، محسن قدس روحانی[3]، مریم هاشمی[4]، محرم ولی زاده[5]

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: mohamdif@ut.ac.ir
3- استادیار گروه صنایع غذایی مؤسسه آموزش عالی علمی کاربردی وزارت جهاد کشاورزی (شهید هاشمی نژاد مشهد)، ایران
4- استادیار پژوهشی، بخش تحقیقاتی بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران
5- استادیار مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت: 92/2/12 تاریخ پذیرش: 92/5/21

چکیده

سابقه و هدف: تلاش‌های متعددی برای جایگزین کردن مایه‌پنیر حیوانی با سایر پروتئازهای منعقدکننده‌ی شیر، به‌علت محدودیت تولید و قیمت در حال افزایش آن انجام شده است. میوه‌ی گیاه دارویی پنیر باد یا *ویتانیاکواگولانس* منبع غنی پروتئازهای منعقدکننده شیر است که از گذشته به عنوان مایه‌پنیر در تولید پنیرهای سنتی در جنوب ایران استفاده می‌شده است. مطالعات در خصوص این گیاه و بررسی ویژگی‌های آنزیم آن صورت نگرفته است. هدف این تحقیق، استخراج، خالص‌سازی جزئی و توصیف ویژگی‌های آنزیم منعقدکننده‌ی شیر از گیاه *ویتانیاکواگولانس* بود.

مواد و روش‌ها: عصاره‌ی آنزیمی میوه‌ی گیاه *ویتانیا کواگولانس* با استفاده از محلول 0/85 درصد NaCl استخراج و فعالیت انعقادی شیر و ویژگی‌های آنزیم منعقدکننده‌ی شیر (تأثیر دما، pH، غلظت و پایداری گرمایی) بررسی شد. عصاره به صورت جزئی خالص‌سازی شد و وزن ملکولی عصاره‌ی خام و اجزائی که بیشترین فعالیت انعقادی شیر را داشتند با SDS- PAGE تعیین شد.

یافته‌ها: دما و pH بهینه برای آنزیم به ترتیب 70°C و 4 بود. خالص‌سازی جزئی نشان داد که انعقاد شیر توسط آنزیم خالص شده با سولفات آمونیوم 50%، بیشتر از سایر اجزای خالص شده بود. وزن ملکولی این جزء با SDS-PAGE دو باند (66 و 29 کیلو دالتون) را نشان داد. یک ویژگی مهم آنزیم، پایداری گرمایی آن بود. به طوری که 74% فعالیت خود را در دمای 60°C به مدت 30 دقیقه حفظ کرد.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد آنزیم پروتئیناز گیاه *ویتانیا کواگولانس* می‌تواند آنزیم مناسبی به عنوان جایگزین مایه‌پنیر در صنعت لبنیات باشد.

واژگان کلیدی: *ویتانیا کواگولانس*، استخراج، خالص‌سازی جزئی، SDS-PAGE

• مقدمه

یکی از مراحل اصلی و مهم فرایند انواع پنیر انعقاد سیستم کازئینی پروتئین شیر و تبدیل آن به شبکه‌ی ژلی سه‌بعدی است. انعقاد سیستم کازئینی با چندین روش امکان‌پذیر است. یکی از مهم‌ترین آن‌ها انعقاد به وسیله‌ی عمل پروتئازهای اختصاصی (مایه‌پنیر) است. به استثنای پنیرهای تازه مانند کاتیج (Cottage) و کوارگ (Quarg)که در آن‌ها شیر با اسید لاکتیک لخته می‌شود، در تولید سایر پنیرهای تشکیل لخته به وسیله‌ی عمل مایه‌پنیر صورت می‌گیرد (1). از میان چندین آنزیم منعقدکننده‌ی شیر، رنتِ به دست آمده از شیردان گوساله‌ی شیرخوار به عنوان اولین مایه پنیر استاندارد گزارش شده است. اما افزایش تولید جهانی پنیر و مصرف آن، ظهور بیماری‌های مزمن و خطرناک (مثل جنون گاوی)، کاهش کشتار گوساله‌های جوان به دلیل افزایش تقاضا برای گوشت، افزایش رژیم

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-09]

غذایی گیاهخواری در برخی جوامع و عدم مصرف این نوع مایه‌پنیر در برخی از کشورها به دلایل مذهبی و اخلاقی سبب کاهش تولید این نوع مایه‌پنیر شده است (2). از این رو، تلاش‌ها در خصوص جایگزین کردن آن با سایر پروتئازهای منعقدکننده‌ی شیر افزایش یافته است. بررسی‌ها در خصوص معرفی جایگزین مناسب، موجب معرفی مایه‌پنیرهای میکروبی مختلف شد که با وجود برخی مزایا، به دلیل طعم تلخ و کاهش بازده محصول نهایی این منابع مناسب نبوده‌اند. هم‌چنین، در برخی کشورها برای تولید پنیرهای رایج از این نوع مایه‌پنیرها استفاده نمی‌شود (3).

یکی دیگر از منابع جایگزین رنت، عصاره‌های گیاهی هستند که از دیرباز به عنوان مایه‌پنیر برای تولید پنیر در نواحی روستایی و به طور سنتی استفاده شده اند. در سال‌های اخیر توجه به این نوع مایه‌پنیرها بنا به دلایلی از جمله مناسب بودن پنیرهای تولید شده با آنزیم‌های طبیعی گیاهی برای افراد گیاهخوار که از رنت‌های حیوانی استفاده نمی کنند و هم‌چنین معرفی این‌گونه محصولات به عنوان محصولات حلال و کوشر افزایش یافته است (4). بنابراین، جستجو برای پروتئازهای گیاهی مناسب، به منظور صنعتی کردن آن‌ها هم‌چنان ادامه دارد (5). ولی متأسفانه اغلب مایه‌پنیرهای گیاهی به دست آمده به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی شدید برای مصارف صنعتی مناسب نیستند، اگرچه استثناهایی نیز وجود دارد مانند گیاه *سینارا کاردونکلوس* (*Cynara cardunculus*) که در بسیاری از کشورها از جمله پرتغال و اسپانیا از آن در تولید پنیرهای لاسرنا (La Serena) و لوس پدروچ (Los Pedroches) استفاده شده است. مطالعات متعددی هم روی عصاره‌ی حاصل از آن انجام شده است (6). یکی دیگر از پروتئازهای گیاهی دارای پتانسیل انعقاد شیر، پروتئاز یک گیاه دارویی ارزشمند با نام عمومی پنیرباد و نام علمی *Withanina coagulans* است. انتظار می‌رود در خصوص این گیاه ویژگی‌های نامطلوب فوق الذکر وجود نداشته باشد (7).

گیاه پنیرباد (*ویتانیا کواگولانس*) متعلق به خانواده‌ی *سولاناسه* گیاهی است پایا، درختچه‌ای، با بوته‌های به ارتفاع 30 تا 100 سانتی‌متر که به صورت خودرو در سراسر پاکستان و هم‌چنین جنوب غربی هند و افغانستان می‌روید. در ایران پراکنش این گیاه محدود به منطقه‌ی بلوچستان در استان سیستان و بلوچستان است و عمدتاً در رویشگاه‌های طبیعی شهرستان‌های سراوان، خاش و ارتفاعات بم پشت رشد می‌کند (8).

قسمت‌های مختلف این گیاه در طب سنتی برای درمان اسهال، استفراغ و فشارخون تجویز می‌شود (10، 9). یافته‌های جدید حاکی از تأثیر ضد سرطانی و تأثیر آنتی‌دیابتی آن است. دامداران محلی در استان سیستان و بلوچستان از میوه‌های گیاه دارویی *ویتانیا کواگولانس* با استفاده از شیر گاو و گوسفند یک نوع پنیر سفید نرم تولید می‌کنند که کاملاً به صورت تجربی تهیه می‌شود.

باوجود استفاده از این گیاه از دیرباز در تولید پنیر، مطالعات بسیار کمی در خصوص استخراج آنزیم، خالص‌سازی و توصیف ویژگی‌های آنزیم آن انجام شده است. با توجه به توسعه‌ی صنعت پنیرسازی در دو دهه گذشته، کمبود مایه‌پنیر حیوانی، معایب ناشی از سایر مایه‌پنیرها و پتانسیل خوب پروتئازهای موجود در گیاه پنیرباد، پژوهش درباره‌ی استخراج آنزیم منعقدکننده‌ی شیر، خالص‌سازی و توصیف ویژگی‌های آن جهت کاربرد در صنعت ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش، پروتئازهای حاصل از میوه‌های گیاه پنیرباد به عنوان یک منبع آنزیمی جایگزین رنت استخراج و سپس به صورت جزئی خالص‌سازی شد. ویژگی‌های آنزیم منعقدکننده‌ی شیر نیز مورد بررسی قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاه: نمونه‌های میوه‌ی گیاه پنیرباد در بازه‌ی زمانی تیر 1391 تا مرداد 1391 توسط مرکز *پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی دانشگاه سیستان و بلوچستان*، از نواحی اطراف شهر سراوان جمع‌آوری شد. این منطقه دارای رطوبت نسبی 20% و دمای 34°C (در این موقع از سال) است. نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری با آب بدون یون شسته و در دمای 25°C در محیط آزمایشگاه خشک شد.

عصاره‌گیری از میوه‌ی گیاه: استخراج عصاره‌ی آنزیمی با محلول 0/85 درصد NaCl انجام شد. 10 گرم میوه‌ی گیاه پنیرباد به وسیله‌ی آسیاب آزمایشگاهی پودر شد. پودر حاصل با60 میلی‌لیتر از محلول NaCl هموژنیزه شد. مخلوط

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-09]

حاصل به مدت 24 ساعت همراه با هم زدن آرام در دمای 4°C قرار گرفت. بعد از گذشت مدت زمان لازم به منظور جدا سازی مواد جامد و نامحلول، ترکیب حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای 4°C در 20800×g سانتریفوژ شد. پس از صاف شدن مجدد محلول فوقانی، عصاره حاصل تا زمان استفاده در دمای 4°C نگهداری شد (11).

شناسایی آنزیم و تعیین مقدار آن: غلظت پروتئین تام عصاره‌ی آنزیمی طبق روش برادفورد(12) با دستگاه اسپکتروفتومتر (CECIL، انگلستان) در طول موج 595 نانومتر و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت انعقادی شیر: به منظور اندازه‌گیری فعالیت انعقادی شیر، ابتدا پودر شیر خشک 10% با pH=6/5 به عنوان سوبسترا تهیه شد. برای این منظور پودر شیر خشک (بدون چربی، شرکت *کاله*) با حل کردن 10 گرم در 100 میلی‌لیتر محلول $CaCl_2$ بازسازی شد. سپس شیر حاصل در دمای 35°C به مدت 15 دقیقه نگهداری شد و به عنوان سوبسترا در سرتاسر مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. pH نمونه‌ها با استفاده از اسید لاکتیک و هیدروکسید سدیم تنظیم شد (3).

فعالیت انعقادی شیر به روش اوتانی (1991) و با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد (3). به 2 میلی‌لیتر از سوبسترای قرار گرفته در دمای 37°C ، 200 میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی اضافه شد. تشکیل لخته با چرخش دستی لوله در فواصل زمانی کم در دمای 37°C بررسی شد. نقطه‌ی پایانی زمانی بود که اجزاء (لخته) به طور مجزا درون لوله آزمایش مشاهده می‌شد. آزمون در سه تکرار انجام و میانگین آن به عنوان زمان انعقاد گزارش شد.

یک واحد انعقاد شیر، مقدار آنزیمی است که باعث انعقاد10 میلی‌لیتر سوبسترا در مدت زمان30 دقیقه شود.

فعالیت انعقادی شیر توسط این فرمول محاسبه شد (3).

$$MCA\ (Milk\ Clotting\ Activity)\ (units) = 2400/T \times S/E$$

T= زمان انعقاد (ثانیه)

S= حجم سوبسترا

E= حجم عصاره‌ی آنزیمی

خالص‌سازی جزئی (جزء بندی) عصاره‌ی میوه‌ی گیاه پنیرباد توسط سولفات آمونیوم جامد: خالص‌سازی جزئی عصاره طبق روش ونگ و همکاران (2007) انجام شد (13). برای تهیه‌ی اجزا ابتدا مقادیر سولفات آمونیوم مورد نیاز برای هر جزء محاسبه شد. برای دستیابی به حالت 10% اشباع، 0/05 گرم سولفات آمونیوم جامد به آرامی به عصاره افزوده شد و سپس به مدت 10 دقیقه در دمای 4°C انکوبه شد. رسوب حاصل با میکروفیوژ در 18000×g به مدت 10 دقیقه در دمای 4°C بازیافت شد. مطابق روش فوق برای دستیابی به حالت 20% اشباع به محلول روئی حاصل از مرحله‌ی قبل 0/05 گرم سولفات آمونیوم اضافه و به مدت 20 دقیقه در دمای 4°C انکوبه شد. رسوب حاصل توسط میکروفیوژ در 18000× g به مدت 10 دقیقه در دمای 4°C بازیافت شد. جزء بندی به همین ترتیب ادامه یافت تا اجزای 30، 40، 50، 60، 70 و 80 درصد اشباع حاصل شد. این اجزا به ترتیب P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8 نامیده شدند. سپس هر یک از رسوب‌های به دست آمده در 600 میکرولیتر محلول NaCl برای انجام آزمون بعدی حل شد. به منظور نمک‌زدایی از اجزای خالص شده، پس از فعال‌سازی کیسه‌ی دیالیز (*Sigma* شرکت 43mm, D9527) هر جزء جداگانه دیالیز شد. این عمل به مدت 48 ساعت در دمای 4°C در آب دیونیزه انجام گرفت. به منظور انجام بهتر عمل دیالیز هر 8 ساعت یک بار آب دیونیزه تعویض شد. سپس فعالیت انعقادی شیر و غلظت پروتئین هر یک از اجزای خالص شده که دیالیز شده بود، طبق روش‌های فوق اندازه‌گیری شد.

تعیین وزن ملکولی عصاره و اجزای خالص شده با استفاده از الکتروفورز: به منظور تعیین وزن ملکولی عصاره‌ی میوه و اجزای به دست آمده از مراحل خالص‌سازی که بیشترین فعالیت انعقادی شیر را داشتند، از تکنیک SDS-PAGE به روش لاملی با رنگ‌آمیزی کوماسی بلو استفاده شد (14).

تأثیر pH بر فعالیت آنزیم: pH بهینه برای فعالیت آنزیم با اندازه‌گیری بیشترین فعالیت انعقادی شیر عصاره میوه درمحدوده pH، از 4 تا 9 در بافرهای مختلف اندازه‌گیری شد. بافرهای استفاده شده عبارت بودند از:

- بافر50 میلی مولار سیترات سدیم با pH=4 و pH=5

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-09]

- بافر50 میلی مولار فسفات سدیم با pH=6 و pH=7
- بافر 50 میلی مولار Tris-HCl با pH=8 و PH=9

برای این منظور 10 گرم میوه‌ی پودر شده *ویتانیا کواگولانس* به طور جداگانه با60 میلی‌لیتر از محلول بافرهای ذکر شده هموژنیزه شد. مخلوط حاصل به مدت 24 ساعت همراه با هم زدن آرام در دمای 4°C قرار گرفت. بعد از گذشت مدت زمان لازم به منظور جدا سازی مواد جامد و نامحلول، مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در 20800xg سانتریفوژ شد. پس از صاف شدن مجدد محلول فوقانی، عصاره‌ی حاصل به منظور بررسی فعالیت انعقادی شیر تا زمان آنالیزهای بعدی در دمای 4°C نگهداری شد.

تأثیر غلظت متفاوت میوه در زمان انعقاد شیر: به منظور تعیین غلظت بهینه‌ی عصاره‌ی آنزیمی، غلظت‌های متفاوتی از عصاره‌ی آنزیمی (5، 10، 15، 20 ،50، 100، 150 و 200 میکرولیتر) بررسی شد. به این ترتیب که ابتدا 2 میلی‌لیتر از واکنش‌گر به مدت 10 دقیقه در دمای 37°C انکوبه شد، سپس غلظت‌های متفاوتی از عصاره استخراجی(5 ، 10 ، 15 ، 20 ،50 ، 100 ، 150 و 200 میکرولیتر) به هر یک از لوله‌ها اضافه شد و تشکیل لخته با چرخش دستی لوله در فواصل زمانی کم در دمای 37°C بررسی شد. نقطه‌ی پایانی زمانی بود که اجزاء به طور مجزا در لوله آزمایش مشاهده می‌شد.

تأثیر دما بر زمان انعقاد شیر توسط عصاره‌ی میوه: به منظور تعیین دمای بهینه برای فعالیت آنزیم، زمان انعقاد شیر در دماهای 37، 40، 50، 60، 70 و 80 درجه‌ی سانتی‌گراد مانند روش ذکر شده بررسی شد. به این ترتیب که ابتدا 2 میلی‌لیتر واکنش‌گر به مدت 10 دقیقه در هر یک از دماهای بالا قرار داده شد، سپس200 میکرولیتر عصاره به هر یک از واکنش‌گرها در دمای مورد نظر افزوده شد. تشکیل لخته در دماهای مورد نظر با چرخش دستی لوله هرچند وقت یک بار مورد بررسی قرار گرفت (11).

تأثیر دما بر فعالیت آنزیمی عصاره‌ی میوه (پایداری گرمایی آنزیم): پایداری گرمایی عصاره‌ی آنزیمی در دماهای 40 ، 50 ، 60 و 70 درجه‌ی سانتی‌گراد بررسی شد. برای این منظور 200 میکرولیتر از عصاره‌ی میوه به مدت 30 دقیقه در هر یک از این دماها انکوبه شد و پس از گذشت مدت زمان تعیین شده، عصاره تا دمای محیط سرد شد. سپس به هرکدام 2 میلی‌لیتر سوبسترا اضافه و تشکیل لخته با چرخش دستی لوله در فواصل زمانی کم در دمای 37°C مورد بررسی قرار گرفت. نقطه‌ی پایانی زمانی بود که اجزاء به طور مجزا در لوله آزمایش مشاهده می‌شد.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های به دست آمده، پس از تست نرمالیته در قالب طرح آماری فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار مورد آزمون قرار گرفت. در صورت وجود معنی‌داری، مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5% انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه‌ی میانگین‌ها توسط نرم افزار SPSS 18 انجام گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار12 systat sigma plot ترسیم شد.

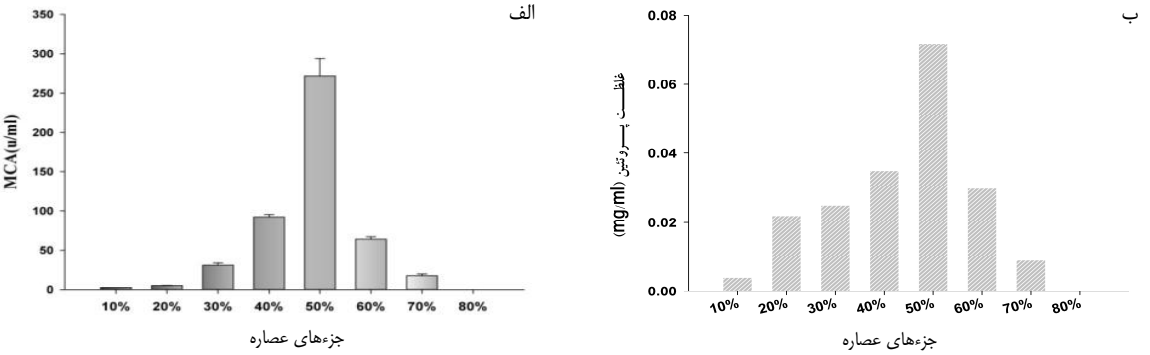
• یافته‌ها

اندازه‌گیری غلظت پروتئین: غلظت پروتئین عصاره‌ی آنزیمی بعد از ترسیم نمودار استاندارد با بالاترین ضریب همبستگی و معادله‌ی منحنی به ترتیب R^2 =0/984 و y =0/ 928 x+ 0/034 تعیین شد. غلظت پروتئین عصاره‌ی آنزیمی 1mg/ml بود.

خالص‌سازی جزء به جزء (جزء بندی) عصاره میوه‌ی گیاه پنیرباد توسط سولفات آمونیوم جامد: نتایج حاصل از خالص‌سازی آنزیم موجود در عصاره‌ی میوه‌ی گیاه *ویتانیاکواگولانس* نشان داد که از میان 7 جزء به دست آمده، بیشترین میزان فعالیت انعقادی شیر در جزء 50% (P5) و پس از آن در جزء 40% (P4) مشاهده شد (شکل 1. الف.). ولی جزء 50 % بیشترین میزان فعالیت انعقادی شیر (2707U/ml) با مقدار پروتئین (7.1mg/ml) را داشت (داده‌ها مربوط به سایر اجزا نشان داده نشده است). مقایسه‌ی عینی ژل‌های به دست آمده از هر یک از اجزا هم نشان داد که ژل حاصل از جزء 50% نسبت به ژل حاصل از سایر اجزا از بافت سفت‌تر و محکم‌تری برخودار است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت انعقاد شیر مختلف با یافته‌های به دست آمده از اندازه‌گیری میزان پروتئین هر یک از اجزا مطابقت داشت. به طوری که جزء P5 و سپس جزء P4

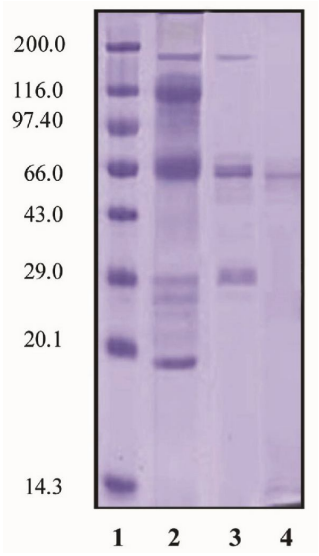
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-09]

بیشترین میزان محتوای پروتئینی و جزء 10 درصد کمترین میزان پروتئین را داشتند. هم‌چنین، در جزء 80 درصد هیچ گونه فعالیت انعقادی مشاهده نشد. وزن ملکولی پروتئین‌های موجود در عصاره‌ی خام و اجزای P4 و P5 با استفاده از ژل پلی‌آکریل‌آمید تعیین شد. الکتروفوتوگرام حاصل برای جزء P5 یک باند پروتئینی با وزن ملکولی 66 کیلو دالتون را نشان داد و جزء P4 علاوه بر باند فوق دارای دو باند دیگر با وزن ملکولی29 و 170 کیلو دالتون نیز بود. پروتئین‌های به دست آمده از عصاره خام در الکتروفوتوگرام به صورت هفت باند با محدوده‌ی وسیعی از اوزان ملکولی 20 تا 170 کیلودالتون مشاهده شدند (شکل 2).



شکل 1. الف. میانگین و انحراف استاندارد داده های حاصل از MCA هر یک از اجزای حاصل از خالص‌سازی جزئی در دمای 37°C و pH=6/5

شکل 1. ب. غلظت پروتئینی هر یک از اجزای به دست آمده از خالص‌سازی عصاره‌ی آنزیمی گیاه *ویتانیا کواگولانس*



شکل 2. الکتروفورتوگرام حاصل از SDS –PAGE عصاره میوه *ویتانیا کواگولانس*

1. مارکر ملکولی، 2. عصاره‌ی میوه 3. جزء 40 درصد حاصل از خالص‌سازی جزئی (F4) 4. جزء 50 درصد حاصل از خالص‌سازی(F5)

مارکر ملکولی استفاده شده:

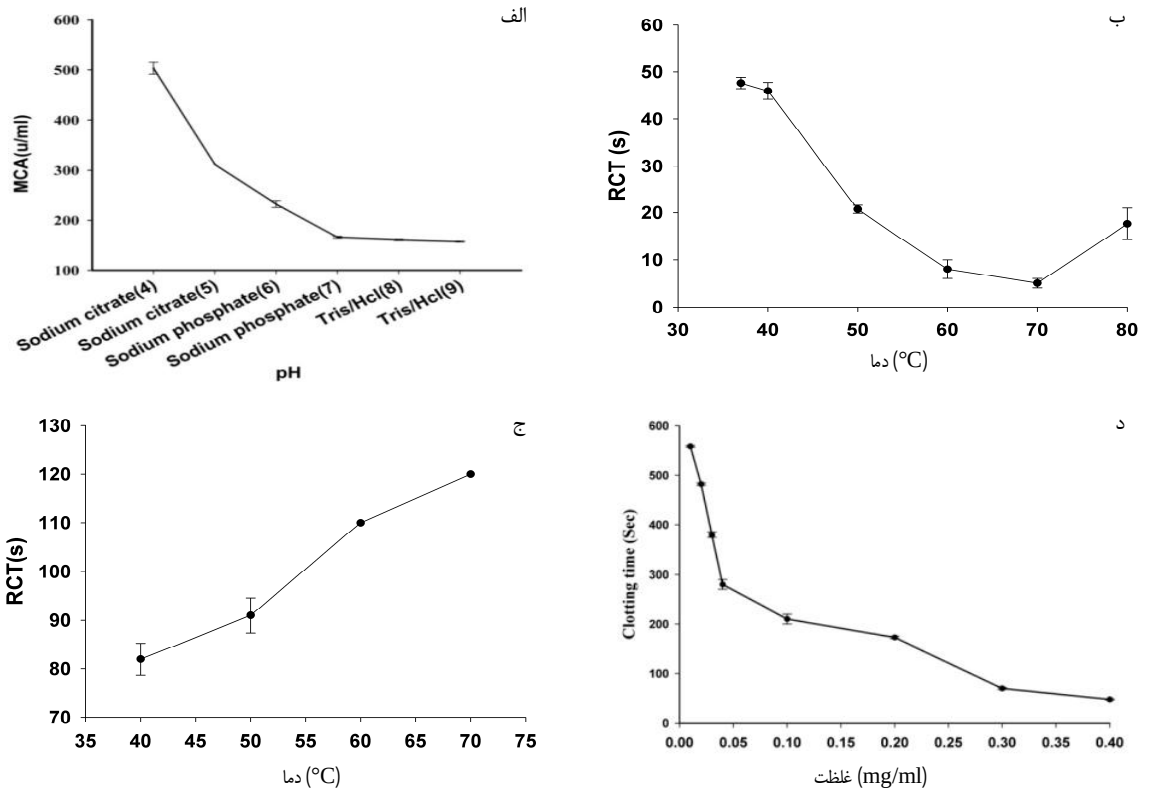
Myosin (200 kDa), β-Galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.40 kDa), bovine serum albumin (66.kDa), ovalbumin(43.0 kDa), carbonic anhydrase (29.0 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and lysozyme (14.3 kDa).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-09]

تأثیر pH بر فعالیت آنزیم: استخراج عصاره‌ی آنزیمی با بافرهای مختلف نشان داد که با افزایش pH بافر فعالیت انعقادی عصاره کاهش پیدا می‌کند و با کاهش pH فعالیت انعقادی افزایش می‌یابد. همان‌طور که در شکل 3. الف نیز مشاهده می‌شود با افزایش مقادیر pH از 4 تا 7 یک افزایش تدریجی و سریع در زمان انعقاد شیر به وجود آمد، ولی هنگامی که pH از 7 تا 9 افزایش یافت، این افزایش خیلی قابل توجه نبود. به طوری‌که در pH =9 حدود 31 درصد از فعالیت انعقادی مشاهده شده در pH =4 حفظ شد. با وجود این، بیشترین فعالیت انعقادی در عصاره‌ی استخراجی در pH=4 (با بافر سیترات سدیم) مشاهده شد.

تأثیر دما بر فعالیت و پایداری آنزیم: فعالیت انعقادی شیر در دماهای مختلف از محدوده‌ی دمایی 37 تا 80 درجه‌ی سانتی‌گراد ارزیابی شد. با افزایش دما میزان فعالیت آنزیم به طور معنی‌داری افزایش یافت. به طوری که در دمای 70°C فعالیت آنزیمی 9 برابر بیشتر از فعالیت آنزیمی در دمای 40°C بود (شکل3. ب). اما افزایش بیشتر دما (تا 80°C) سبب کاهش زمان انعقاد شد. بررسی پایداری گرمایی آنزیم در دماهای 40 تا 70 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه بررسی شد، نشان داد که بیش از 74 درصد از فعالیت آنزیمی عصاره پس از 30 دقیقه انکوباسیون در دمای 60°C حفظ شده است (شکل 3. ج).

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آنزیمی بر فعالیت انعقادی شیر: نتایج به دست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف در شکل 3. د نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره‌ی آنزیمی از 5 میکرولیتر (0/01mg/ml) تا 200 میکرولیتر (0/4 mg/ml) زمان انعقاد از 558/4 به 47/7 ثانیه کاهش یافت. با وجود این افزایش غلظت، بافت لخته‌ی به دست آمده با غلظت 200 میکرولیتر سفت‌تر از سایر غلظت‌ها بود و هیچ گونه مزه‌ی تلخ در این غلظت مشاهده نشد.



شکل 3. تأثیر دما، pH، غلظت آنزیم بر زمان انعقاد و میزان فعالیت انعقادی شیر

(الف). تأثیر pH بر فعالیت انعقادی عصاره‌ی میوه در محدوده pH از 4 تا 9 ؛ ب). تأثیر دمای شیر بر زمان انعقاد ؛ ج). تأثیر دما بر پایداری گرمایی عصاره‌ی آنزیمی ؛ د). تأثیر غلظت‌های متفاوت عصاره آنزیمی بر زمان انعقاد (نتایج به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف استاندارد گزارش شده است)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-09]

• بحث

هنگامی که یک جایگزین رنت مورد بررسی قرار می‌گیرد، ارزیابی حساسیت آن به تغییرات pH، دما و غلظت بسیار مهم است. همان‌طور که در نتایج هم ذکر شد، بیشترین میزان فعالیت انعقادی عصاره‌ی آنزیمی *ویتانیا کواگولانس* در pH =4 مشاهده شد یعنی آنزیم موجود در عصاره‌ی میوه‌ی گیاه *ویتانیا کواگولانس* یک پروتئاز اسیدی است و به همین دلیل در محیط قلیایی از میزان فعالیت آن کاسته می‌شود به طوری‌که هر چه pH بافر استخراجِ کمتر و به pH فعالیت بهینه‌ی آنزیم نزدیک شود، سرعت منعقد کردن شیر توسط آن افزایش می‌یابد. از این نظر، عصاره‌ی آنزیمی *ویتانیا کواگولانس* مشابه سایر آسپارتیک پروتئینازهای دیگر است (15). چنین الگوی رفتاری در بیشتر مایه‌پنیرهای تجاری موجود نیز مشاهده می‌شود که با کاهش pH از مقادیر 7 به 4 تا 5 میزان MCA افزایش می‌یابد(16). نتایج حاصل از این پژوهش با مشاهدات *Macedo* و همکاران که pH بهینه برای گیاه *سینارا کاردونکلوس* را بین 3 تا 5 گزارش کردند (17).

یکی دیگر از عوامل مؤثر روی فرایند انعقاد، غلظت آنزیم منعقدکننده است. *Storch* و همکاران (18) وجود رابطه‌ی معکوس بین زمان انعقاد شیر و عمل مایه‌پنیر با غلظت آنزیم را گزارش کردند. به طوری که با افزایش غلظت آنزیم، فعالیت انعقادی شیر افزایش و زمان انعقاد کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر، سرعت انعقاد شیر با غلظت آنزیم نسبت مستقیم دارد. این تغییرات به افزایش سرعت هیدرولیز κ-کازئین نسبت داده می‌شود. به عبارت دیگر در زمان کمتری مقدار بیشتری κ-کازئین به پاراکاپاکازئین و کازئینوماکروپپتید تبدیل می‌شود و در نتیجه‌ی به هم خوردن تعادل الکترواستاتیکی محیط، انعقاد شیر در زمان کوتاه‌تری انجام می‌پذیرد. اگرچه رابطه‌ی مستقیمی بین این دو وجود ندارد (20، 19، 16). این موضوع در عصاره‌ی آنزیمی گیاه *ویتانیا کواگولانس* نیز مشاهده شد به این ترتیب که با افزایش غلظت آنزیم، زمان انعقاد کاهش قابل توجهی داشت. مطالعات انجام شده توسط *Chazarra* و همکاران (11) در خصوص گیاه *سینارا اسکولیموس* نشان داده که با افزایش غلظت عصاره‌ی آنزیمی، زمان انعقاد کاهش می‌یابد و از این نظر با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد.

دما یکی از عوامل تأثیر گذار بر فرایند انعقاد است به طوری که در درجه حرارت کمتر از 10°C به دنبال عمل مایه‌پنیر فقط κ-کازئین برش می‌خورد و نقش محافظت از میسل‌های کازئین و به دنبال آن تشکیل لخته اتفاق نمی‌افتد. علت، بالا بودن ضریب حرارتی فاز دوم انعقاد است. در دماهای بین 10 تا 20 درجه‌ی سانتی‌گراد سرعت تشکیل لخته بسیار کند است. ولی با افزایش درجه حرارت بین 20 تا 40 درجه سانتی‌گراد سرعت تشکیل لخته مرتباً افزایش می‌یابد. در دماهای بالاتر از 50°C مجدداً سرعت تشکیل لخته کاهش می‌یابد. (19) و در مورد آنزیم کیموزین (موجود در رنت گوساله) در دمای 52°C سرعت انعقاد به نحو محسوسی کاهش می‌یابد و در دمای بالاتر از 65°C انعقاد صورت نمی‌پذیرد(21).

نتایج حاصل از تأثیر دمای شیر بر زمان انعقاد شیر توسط عصاره‌ی میوه نشان داد که با افزایش دما تا 70°C زمان انعقاد به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (9 برابر کمتر از زمان انعقاد در دمای 37°C). از این رو، دمای 70°C دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم *ویتانیا کواگولانس* در نظر گرفته شد. در حقیقت می‌توان گفت تسریع در انعقاد همراه با افزایش دما بر اثر گسترش دامنه‌ی فعالیت آنزیم است. با افزایش بیشتر دما تا 80°C میزان فعالیت انعقادی روندی کاهشی را نشان می‌دهد. دلیل کاهش فعالیت انعقادی در دمای بالاتر از 70°C به دلیل دناتوراسیون نسبی آنزیم است. این الگوی تغییرات دمایی عصاره‌ی آنزیمی *ویتانیا کواگولانس* در مقایسه با کیموزین بسیار قابل توجه است. مشابه الگوی تغییرات دماییِ به دست آمده با عصاره‌ی *ویتانیا کواگولانس* توسط *احمد* و همکاران (22) در مورد عصاره‌ی آنزیمی گیاه *سولانیوم دوبیوم* نیز گزارش شده است. هم‌چنین *Kumar* و همکاران (23) حداکثر دما برای فعالیت انعقادی آنزیم منعقدکننده‌ی شیر (آسپارتیک پروتئیناز) استخراج شده از *رایزوپوس اوریزا* را دمای 60°C گزارش کردند به طوری که این آنزیم در دمای 70°C به سرعت غیرفعال می‌شود.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری پایداری گرمایی عصاره‌ی آنزیمی *ویتانیا کواگولانس*، مقاوم بودن عصاره در دماهای بالا را نشان می‌دهد. به طوری‌که در دمای 60°C ، 74 درصد از

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-09]

فعالیت انعقادی عصاره حفظ شد. به نظر می‌رسد که پایداری گرمایی عصاره‌ی آنزیمی *ویتانیا کواگولانس* بیشتر از 70°C نیز باشد. بیشتر آنزیم‌ها در دماهای بالا به طور کامل یا تا حد زیادی دناتوره می‌شوند. این موضوع از لحاظ تجاری‌سازی یک عامل منفی تلقی می‌شود (24). بنابراین، دارابودن پایداری گرمایی عصاره‌ی آنزیمی *ویتانیا کواگولانس* نسبتاً قابل توجه است. آنزیم‌هایی که پایداری حرارتی دارند، از مزایای متعددی مثل مقاومت در مقابل اکثر عوامل دناتوره‌کننده‌ی شیمیایی (حلال‌های آلی) و پایداری در شرایط انبارمانی برخوردارند (25). *Rapaso* و همکاران و (26) با بررسی پایداری گرمایی آسپارتیک پروتئاز استحصالی از گیاه *Centaurea calcitrapa* گزارش کردند در دمای 52°C حدود 60 درصد از فعالیت انعقادی عصاره‌ی آنزیم از بین می‌رود و در دمای 70°C آنزیم کاملاً غیرفعال می‌شود و فعالیت انعقادی مشاهده نشده است. هم‌چنین *Kumar* و همکاران (27) مشابه نتایج ارائه شده توسط *Rapaso* را در مورد آسپارتیک پروتئاز به دست آمده از *رایزوپوس اوریزا* گزارش کردند که در دمای 60°C آنزیم 62 درصد از فعالیت اولیه‌ی خود را از دست داده است.

هر یک از اجزای به دست آمده در جزءبندی عصاره‌ی آنزیمی توسط سولفات آمونیوم به عنوان یک مرحله‌ی خالص‌سازی فعالیت انعقادی متفاوتی دارد. مقایسه‌ی نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت پروتئین هر یک از اجزا و نتایج حاصل از فعالیت انعقادی اجزای مختلف نشان می‌دهد که همبستگی بین مقدار پروتئینی هر یک از اجزا و فعالیت انعقادی آن‌ها وجود دارد. به این معنی که بالا بودن غلظت پروتئین در هر یک از اجزا می‌تواند به دلیل حضور آنزیم انعقادی شیر باشد. در عصاره‌ی آنزیمی *ویتانیا کواگولانس* جزء 50 درصد اشباع، بیشترین مقدار پروتئین و بیشترین فعالیت انعقادی را داشت. پس از آن جزء 40 درصد بیشترین فعالیت انعقادی را داشت. *Campos* و همکاران (28) نیز با خالص‌سازی جزئی عصاره‌ی آنزیمی *سینارا کاردونکلوس* توسط سولفات آمونیوم و تعیین فعالیت انعقادی هر یک از اجزای به دست آمده، گزارش کردند بیشترین فعالیت انعقادی در جزء 50 درصد اشباع وجود دارد. از سوی دیگر، مشاهدات به دست آمده در خالص‌سازی عصاره‌ی آنزیمی *ویتانیا کواگولانس* با نتایج ارائه شده توسط *احمد* و همکاران (22) در مورد خالص‌سازی جزئی عصاره‌ی گیاه *سولانیوم دوبیوم* کاملاً مطابقت دارد.

الکتروفورتوگرام حاصل از SDS-PAGE در جزء P5 یک باند پروتئینی با وزن ملکولی 66 کیلو دالتون را نشان داد .. هم‌چنین، با وجود این که پروتئین‌های به دست آمده از عصاره‌ی خام به صورت 7 باند با محدودهٔ وسیعی از اوزان از 20 تا 170 کیلو دالتون مشاهده شدند، ولی اکثریت باندها بین 20 تا 66 کیلو دالتون قرار داشتند. برخی از این باندها جرم‌های ملکولی مشابه آسپارتیک پروتئازها (آنزیم‌های دارای پتانسیل انعقاد شیر) را داشتند. در جزء P4 پروتئین با وزن ملکولی 29 کیلو دالتون مشاهده شد که مشابه وزن ملکولی یکی از سه آنزیم خالص شده‌ی به دست آمده از گیاه *سینارا کاردونکلوس* (سیناراز A) است(29)

ترسیب با سولفات آمونیوم نه تنها یک روش ساده، مؤثر و ارزان برای تغلیظ و خالص‌سازی آنزیم است، بلکه سبب خارج شدن ترکیبات فنلی نیز می‌شود که به مقادیر زیادی در عصاره‌ی خام وجود دارد و به آسانی به رنگدانه‌های قهوه‌ای رنگ اکسیده می‌شود. علاوه بر این، پیشرفت خالص‌سازی اثر شدیدی روی کیفیت لخته‌ی نهایی دارد. این موضوع در ژل‌های حاصل از جزء 50 درصد اشباع نیز مشاهده شد.

استفاده‌های دارویی و غذایی از گیاه ارزشمند *ویتانیا کواگولانس* از دیرباز و سازگاری شرایط فعالیت آنزیم با شرایط تولید پنیر و هم‌چنین پایداری این آنزیم در محدوده‌ی وسیعی از دما امکان کاربرد آن را در صنعت غذا به ویژه صنعت لبنیات برای تولید و سرعت بخشیدن به دوره رسیدگی پنیر را نشان می‌دهد.

نتایج این پژوهش، چشم‌انداز را برای استفاده از این گیاه دارویی به عنوان جایگزین مایه‌پنیر در صنعت لبنیات ترسیم می‌کند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-09]

References

1. Farahnoodi F. Dairy Industries. Tehran :Research and Education Jahad company. 1998; 98-100 [in persian].
2. Roseiro LB, Barbosa M, Ames JM, Wilbey RA. Cheesemaking with vegetable coagulants the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. Int J of Dairy Technol. 2003;56(2):76-85.
3. Tripathi P, Tomar R, Jagannadham MV. Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. Food Chem 2011;125(3):1005-12.
4. Jacob M, Jaros D, Rohm H. Recent advances in milk clotting enzymes. Int J of Dairy Technol 2011;64(1):14-33.
5. Piero ARL, Puglisi I, Petrone G. Characterization of "Lettucine", a serine-like protease from Lactuca sativa leaves, as a novel enzyme for milk clotting. J of Agri and Food Chem 2002;50(8):2439-43.
6. Pino A, Prados F, Galán E, McSweeney PLH, Fernández-Salguero J. Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. Food Res Int 2009;42(3):3230-40
7. Dinakar P, Mathur M, Roy D. Differences in proteolytic behaviour in cheddar cheese prepared with calf and vegetable rennet. Indian J of Dairy Sci 1989;42:792-6.
8. Ghahreman A, Attar F. Biodiversity of plant species in Iran: Central Herbarium of Tehran University, Faculty of Science; 1999.p.379. [in persian].
9. Hemalatha S, Wahi A, Singh P, Chansouria J. Hypolipidemic activity of aqueous extract of Withania coagulans Dunal in albino rats. Phytotherapy Res 2006;20(7):614-7.
10. Jaiswal D, Rai PK, Watal G. Antidiabetic effect of Withania coagulans in experimental rats. Indian J of Clinical Bioch 2009;24(1):88-93.
11. Chazarra S, Sidrach L, López-Molina D, Rodríguez-López JN. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus, L.*) flowers. Int Dairy Jl 2007;17(12):1393-400.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Bioch. 1976;72(1-2):248-54.
13. Wang W, Liu QJ, Cui H. Rapid desalting and protein recovery with phenol after ammonium sulfate fractionation. Electrophoresis 2007;28(14):2358-60.
14. Laemmli U. Slab gel electrophoresis: SDS–PAGE with discontinuous buffers. Nature 1979;227:680-5.
15. Chitpinityol S, Crabbe MJC. Chymosin and aspartic proteinases. Food Chem. 1998;61(4):395-418.
16. Hashim MM, Mingsheng D, Iqbal MF, Xiaohong C. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. Phytochemistry 2011;72(6):458-64.
17. Macedo IQ, Faro CJ, Pires EM. Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus L.*) toward bovine. kappa.-casein. J Agricul Food chem 1993;41(10):1537-40.
18. Storch V, Segelcke. T. Milchforsch, Milchprax. 1874; 3:997.
19. Nájera AI, De Renobales M, Barron L. Effects of pH, temperature, $CaCl_2$ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. Food Chem 2003;80(3):345-52.
20. Fox PF. Cheese: chemistry, physics and microbiology: Aspen Pub; 1999:230-6.
21. Azarnia S, Ehsani M, Mirhadi S. Evaluation of the physico-chemical characteristics of the curd during the ripening of Iranian brine cheese. Int Dairy J 1997;7(6):473-8.
22. Ahmed IAM, Morishima I, Babiker EE, Mori N. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from Solanum dubium Fresen seeds. Food Chem. 2009;116(2):395-400.
23. Kumar A, Sharma J, Mohanty AK, Grover S, Batish VK. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (Capra hircus). 2006;145(1):108-13.
24. Tucker GA, Woods L. Enzymes in food processing, london: Springer; 1995;340-345.
25. Zentgraf B, Ahern T. Practical importance of enzyme stability. Pure & Appl Chern1991;63(10):1527-40.
26. Raposo S, Domingos A. Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from Centaurea calcitrapa cell suspension cultures. Process Biochem 2008;43(2):139-44.
27. Kumar S, Sharma NS, Saharan MR, Singh R. Extracellular acid protease from Rhizopus oryzae: purification and characterization. Process Biochem 2005;40(5):1701-5.
28. Campos R, Guerra R, Aguilar M, Ventura O, Camacho L. Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus*). Food Chem. 1990;35(2):89-97.
29. Sidrach L, García-Cánovas F, Tudela J, Neptuno Rodríguez-López J. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus L.*): enzymatic properties of cynarase A. Phytochemistry 2005;66(1):41-9.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-09]

Partial purification and characterization of milk-clotting enzyme extracted from *Withania coagulan*s fruit

*Beigomi M[1], Mohammadifar MA[*2], Ghods Rohani M[3], Hashemi M[4], Valizadeh M[5]*

1-MSc in Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*2-*Corresponding author: Associate prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, E-mail:mohamdif@ut.ac.ir*

3- Assistant Prof., Institute of Scientific – Applied Higher Education Jihad- e -Agriculture, Iran

4- Assistant Prof. Dept. of Microbial Biotechnology & Biosafety Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

5- Assistant Prof, Research Center of Medicinal and Ornamental Plant, University of Sistan and Baluchistan, Zahedan, Iran

Received 2 May, 2013 **Accepted 12 Aug, 2013**

Background and objective: Numerous attempts have been made to replace calf rennet with other milk-clotting proteases because of limited supply and high prices of calf rennet. Fruit of *Withania coagulans* (solanaceae), a medicinal plant rich in milk-cloting proteases, have been traditionally used in the south of Iran as a plant coagulant for cheese-making. No systematic study on the characterization of *W. coagulans* milk-clotting enzyme has been conducted so far. The purpose of this study was to extract, partially purify and characterize the milk-clotting enzyme from *W.coagulans*.

Materials and methods: An enzyme extract was prepared from the fruit of *W. coagulans*using using a 0.85% NaCl solution, and the milk-clotting activity and characteristics of the milk-cloting enzyme (effect of temperature, pH, enzyme concentration and thermal stability) were assessed. The extract was partially purified, and the molecular mass of the crude extract and the fractions with the highest milk-clotting activity were determined by SDS- PAGE.

Results: The optimal temperature and pH for the enzyme were 70˚C and 4, respectively. Partial purification showed that the milk-clotting activity of the enzyme purified with 50% ammonium sulphate was greater than samples purified with other ammonium sulphate solutions at other concentrations. The molecular mass of this fraction using SDS-PAGE showed two bands, namely, 66 and 29 kDa. An important characteristic of the enzyme was its excellent thermal stability; it retained 74% of its milk-clotting activity at 60˚C for 30 min.

Conclusion: It seems that *W. coagulans* proteases can be used as a suitable source of enzyme in the dairy industry as an alternative clotting agent.

Keywords: *Withania coagulans*, Extraction, Partial purification, SDS-PAGE

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-09]