(مقاله پژوهشی)

بررسی قدرت پروتئولیتیکی عصاره حاصل از پوست و گوشت پرتقال تامسون

فاطمه شریفی[1]، وحید حکیم‌زاده[2]*

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

۲-استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۱۰/۰۲

چکیده

پروتئازها جزو مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند که حدود ۶۵ درصد از سهم بازار جهانی آنزیم‌های صنعتی و حدود ۲۵ درصد از تولید کل آنزیم‌ها را به خود اختصاص داده‌اند. آنزیم پروتئاز کاربردهای زیادی در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی داراست. از طرفی استخراج ترکیبات فراسودمند از ضایعات و محصولات فرعی در صنایع غذایی می‌تواند سبب ایجاد ارزش افزوده گردد. از این‌رو در این تحقیق به بررسی قدرت پروتئولیتیکی عصاره پوست و گوشت میوه پرتقال تامسون پرداخته شد. در این تحقیق، بررسی قدرت آنزیمی عصاره‌های حاصل از پرتقال در دو دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد، با دو حلال آب و اتانول و از دو بافت پوست و گوشت در سه تکرار انجام گرفت. برای مقایسه‌ی میانگین داده ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد با نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ استفاده گردید. رسم نمودارها نیز با نرم افزار اکسل انجام شد. نتایج نشان داد که فعالیت پروتئولیتیکی عصاره‌های آبی و اتانولی در دو روش GDU و MCA تفاوت معنی‌داری داشت و میزان فعالیت پروتئولیتیکی عصاره اتانولی به طور معنی‌داری بیشتر از عصاره آبی بود. همچنین بکارگیری سطوح دمایی پایین‌تر در عصاره‌گیری از پوست پرتقال و دماهای بالاتر در عصاره‌گیری از گوشت پرتقال قدرت پروتئولیتیکی را به طور معنی‌داری افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: اتانول، پروتئاز، پرتقال، لخته‌کنندگی شیر، هضم ژلاتین.

*مسؤول مکاتبات: v.hakimzadeh@yahoo.com

۱- مقدمه

آنزیم‌ها، کاتالیزورهای بیولوژیکی در فرآیندهای متابولیسمی هستند و از نظر ساختار شیمیایی از جنس پروتئین بوده و می‌توانند با دیگر مواد آلی مانند ویتامین‌ها یا مواد معدنی همراه باشند. حضور آن ها در سوخت و ساز مواد خوراکی هنگام هضم و متابولیسم ضروری است(۲۲). از طرفی آنزیم‌ها در بهبود بازده فرآیندهای صنعتی خوراکی در زمینه های مختلف مانند استخراج، رسانیدن، تخمیر و غیره و همچنین به عنوان یک تنظیم‌کننده در واکنش‌های متابولیسمی نقش مهمی ایفا می کنند(۲۳). بعد از آمیلازها، پروتئازها مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی محسوب می‌شوند و سالانه حدود ۵۰۰ تن از این آنزیم‌ها تولید می‌شود(۱۹). پروتئازها به طور وسیعی در آب، خاک و در شرایط دشوار زیست محیطی از جمله شرایط بسیار قلیایی یافت می‌شوند(۲۶). در سالیان اخیر استخراج آنزیم‌های پروتئولیتیک از منابع گیاهی به دلیل فعالیت بالا، ثبات در طیف گسترده‌ای از pH و دما، پایداری در برابر یون‌های فلزی مختلف، مهارکننده های گوناگون و حلال‌های آلی توجه زیادی را به خود جلب کرده است(۱۲). به همین دلیل پروتئازهای گیاهی گزینه بسیار مناسبی برای صنایع غذایی، پزشکی، بیوتکنولوژی و داروسازی می‌باشد(۲۷). پروتئازها براساس جایگاه کاتالیتیکی به دو دسته پروتئازهای خارج سلولی و پروتئازهای داخل سلولی تقسیم می‌شوند. حداکثر فعالیت پروتئازهای اسیدی در pH ۲ تا ۶، پروتئازهای خنثی در pH ۶/۵ تا ۷/۵ و پروتئازهای قلیایی در pH ۸تا۱۱ است(۷). پروتئازهای مختلف از منابع حیوانی، گیاهی و میکروبی به دست می‌آیند که دارای تنوع کاربردی زیادی در صنایع غذایی هستند و برای مقاصد مختلف مانند پنیرسازی، رساندن و ترد کردن گوشت به کار می‌روند(۲۱). مطالعات بسیاری در رابطه با کاربرد پروتئازها صورت گرفته است که می‌توان به استفاده از پروتئاز پنیرباد در تولید پنیر سفید و استفاده از آنزیم فیسین در ترد کردن پروتئین‌های گوشت گاو و گوسفند اشاره کرد(۸و۲۸). امروزه برای تولید پنیر به ویژه پنیرهای محلی، استفاده از گیاهان حاوی پروتئاز به عنوان رنت گیاهی نتایج مثبتی را در برداشته است(۱۱). از مزیت‌های پروتئازهای گیاهی می‌توان به بالاتر بودن دمای بهینه فعالیت این آنزیم‌ها در مواردی که عملیات با فرایند حرارتی همراه است، اشاره کرد. علاوه بر این دلمه تولیدی با رنت گیاهی در مقایسه با رنت حیوانی، کمتر به وسیله تغییرات دما تحت تاثیر قرار می‌گیرد. این آنزیم‌ها فعالیت بهتری را نسبت به اضافه کردن کلسیم در شیر نشان می‌دهند. با به دست آوردن مقادیر بهینه آنزیم‌های استخراجی از گیاهان برای تولید پنیر می‌توان با هزینه کمتر محصولاتی با تنوع بیشتر را تولید کرد. با این حال از معایب آنزیم‌های گیاهی پروتئاز می‌توان به تولید پپتیدهای تلخ و قدرت لخته‌کنندگی نسبتاً ضعیف اشاره کرد(۲۰). در میان محصول‌های مختلف مرکبات، انواع پرتقال و نارنگی از مهم‌ترین آن‌ها به شمار می‌آیند که به همین نسبت در جهان نیز از بالاترین میزان سطح زیرکشت و تولید نسبت به سایر مرکبات برخوردارند. بررسی‌های انجام شده نشان داد که تاکنون مطالعه‌ای در خصوص استخراج و بررسی قدرت آنزیمی عصاره میوه پرتقال انجام نگرفته است اما در مطالعه‌ای در ایران پروتئاز گیاهی از میوه‌های ویتانیا کوآگولانس استخراج شد و تاثیر این پروتئاز روی پروتئولیز پنیر UF در طول رسیدن در مقایسه با کیموزین خالص و رنت قارچی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در نمونه‌های پنیر تولید شده با پروتئاز میوه ویتانیا کوآگولانس به جز pH که به طور معنی‌داری کمتر بود تفاوت معنی‌داری در محتوی رطوبت چربی و محتوای نمک در طول زمان رسیدن میان پنیرهای تولید شده با رنت‌های مختلف وجود نداشت(۲۵). پرتقال بعد از سیب دومین میوه‌ای است که در جهان مورد مصرف عموم است و با توجه به اینکه از موارد مهم و قابل توجه در صنایع خوراکی بالابردن ارزش افزوده محصولات غذایی از طریق کاربرد محصولات جانبی آن می باشد، بنابراین در این تحقیق، قدرت پروتئولیتیکی عصاره استخراجی از پوست وگوشت پرتقال تامسون مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

پرتقال تامسون از بازار محلی شهر قوچان تهیه شد. ژلاتین، اسید استیک، استات سدیم، کلرید کلسیم، اسید کلریدریک، سود و فرمالدئید ۳۷ درصد از شرکت مرک (آلمان) تهیه

گردید. پراکسید هیدروژن، الکل اتیلیک ۹۶ درصد و آب مقطر از شرکت مجللی (ایران) خریداری شد و شیر خشک بدون چربی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت پگاه خراسان بود.

۲-۲- روش عصاره‌گیری

ابتدا ۵۰ گرم پوست پرتقال با ۵۰ گرم آب مقطر (در دو دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد) بوسیله مخلوط‌کن مدل مولینکس مخلوط شد و سپس با پارچه کتانی دو بار صاف گردید. پس ازآن عصاره صاف شده تحت شرایط ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه ودمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتیریفوژ(Hermel-Z32HK ، آلمان) شد و عصاره رویی آن درون ارلنی با پوشش آلومینیومی در یخچال نگهداری گردید. عصاره‌گیری برای گوشت پرتقال نیز مشابه با همان روش انجام شد. در مرحله بعد مشابه با روش فوق بجای حلال آب از اتانول استفاده شد و عصاره‌گیری از گوشت و پوست پرتقال به صورت جداگانه انجام گرفت. حلال‌زدایی اتانول در دمای محیط و در زیر هود انجام گرفت و در نهایت نمونه‌ها به طور جداگانه درون ارلنی با پوشش آلومینیومی در یخچال نگهداری گردید(۵).

۲-۳- اندازه‌گیری فعالیت پروتئولیتیکی به روش واحد هضم ژلاتین (GDU)[1]

ابتدا ۱ میلی‌لیتر ازعصاره مورد نظر در یک بالن ۵۰ میلی‌لیتری با ۸/۳ میلی‌لیتر محلول بافری مخلوط گردید و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق با آب مقطر pH= ۴/۵ به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه هم زده شد. سپس داخل ۲ بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری ۲۵ میلی لیتر ژلاتین به صورت جداگانه ریخته و در حمام آب داغ به مدت ۵ دقیقه قرار می دهیم. پس از آن ۱ میلی‌لیتر از محلول حاوی عصاره در مرحله اول به یکی از بشرها اضافه شد و یکی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به بشر نمونه پس از ۲۰ دقیقه نگهداری در حمام آب ۴۵ درجه سانتی گراد، ۰/۱ میلی لیتر پراکسیدهیدروژن ۳ درصد اضافه شد و همزدن به مدن ۵ دقیقه دیگر ادامه یافت. سپس تا رسیدن pH محلول به ۶ به تدریج سود ۰/۱ نرمال (N) اضافه شد. برای این منظور از pH متر مدل EDT ساخت کشور انگلیس استفاده گردید. پس از رسیدن pH محلول به ۶ حدود ۱۰ میلی لیتر فرمالدهید ۳۷ درصد اضافه گردید و در نهایت تا رسیدن pH به ۹ به تدریج سود ۰/۱ نرمال به بشر اضافه و حجم آن (T) یادداشت گردید. همین مراحل نیز برای بشر شاهد نیز انجام شد و حجم سود ۰/۱ نرمال مصرفی برای آن (B) نیز یادداشت گردید و از رابطه ۱ قدرت آنزیمی آن بر اساس واحد هضمی ژلاتین بدست آمد. بر این اساس یک واحد هضمی ژلاتین مقدار آنزیمی است که بعد از ۲۰ دقیقه هضم در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد ۱ میلی‌گرم آمینو نیتروژن از محلول ژلاتین استاندارد را آزاد کند(۱۰).

$$enzyme\left(\frac{unit}{gr}\right) = \frac{(T-B)(N)\times 14\times 50}{gr\ of\ Concentrate}$$

۲-٤- اندازه‌گیری فعالیت پروتئولیتیکی به روش فعالیت لخته‌کنندگی شیر (MCA)[2]

ابتدا محلول ۱۰ درصد شیر در کلریدکلسیم ۱۰ میلی‌مولار تهیه شد و سپس pH آن روی ۶ تنظیم گردید. پس از آن ۲ میلی‌لیترآن را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد پیش تیمار داده شد و مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره مورد نظر به آن اضافه شد و در نهایت زمان ظهور اولین ذره جامد (لخته) اندازه گیری گردید. هر واحد لخته‌کنندگی شیر برابر است با مقدار آنزیمی که برای لخته کردن ۱۰ میلی‌لیتر سوبسترا در مدت ۴۰ دقیقه لازم است که از رابطه ۲ محاسبه می شود(۱۰).

رابطه(۲)

$$\mathrm{MCA}\left(\frac{Unit}{ml}\right) = \frac{2400}{clottingtime\,(Sec)} \times dilution\,factor$$

که در این رابطه زمان لخته شوندگی یا clotting time بر حسب ثانیه می باشد. ۲۴۰۰ نیز مربوط به زمان ۴۰ دقیقه بر حسب ثانیه بوده و ضریب رقت یا dilution factor در صورت سرعت بالای لخته شدن لحاظ می گردد.

1. Gelatin Digestion Unit

2- Milk Clotting Unit

۲-۵ - آنالیز آماری

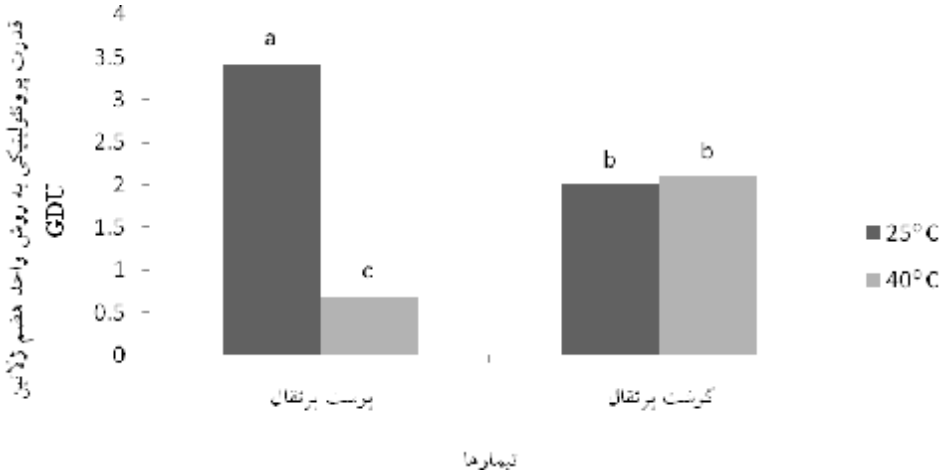
در این تحقیق، بررسی قدرت آنزیمی عصاره‌های حاصل از پرتقال در دو دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد، با دو حلال آب و اتانول و از دو بافت پوست و گوشت در سه تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSSورژن ۲۲ و برای مقایسه‌ی میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده گردید. رسم نمودارها نیز با نرم افزار اکسل انجام شد.

۳- نتایج

۳-۱- اندازه گیری فعالیت پروتئولیتیکی به روش واحد هضم ژلاتین (GDU)

۳-۱-۱- عصاره‌گیری با حلال آب مقطر

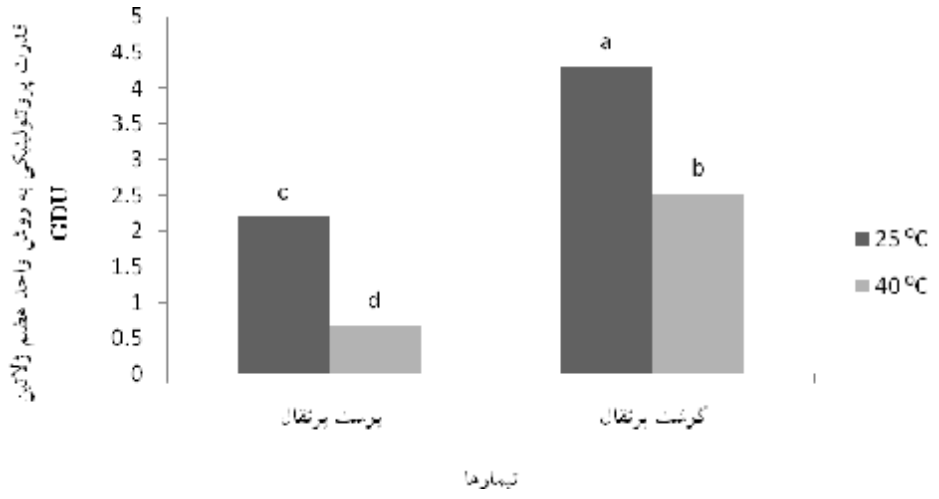
مطابق با شکل ۱، در این تحقیق، فعالیت پروتئولیتیکی عصاره‌ی پوست پرتقال در دو دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد بر اساس واحد هضم ژلاتین دارای اختلاف معنی‌داری بود (P>۰/۰۵)، بطوری که در دمای پایین‌تر قدرت پروتئولیتیکی عصاره آبی حاصل از پوست پرتقال بالاتر بود. اما فعالیت پروتئولیتیکی عصاره آبی گوشت پرتقال در دو دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد اختلاف معنی‌داری با هم نداشت (P> ۰/۰۵).



شکل ۱- تاثیر دما و نوع بافت میوه پرتقال بر قدرت پروتئولیتیکی عصاره آبی به روش GDU

۳-۱-۲- عصاره‌گیری با حلال اتانول

نتایج نشان داد فعالیت پروتئولیتیکی عصاره اتانولی پوست و گوشت پرتقال در دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (P> ۰/۰۵)، به طوریکه عصاره های استخراجی در ۲۵ درجه سانتی گراد فعالیت پروتئولیتیکی بالاتری را بر اساس واحد هضم ژلاتین نشان داد. اما در کل عصاره حاصل از گوشت پرتقال قدرت پروتئولیتیکی بالاتری نسبت به پوست از خود نشان داد (شکل۲).

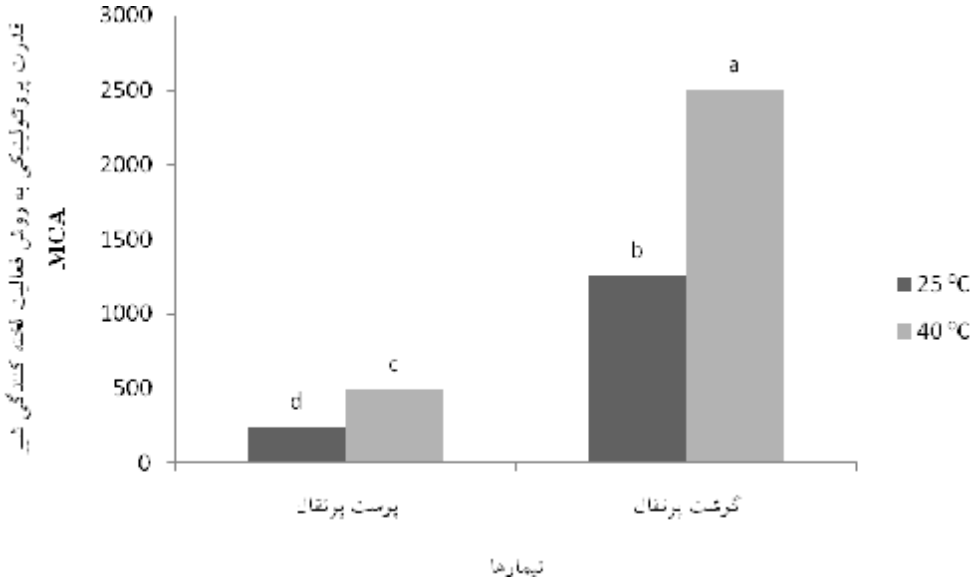


شکل ۲- تاثیر دما و نوع بافت میوه پرتقال بر قدرت پروتئولیتیکی عصاره اتانولی به روش GDU

۳-۲- اندازه‌گیری فعالیت پروتئولیتیکی به روش فعالیت لخته‌کنندگی شیر (MCA)

۳-۲-۱- عصاره‌گیری با حلال آب مقطر

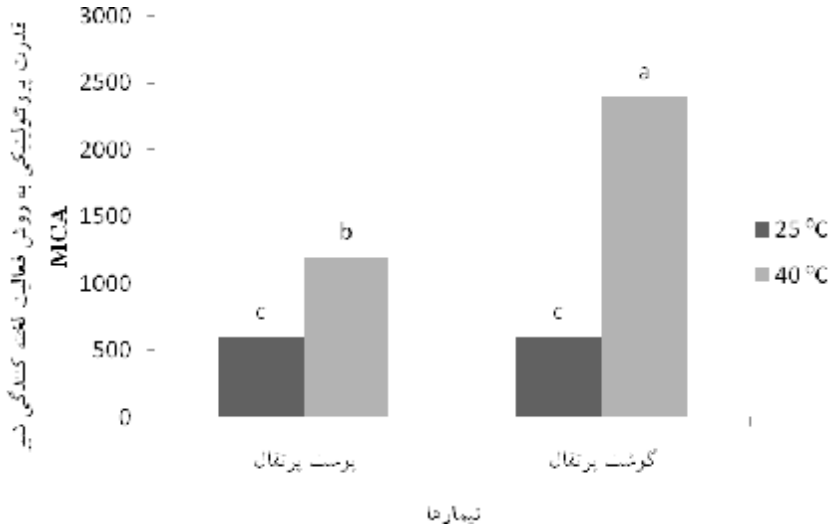
با توجه به شکل ۳، فعالیت پروتئولیتیکی عصاره آبی بر اساس روش فعالیت لخته‌کنندگی شیر هم در پوست پرتقال و هم در گوشت آن در دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان داد. اما در این روش برخلاف روش هضم ژلاتین، عصاره های حاصل در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد نسبت به دمای ۲۵ درجه فعالیت پروتئولیتیکی بالاتری داشت.



شکل ۳ -تاثیر دما و نوع بافت میوه پرتقال بر قدرت پروتئولیتیکی عصاره آبی به روش MCA

۳-۲-۲- عصاره‌گیری با حلال اتانول

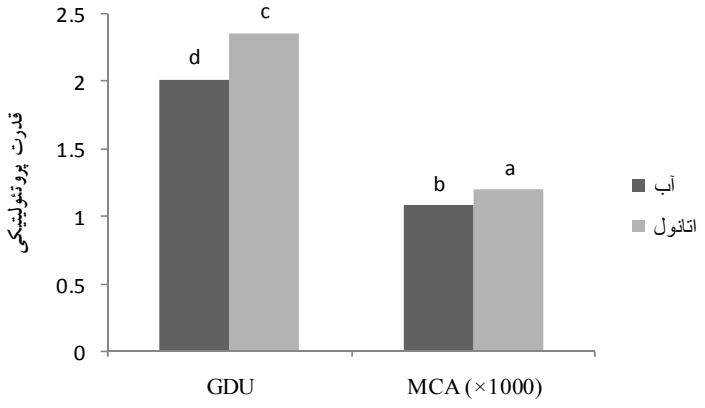
بر اساس شکل ۴ نتایج حاکی از آن بود که فعالیت پروتئولیتیکی عصاره اتانولی به روش فعالیت لخته‌کنندگی شیر در پوست پرتقال در دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری در سطح ۵درصد داشت و مشابه با حلال آبی دمای بالاتر در عصاره گیری با اتانول قدرت پروتئولیتیکی بیشتری را سبب گردید.



شکل ٤ - تاثیر دما و نوع بافت میوه پرتقال بر قدرت پروتئولیتیکی عصاره اتانولی به روش MCA

۳-۳-مقایسه قدرت پروتئولیتیکی عصاره های آبی و اتانولی به دو روش GDU و MCA

مقایسه کلی فعالیت پروتئولیتیکی عصاره استخراج شده با آب و اتانول بر اساس دو روش هضم ژلاتین و انعقاد شیر را می توان در شکل ۵ مشاهده کرد که بر اساس آن قدرت عصاره بدست آمده با اتانول به هر دو روش با اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد بیشتر از عصاره آبی بود.



شکل ۵- مقایسه کلی قدرت پروتئولیتیکی عصاره‌های آبی و اتانولی به دو روش GDU و MCA

۳-٤- بحث

تفاوت قدرت پروتئولیتیکی عصاره حاصل از پرتقال تامسون در دماهای مختلف را می توان بر اساس یافته های زیر به بحث گذاشت. در تحقیق جامعی که علیرضایی و همکاران در مورد فعالیت پروتئولیتیکی اکتینیدین[1] در مقایسه با کیموزین[2] و فیسین[3] در شیر گاو انجام دادند مشخص شد که فعالیت بیشینه لخته‌کنندگی فیسین و اکتینیدین در ۴۵ درجه سانتی‌گراد بود، اگرچه کیموزین حساسیت کمتری به دما داشت(۳). بدوی و همکاران (۱۳۹۴) گزارش کردند که آنزیم پروتئاز میکروبی مقاوم به شوینده که از باسیلویس پومیلوس[4] استخراج گردید بیشترین فعالیت را در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد اما فعالیت پروتئازی آن به تدریج از دمای ۴۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. اگرچه این آنزیم در دماهای ۳۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۶۷ و ۵۳ درصد فعالیت خود را حفظ کرد اما بهینه فعالیت آن در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد گزارش شد(۴و۱۳). جو[5] و همکاران (۲۰۰۵) نیز یک پروتئاز قلیایی را از باسیلوس کلاوسی[6] با دمای بهینه حدود ۵۰-۴۵ درجه سانتی‌گراد شناسایی و استخراج کردند(۱۴و۶). همچنین کاتیرسان[7] و همکاران (۲۰۰۷)، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد را دمای بهینه و مناسب برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی معرفی کردند(۱۵). در سال ۲۰۰۸ احمد[8] و همکاران نیز، بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از استرپتومایسس آورمکتینوس[9] را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده کردند(۲). در تحقیقاتی که عبدالواحد[10] و همکاران (۲۰۱۴)، روی استرپتومایسس آمبوفاسینس[11] انجام دادند بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی را در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند(۱). با این حال بیگمی و همکاران (۱۳۹۲)، طی تحقیقات خود گزارش کردند که زمان انعقاد شیر توسط عصاره میوه گیاه پنیرباد با افزایش دما تا ۷۰ درجه سانتی گراد به طور قابل توجهی کاهش می یابد که تقریبا ۹ برابر کمتر از زمان انعقاد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بود. کومار[12] همکاران (۲۰۰۶) نیز حداکثر دما برای فعالیت انعقاد آنزیمی پروتئیناز استخراج شده از رایزوپوس اوریزا[13] را دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند. این آنزیم سریعاً در ۷۰ درجه سانتی گراد غیرفعال می شود(۱۶و۱۷). در مورد تاثیر نوع حلال در استخراج عصاره پروتئولیتیکی می توان به نتایج بدوی و همکاران (۱۳۹۴) اشاره کرد. این محققین در بررسی های خود نشان دادند که پایداری آنزیم های پروتئولیتیک در حلال های آلی مانند متانول، تولوئن و کلروفرم نسبت به نمونه های شاهد ۶۰ تا ۹۰ درصد پایداری خود را حفظ می کند(۴و۲۴). تفاوت در قدرت پروتئولتیکی قسمت های مختلف یک گیاه را می توان در تحقیقات لوه[14] و همکارانش در سال ۲۰۰۵ که بر روی فعالیت پروتئولتیکی عصاره آناناس بود جستجو کرد. نتایج این محققین نشان داد که قدرت پروتئولتیکی میوه آناناس نسبت به سایر قسمت های گیاه بیشتر است که دلیل آن در پژوهش این محققین وابستگی بین محتوی پروتئین و فعالیت پروتئولیتیکی عنوان شد(۹و۱۸).

٤- نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که فعالیت پروتئولیتیکی عصاره‌های استخراج شده با حلال آب و اتانول به دو روش GDU و MCA تفاوت معنی‌داری با هم دارد. به طوریکه میزان فعالیت پروتئولیتیکی عصاره اتانولی به طور معنی‌داری بیشتر از عصاره آبی بود ($p>0/05$). همچنین بکارگیری دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در عصاره‌گیری از پوست پرتقال و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در عصاره‌گیری از گوشت پرتقال تامسون منجر به استحصال عصاره ایی با قدرت پروتئولیتیکی بالا شد. به طور کلی عصاره پروتئولیتیکی گوشت پرتقال تامسون از پوست آن بالاتر بود.

1- Actinidin
2- Chymosin
3- Fisin
4- Bacillus pumilus
5- Joo
6- bacillus clausii
7- Kathiresan
8- Ahmed
9- streptococcus overmactinus
10- Abdelwahed
11-Streptomyces ambofaciens
12- Kumar
13- Rhizopus oryzae
14- Loh

۵- منابع

1. Abdelwahed, NAM., Danial, EM., Elnaggar, NE. and Mohamed, AA. 2014. Optimization of alkaline protease production by Streptomyces ambofaciens in free and immobilized form Ame J of Biochem and Biotech, 10(1): 1-13.
2. Ahmed, SA., Aldomany, RA., Elshayeb, NMA., Radwan, HH. and Saleh, SA. 2008. Optimization immobilization of extracellular alkaline protease and characterization of its enzymatic properties. *Res J of Agri and Bio Sci*, 4(5): 434-446.
3. Alirezai, M., Aminliri, M., Gheisari, H. and Tavana, M. 2011. Actinidin: A promising milk coagulating enzyme. *European journal of Food Research and Review*, 1(2):43-51,201.
4. Badowei Delfard, A., Ameri, P., Karmi, Z., Ghanbary, B. and Alipour, B. 2015. Isolation and biochemical characterization of detergent stable protease from Bacillus pumilus. *Biotechnology Tarbiat Modares University*, 6(1): 50-60.
5. Bahl, V., Kapoor, P., Tyagi, P. and Kameshwar Sharma, YVR. 2013. Enzymatic determination of Catechol oxidase and Protease from fruits (orange, apple) and vegetables (carrot, tomato). *Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 5 (5): 29-35.
6. Bajaj, BK. and Gaytri, J. 2013. Thermostable alkaline protease production from *Bacillus pumilus* D-6 by using agro-residues as substrates. Adv. Enzyme Res, 1: 30-36.
7. Beheshti Maal, K., Emtiazi, G. and Nahvi, I. 2009. Production of alkaline protease by *Bacillus cereus* and *Bacillus polymixa* in new industrial culture mediums and its immobilization. *African Journal of Microbiology Research*, 3 (9): 491- 97.
8. Beigomi, M., Mohammadifar, MA., Ghods Rohani, M., Hashemi, M. and Valizadeh, M. 2013. Partial purification and characterization of milk-clotting enzyme extracted from withania coagulans fruit. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*,8(2): 31-40.
9. Dastur, NN., Sastry, K. and Venkatappiah, D. 1984. Preparation of vegetable rennet from Withania Coagulans Dunal, Indian Dairy Research Institute, Bangalore.Enzyme Development Corporation.
10. Esteves, CL., Lucey, JA., Hyslop, DB. and Pires, EMV. 2003. Effect of gelation temperature on the properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin, *Int Dairy J*, 13: 300-335.
11. Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A. and Nasri, M. 2009. Two detergent stable alkaline serine- proteases from Bacillus mojavensis A21: Purification, characterization and potential application as a laundry.
12. Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H. and Zhang, Y. 2003. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from Bacillus pumilus. *Curr. Microbiol*, 46:169-173.
13. Joo, HS. and Chang, CS.2005. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halotolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. *J. Appl. Microbiol*, 98: 491-497.
14. Kathiresan, K. and Manivannan, S. 2007. Production of alkaline protease by *Streptomyces* sp. isolated from coastal mangrove sediment. *Res J of Env Sci*, 1(4): 173-178.
15. Kumar, A., Sharma, J., Mohanty, AK., Grover, S. and Batish VK. 2006. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (Capra hircus). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 145(1):108-13.
16. Kumar, S., Sharma, NS., Saharan, MR. and Singh, R. 2005. Extracellular acid protease from Rhizopus oryzae: purification and characterization. *Process Biochem*, 40(5):1701-5.
17. Loh pei shian, M., Nur, A., Ting, L., Taher, M. and Fadzilah, AAM. 2008. Pilot scale extraction proteolytic enzyme bromelain from pineapple (*Annas Comosus*) Chemical and Natural Resources Engineerin.

18. Lyons, LP. 1992. Biotechnology in the feed industry, Proceeding of Alltech's Eighth Annual Symposium. Alltech Technical Pub. Nicholasville, Kentucky 40356.
19. Mashishki, F. 2012. Effect of using the herb cheeses in Iran with the aim of improving the dairy industry's economy and supporting domestic production. National Conference on Achieving Sustainable Development in Agriculture, Natural Resources and the Environment.
20. Mathur, D., Agrawal, RC. and Shrivastava, V. 2011. Phytochemical screening and determination of antioxidant potential of fruits extracts of withania coagulants. *Science and Technology*, 3: 26-29.
21. Moharrery, E. 2003. Application of enzymes in livestock and poultry feeding. Second Seminar on the New Technology of Feed Production, Poultry and Aquaculture, 1st November. Tehran, Iran.
22. Moharrery, A., Hvelplund, T., Weisbjerg, MR. and Madsen, J. 2007. The effect of addition of an exogenous enzyme at ensiling or at time of incubation on nutrient availability in forages. Proceedings of the 2nd Joint TSAP/TVA Scientific Conference held at AICC Arusha Tanzania from 29th Nov. to 1st Dec. 6 p.
23. Olajuyigbe, F.M. and Ehiosun, K.I. 2013. Production of thermostable and organic solvent tolerant alkaline protease from *Bacillus coagulans* PSB-07 under different submerged fermentation conditions. Afri. *J. Biotechnol.* 12: 3341-3350.
24. Pezeshki, A., Hesari, J., Ahmadi Zonoz, A. and chambarzadeh, B. 2011. Influence of Withania coagulans protease as a Vegetable Rennet on Proteolysis of Iranian UF White Chees, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13:567-576.
25. Rachadech, W., Navacharoen, A., Ruangsit, W., Pongtharangkul, T. and Vangnai, A. 2010. An organic solvent, detergent, and thermostable alkaline protease from the mesophilic, organic solvent-tolerant Bacillus licheniformis 3C5. *Mikrobiologiia* 79: 620- 629.
26. Rai, SK. and Mukherjee, AK. 2009. Ecological significance and some viotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from Bacillus subtilisstrain DM-04 Bioresour Techology, 100: 2642-2645.
27. Shekarforoush, SS., Aminlari, M. and Sabbagh, N. 2009. Comparative studies on the effect of the Enzyme Ficin on the solubility and Electrophoretic pattern of ovine and bovine Meatproteins. *J.Vet.Res*, 64 (1): 1-6.

(Original Research Paper)

Investigating the Proteolytic Activity of Peel and Meat Thomson Orange

Fatemeh Sharifi[1], Vahid Hakim Zadeh[2*]

1- M.Sc. Student Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

Received:04/02/2018 Accepted:23/12/2018

Abstract

Proteases are among the most important industrial enzymes, accounting for about 65% of the world market for industrial enzymes and about 25% of total enzymes production. The proteases have many applications in various industries, including food industry. The extraction of functional compounds from waste and by-products in the food industry can create added value. Therefore, in this research, the proteolytic power of orange fruit extracts (peel and flesh) was studied by the methods of gelatin digestion unit (GDU) and milk cloning activity (MCA) with two water and ethanol solvents at 25 and 40°C. The comparing the mean of data was performed using SPSS 22 software and Duncan's multiple domain tests were used at 95% probability level. Charts were also done with Excel software. The results showed that the proteolytic activity of aqueous and ethanolic extracts was significantly different in both GDU and MCA methods, and the proteolytic activity of the ethanolic extract was significantly higher than that of the aqueous extract. Also, application of lower temperature levels in extraction of orange peel and higher temperatures in extraction of orange meat significantly increased proteolytic activity.

Keywords: Ethanol, Gelatin Digestion, Milk Clotting, Orange, Protease.

*Corresponding Author: v.hakimzadeh@yahoo.com