كفاءة استخدام بعض المستخلصات النباتية في تخثير كازئين الحليب

داليا الكسار*، عادل محيو، محمود عبد الكريم*****

الملخص

أدى انخفاض توافر وزيادة أسعار المنفحة الحيوانية الى جانب الطلب العالمي المتزايد على انتاج الجبن الى البحث عن بدائل متاحة للتخثر مثل المستخلصات النباتية، لذلك كان الهدف الرئيسي من هذا البحث دراسة فعالية مستخلصات كل من بذور نبات عباد الشمس وأوراق التين وأزهار الخرشوف البري وثمار الكيوي في تخثير كازئين الحليب. تم تحضير عدة محاليل منظمة مختلفة من حيث التركيب والتركيز ورقم الحموضة pH لاختيار الأفضل منها كركيزة مع كل مستخلص من حيث كفاءته في تخثير الكازئين عند درجة حرارة 45 م°. بينت النتائج أن محلول خلات الصوديوم المنظم بتركيز 50 ميليمول ورقم pH = 5 والمحتوي على 5% من كلوريد الصوديوم ونسبة استخلاص 3:10 (وزن: حجم) وبزمن استخلاص 24 ساعة هو الأفضل بالنسبة لبذور عباد الشمس، ومحلول فوسفات الصوديوم المنظم بتركيز 50 ميليمول ورقم pH = 7 والمحتوي على 2% من كلوريد الصوديوم وبنسبة استخلاص 3:10 (وزن: حجم) وزمن 24 ساعة الأفضل بالنسبة لأوراق التين، ومحلول حمض الستريك بتركيز 100 ميليمول ورقم pH= 3.5 وبنسبة استخلاص 1:10 (وزن: حجم) وزمن 24 ساعة الأفضل بالنسبة لنبات الخرشوف، وكان الماء المقطر بنسبة استخلاص 1:2 (وزن: حجم) وزمن استخلاص ساعتين هو الأفضل بالنسبة لثمار الكيوي حيث بلغت قيم الفعالية التخثيرية (52.74 ، 39.5، 190.47، 41.30) وحدة/مل لكل من مستخلصات بذور عباد الشمس وأوراق التين وأزهار الخرشوف البري وثمار الكيوي على التوالي.

الكلمات المفتاحية: منفحة، محلول منظم، مستخلصات نباتية، كازيئين الحليب، فعالية التخثير.

* طالبة دراسات عليا (دكتوراه)، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة جامعة حلب daliaalkasr@gmail.com
**أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة جامعة حلب adelmeheo@gmail.com
***مدرس، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة جامعة حلب mahmoud_abdulkareem@alepuniv.edu.sy

ورد للنشر بتاريخ: 2026/1/28
قبل للنشر بتاريخ: 2026/4/1

Efficiency of Using Some Plant Extracts in Milk Casein Coagulation

Dalia El-Kassar*, Adel Mahyou, Mahmoud Abdel-Karim*****

Abstract

The decreased availability and rising prices of animal rennet, coupled with the growing global demand for cheese production, have led to the search for alternative coagulants, such as plant extracts. The primary aim of this study was to evaluate the effectiveness of extracts from sunflower seeds, fig leaves, wild artichoke flowers, and kiwi fruits in coagulating milk casein. Several solutions with varying compositions, concentrations, and pH levels were prepared to select the optimal ones for each extract, based on their ability to coagulate casein at 45°C. The results showed that the optimal solution for sunflower seed extract was a sodium acetate buffer at a concentration of 50 mM, pH = 5, containing 5% sodium chloride, with a 3:10 (w:v) extraction ratio and an extraction time of 24 hours. For fig leaves, the best solution was a sodium phosphate buffer at a concentration of 50 mM, pH = 7, containing 2% sodium chloride, with a 3:10 (w:v) extraction ratio and a 24-hour extraction time. For wild artichoke, the optimal solution was a citric acid solution at 100 mM concentration, with a pH of 3.5, a 1:10 (w:v) extraction ratio, and a 24-hour extraction time. For kiwi fruit, distilled water with a 1:2 (w:v) extraction ratio and an extraction time of two hours was found to be the most effective. The coagulation efficiencies were found to be 52.74, 39.5, 190.47, and 41.30 units/mL for sunflower seed, fig leaf, wild artichoke, and kiwi fruit extracts, respectively.

Keywords: Rennet, Buffer Solution, Plant Extracts, Milk Casein, coagulation efficiency.

* Graduate student (PHD), Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, University of Aleppo
** Professor, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, University of Aleppo
*** Lecturer, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, University of Aleppo

1-المقدمة والدراسة المرجعية

تحتل المنافح مكانة مهمة وأساسية في مجال تكنولوجيا صناعة الأجبان، يعد اختيار عامل تخثر مناسب هو أمر بالغ الأهمية بسبب تزايد الطلب العالمي على الأجبان، وعدم كفاية العرض من المنفحة الحيوانية. قد بذلت العديد من الجهود لتطوير بدائل جديدة ومناسبة عن المنفحة الحيوانية وهي المخثرات النباتية أو الميكروبية، كما شهدت صناعة الأجبان تطوراً كبيراً وأدخلت فيها تقنيات عالية لتحويل كميات هائلة من الحليب يومياً الى الجبن بأنواعه المختلفة، وتلبية للطلب المتزايد على إنتاجه بدأ التوجه الى محاولات ايجاد بدائل عن المنفحة الحيوانية. وقد وفر البروتييز الميكروبي والكيموسين (Chymosin) جزءاً من هذا الطلب ولكن نظراً للأسباب الأخلاقية والدينية والثقافية كانت المصادر الطبيعية هي الأفضل، حيث تركز الاهتمام مؤخراً على استعمال البروتييز النباتي كبديل عن المنفحة وقد طبق ذلك بنجاح ولاقى القبول وأدى الى زيادة قيمة بعض الأجبان المنتجة في العالم (Chazarra *et al.*, 2007).

يتضمن انتاج الجبن كخطوة أساسية استخدام الكيموسين أو البروتييز الشبيه به من أجل احداث خثرة في الحليب حيث يشكل كازئين الحليب شبكة هلامية تحتجز بداخلها الدهن واستخدم لهذا الغرض الكيموسين البقري واستخدمت بنجاح أيضاً أنزيمات بروتييز أخرى من مصادر حيوانية وميكروبية ونباتية، وقد بُذلت جهود عديدة لمقارنة بعض الخصائص الريولوجية والحسية للمنتجات النهائية الناتجة عن استخدام بعض المنافح النباتية والحيوانية (Ben Amira *et al*., 2017).

أثبتت بدائل المنفحة الميكروبية والمعدلة وراثياً أنها بدائل مناسبة للمنفحة الحيوانية، في نفس الوقت كان هناك اهتمام متزايد نحو عملية التخثر النباتي، أي استخدام إنزيمات تخثر الحليب مستخرجة من النباتات. ووفقًا لـ(Tamer and Mavituna,1997) توجد هذه الإنزيمات في جميع أنواع الأنسجة النباتية تقريباً ويبدو أن هناك قاعدة عامة تقول إن جميع الإنزيمات المحللة للبروتين لديها القدرة على تخثر الحليب في ظل الظروف المناسبة، وتنتمي جميع الإنزيمات المستخدمة تقريباً كمخثرات للحليب إلى بروتييز الأسبارتيك (الذي يحتوي على الحمض الأميني الأسبارتيك في موقعه النشط)، كما تم أيضاً استخدام إنزيمات من مجموعات أخرى تحتوي على السيستين والسيرين في مواقعها النشطة (Shah *et al*., 2014). يتم الحصول على أنزيمات البروتييز النباتية من أنسجة النبات المختلفة بما في ذلك الثمار، الأزهار، السوق، العصارة اللبنية وغيرها وهي ذات خصائص محفزة لإنتاج الجبن ضمن ظروف مثالية ومتنوعة من الـpH ودرجة الحرارة، وأنزيمات البروتييز لها القدرة على تسريع عملية التخثر وكذلك تقليل وقت الانضاج في الأجبان الجافة من خلال تحلل البروتينات خلال وقت قصير (Roseiro *et al*., 2003).

اجتذب التركيز العالي من البروتييز في بعض أجزاء النبات اهتمام الباحثين والقطاعين الصناعي والصيدلاني، وقد ازداد مؤخراً تقييم عمليات الاستخلاص والتنقية والتوصيف واستقرار تركيز المستحضرات الأنزيمية المتحصل عليها من النبات والمستخدمة في صناعة الأجبان. ويعتبر توحيد واستقرار تركيزها على

شكل سائل أو مسحوق أمراً ضرورياً لتسويقها ولتطبيقاتها الصناعية، ورغم وفرتها في الطبيعة لكنه يجب النظر الى المعايير الأخرى لاستخدامها. وعموماً تتطلب بعض البروتيزات وحتى منفحة العجل الحيوانية أو الكيموسين المصنع (المعاد تركيبه) قبل تنقية وتوحيد عملية الحصول عليها، خطوات اضافية لتفعيلها (تنشيطها) أو اعادة خطوات تركيزها لاستخلاص الأنزيم بشكله الوظيفي (Gasser *et al.*, 2008). هذه البدائل المشتقة من النباتات ذات قيمة كونها متاحة بشكل غير محدود وهناك العديد من النباتات التي تمت الإشارة اليها على أنها تنتج فعالية تخثرية واعدة كالبابين papain من الباباظ papaya والبروميلين bromelain من الأناناس pineapple والزنجبين zingibain من الزنجبيل ginger والأكتينيدين actinidin من الكيوي kiwi والفيسين Ficin من التين Ficus sp والكاردوسين Cardosins من أزهار الخرشوف Cynara sp والكوكوميسين cucumisin من البطيخ melon (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013). كما استخدمت المخثرات النباتية المستخلصة من مسحوق بذور العصفر الخالي من الدهن، إضافة للعصارة المستخلصة من الأوراق الطرية لنبات الديباج Calotropis Procera الكالوتروبين(Calotropin) في تخثير الحليب والحصول على جبن طري (مصطفى عبد الرحمن، 2013; حسن الشراجي وآخرون، 2009). وتم بنجاح استخدام المخثر المستخرج من المستخلص المائي لبذور نبات عباد الشمس ونبات الألبيزيا في تصنيع الجبن الدمياطي في مصر (Darwish, 2016). كما أجريت دراسة على مستخلصات البذور الزيتية (الكتان Linum usitatissimum، العصفر Carthamus tinctorius، السمسم Sesamumindicum وعباد الشمس Helianthus annuus) لتحديد خصائصها في تخثر الحليب عند درجات حرارة مختلفة واستخدامها في صناعة الجبن وقد أثبتت مستخلصات بذور السمسم وعباد الشمس أهميتها بشكل خاص وكانت مماثلة لتلك التي تم الحصول عليها باستخدام المنفحة الحيوانية. ويمكن اعتبارها بدائل محتملة لها(Liburdi *et al.*, 2022) . تحتوي أزهار أنواع مختلفة من نبات الخرشوف Cardoon على كمية عالية من أنزيمات البروتييز المخثرة للحليب الكاردوسينات cardosins والسينارازات cynarases وهي مشابهة في خصائصها التحفيزية للكيموسين وتنتمي لنفس مجموعته أنزيمات البروتييز الحمضية (EC. 3.4.23) aspartic proteinase لذلك اعتبرت أنزيمات البروتييز الأكثر ملائمة لصناعة الأجبان. ويمثل استخدام المخثرات النباتية في بلدان البحر الأبيض المتوسط عرفاً لإنتاج الأجبان التقليدية وتعد مستخلصات أزهار الخرشوف من أكثر الحالات نجاحاً(Yegin and Dekker, 2013) .

تتأثر كفاءة المخثرات بعوامل عديدة مثل اختلاف التركيز والتوزع البيئي والموسم والمرحلة الفيزيولوجية لذلك يتم النظر في عدة استراتيجيات لتوحيد عملية الحصول على المستحضرات الأنزيمية وقد تم تطوير العديد من الاستراتيجيات لتحسين استخلاص الأنزيمات المحللة للبروتين وتنقيتها وزيادة ثباتيتها، وهناك بعض العوامل التي يجب مراعاتها أثناء ذلك: نوع المحلول المنظم (Buffer solution) المستخدم للاستخلاص (مثل طبيعته الكيميائية، ورقم الحموضة pH، والقوة الأيونية) ودرجة الحرارة وزمن الاستخلاص اضافة الى الخصائص البيوكيميائية للبروتييز (Mazorra-Manzano *et al.*, 2018).

يعد استخلاص المستحضرات النباتية المخثرة السائلة من بعض المصادر النباتية بسيط ومنخفض التكلفة وعادة ما تكون ملائمة للتوزيع في الأسواق المحلية ويكون توزعها في الحليب أكثر تجانساً وذات كفاءة في عملية تخثر الحليب ولكنها أكثر حساسية من حيث تغير صفاتها الطبيعية بسبب الحرارة وتغيرات pH

والتحلل البروتيني والفساد الميكروبي ولهذا السبب تضاف العديد من الاضافات الغذائية والمواد الحافظة إليها لتجنب فقدان نشاط الأنزيم. ومن بعض المواد الحافظة المضافة لإطالة عمرها التخزيني كلوريد الصوديوم والمواد الكيميائية المنظمة لدرجة الحموضة والمواد المثبتة (جلايكول – جليسيرول – سوربيتول) (Harboe *et al.*, 2010). المخثرات النباتية التي تكون على شكل مسحوق هي مناسبة تماماً للشحن في درجات الحرارة الدافئة ولمسافات طويلة، ان تجفيد (التجفيف بالتجميد)(Freeze-drying) المستحضرات الأنزيمية السائلة يحسن من ثباتية الأنزيم ويطيل فترة صلاحيته ويحافظ على نشاطه بشكل أفضل ولا يؤدي الى تغييرات واضحة في التركيب وقد بينت الدراسة أن مسحوق البروتييز المجفد المستخلص من نبات الخرشوف البري (C. cardunculus) لم يظهر تغيرات كبيرة في فعاليته المخثرة وتحسنت نوعيته الميكروبية وكان ثابتاً تجاه ظروف التخزين لمدة سنة واحدة.(Tejada *et al.*, 2008)

تستطيع المستخلصات الأنزيمية بما لديها من كمية كافية من أنزيمات التحلل البروتيني أن تجبن الحليب تحت الشروط المثلى لفعالية الأنزيم وتكون الآلية الأنزيمية المجبنة للحليب في معظم الحالات مشابهة للكيموسين اذ تتحلل مائياً الرابطة الببتيدية PHe_{105}-Met_{106} في جزيء بروتين الكازئين الغروي (κ-CN و-κ casein) يؤدي هذا التفاعل الإنزيمي الى إطلاق الجزء الأليف للماء المعروف باسم غليكوماكروببتيد Glycomacropeptide (f 106-169) الواقع على سطح جزيء الكازئين الغروي مما يسبب في انخفاض الكهرستاتية (الكهرباء الساكنة) وقوى التنافر الفراغي بين الأجزاء الغروية مؤدية الى تجميع الكازئين وتشكل الخثرة (Jacob *et al.*, 2011). تعد فعالية تخثير الحليب(Milk-clotting activity (MCA مؤشراً هاماً لتقييم المستحضرات الأنزيمية المستخدمة في صناعة الأجبان، حيث يقيس قوة المنفحة وقدرتها على تخثر كمية من الحليب خلال 40 دقيقة عند درجة حرارة مرجعية (32–35 م°) وذلك باستخدام الحليب المقشود القياسي كمادة أولية (ركيزة التفاعل)، تتطلب الاختلافات في الشروط المثلى اللازمة (الـpH ودرجة الحرارة) لفعالية MCA بين أنزيمات البروتييز النباتية اجراء مقارنة مع الكيموسين القياسي وباتباع نظام موحد، ولتقييم فعالية تخثر الحليب في مستخلص نباتي جديد يجب أن يكون قادراً على تحويل الحليب الى خثرة خلال زمن مناسب (40 –60 دقيقة) ولديه خصوصية مماثلة للكيموسين(Harboe *et al.*, 2010)

في دراسة أجراها (Egito *et al.*, 2007)، تم تقييم الفعالية النوعية (Specific activities) للمستخلصات الخام (Crude extracts) التي تم الحصول عليها من بذور نبات عباد الشمس Helianthus annus وبذور نبات الألبيزيا Albizia lebbeck، حيث أظهرت قيمًا منخفضة جدًا بلغت10^{-3}× 156 وحدة/ملغم (U/mg) لمستخلصات الألبيزيا و 5.8×10^{-3} وحدة/ملغم (U/mg) لمستخلصات بذور عباد الشمس.

أظهرت إنزيمات البروتييز المستخلصة من أزهار نبات الخرشوفCynara cardunculus كفاءة عالية في تخثر الحليب تحت ظروف محددة في دراسة أجراها (Alavi & Momen, 2020) وبالمقارنة مع الكيموسين، كان لمادة التخثر المستخلصة من نبات الخرشوف نسبة MCA/PA أعلى.

بلغت الفعالية النوعية المخثرة للبروتيزات المحتوية على السيستين (Cysteine proteinases) في المستخلصات الخام لكل من الكيوي وجذور الزنجبيل والبطيخ $U\ mg^{-1}$ (2.7, 2.3, 1.5) على التوالي. وقد اعتمدت الفعالية التخثيرية لهذه المستخلصات على درجة الحرارة حيث تم الحصول على أعلى نشاط عند درجة

حرارة أعلى من 40 مº .(Moreno-Hernndez *et al*., 2017)، كما بلغت الفعالية النوعية للمستخلص الخام لأوراق التين باستخدام محلول استخلاص Tris-HCl 93.48 وحدة/ملغم (حميد جابر وآخرون، 2014)

تتفق الدراسات على أن نسبة نشاط تخثر الحليب (MCA) إلى النشاط التحليلي للبروتين (PA) MCA/PA هي المعيار الحاسم في تقييم صلاحية أي مخثر نباتي للتخثير، فعندما يكون الانزيم ذو MCA/PA مرتفعة يعني ذلك تخثر فعال وزمن تجبن مقبول (≥ 40–60 دقيقة) وخثرة متماسكة وعائد جبن جيد وتحلل بروتيني محدود أثناء التصنيع، وبالتالي قلة المرارة والعيوب القوامية (Nicosia *et al.*, 2022)

أظهرت بعض المستحضرات الأنزيمية الخام المجبنة للحليب مقارنة مع أنزيمات البروتييز المنقاه جزئياً ذات المصدر النباتي تركيباً أكثر تعقيداً مما يؤدي الى انخفاض نسبة نشاط تخثر الحليب الى النشاط التحللي للبروتين (MCA/PA)، لذا فإن كفاءة تخثر الحليب بانزيمات البروتييز النباتية تتأثر بوجود ونشاط بروتيزات مختلفة، فالتحلل المائي للكازيئينات غير k-CN يمكن أن يؤثر في مردود الجبن والخصائص الوظيفية للخثرة الناتجة، تفاعلات التحلل المائي غير النوعية قد تؤدي الى تحلل بروتيني مفرط رغم أنه من الممكن أن تعطي هذه الخصائص جاذبية لبعض أنواع الأجبان نظراً لتطور نكهات الجبن و/ أو تسريع انضاجه (Delgado *et al.*, 2010). بالإضافة الى نوع أنزيم التحلل البروتيني ودرجة تعقيد المستحضرات الأنزيمية هناك العديد من العوامل التي تؤثر في عملية تخثر الحليب مثل تركيز الأنزيم، رقم pH، درجة الحرارة، شوارد الكالسيوم والأملاح وغيرها من العوامل الأخرى. أظهرت غالبية أنزيمات البروتييز النباتية قيم في نسبة MCA/PA أقل من الكيموسين ولكن بعض النباتات مثل أزهار .Cynara sp وحبات .Solanum sp والعصارة اللبنية لـ .C procera لديها قيم لنسبة MCA/PA مشابهة للكيموسين.(Chávez-Garay *et al.*, 2016)

2–أهمية البحث والهدف منه:

نظراً لندرة توفر كميات كافية من المنفحة الحيوانية وحتى الميكروبية لتلبية الطلب عليها في مجال صناعة الأجبان وارتفاع أسعارها، ووجود قرائن عديدة على امتلاك عدد كبير من النباتات لأنزيمات مخثرة للحليب وإمكانية الحصول عليها بأسعار مناسبة فقد هدف البحث الى:

1. إمكانية الحصول على مستخلصات من نبات عباد الشمس، الخرشوف البري، أوراق التين، ثمار الكيوي ذات فعالية تخثيرية مناسبة.
2. تحديد الشروط المثلى للاستخلاص من حيث:
   - ✓ رقم pH المحلول المنظم (محلول الاستخلاص)
   - ✓ تركيز العناصر المنظمة في محلول الاستخلاص
   - ✓ زمن الاستخلاص
   - ✓ نسبة المادة النباتية الى محلول الاستخلاص
3. تقدير الفعالية التخثيرية للمستخلصات المتحصل عليها.

3-مواد وطرائق البحث:

أولاً: مادة الاستخلاص:

أ- بذور عباد الشمس: تم الحصول على الأقراص الكاملة خلال موسم قطافها وجهزت البذور وجففت في الظل وحفظت لحين الاستخدام

ب- أوراق نبات التين: تم الحصول عليها من الأشجار خلال الشهر السابع من العام وغسلت جيداً بماء الحنفية ثم بالماء المقطر وقطعت وجهزت للاستخلاص

ت- أزهار نبات الخرشوف البري: تم جمع الأزهار ما بين الشهر الخامس والسادس وأزيلت الأشواك وأخذ جزء الزهرة البنفسجي (البتلات) وجففت في الظل وطحنت وجهزت للاستخلاص

ث- ثمار الكيوي: تم الحصول على الثمار الناضجة من السوق المحلي خلال فترة توافرها وقشرت وقطعت الى شرائح

ثانياً: تحضير محاليل الاستخلاص:

تم اختيار التركيز الأفضل من كل منها بناء على عدة دراسات سابقة:

1. بذور عباد الشمس: تم الاستخلاص بأخذ نسبتين (20غ بذور/100مل محلول استخلاص و30غ بذور/100مل محلول استخلاص) وباستخدام المحاليل التالية:

- ✦ الماء المقطر
- ✦ محلول ملحي من NaCl بتركيز 5%
- ✦ محلول منظم بتركيز 50 ميليمول من أسيتات الصوديوم ورقم pH = 5 + 5% NaCl

2. أوراق نبات التين: تم الاستخلاص بأخذ نسبتين (20غ أوراق/100مل محلول استخلاص و30غ أوراق/100مل محلول استخلاص) وباستخدام المحاليل التالية:

- الماء المقطر
- محلول منظم بتركيز 100 ميليمول من Tris HCl ورقم pH = 9
- محلول منظم بتركيز 50 ميليمول من NaH_2PO_4 ورقم pH= 7
- محلول منظم بتركيز 50 ميليمول من NaH_2PO_4 ورقم pH = 7 + 2% $NaCl_2$

3. أزهار نبات الخرشوف البري: تم الاستخلاص بأخذ نسبة واحدة (10 غ أزهار الخرشوف/100مل محلول استخلاص) وباستخدام المحاليل التالية:

- ➢ الماء المقطر
- ➢ محلول منظم بتركيز 100ميليمول من حمض الستريك ورقم pH= 3.5
- ➢ محلول منظم بتركيز 100ميليمول من$Na(CH_3COO)$ ورقم pH = 5 + 0.2 % من حمض البوريك

4. ثمار الكيوي: تم الاستخلاص بأخذ نسبة واحدة 50 ٪ وباستخدام المحاليل التالية:

- الماء المقطر

- محلول منظم بتركيز 100 ميليمول من $Na_3C_6H_5O_7$ ورقم pH= 5
- محلول منظم بتركيز 20 ميليمول من NaH_2PO_4 ورقم pH=7.2

ثالثاً: طرق الاستخلاص:

1) **بذور عباد الشمس:** تم تحضير المستخلص الانزيمي الخام من بذور عباد الشمس باستخدام محاليل الاستخلاص المذكورة أعلاه كما هو موصوف سابقًا من قبل (Mohamed *et al.*, 2009) حيث تم غمر 20 و30غ من مسحوق بذور عباد الشمس ومجانستها في 100 مل من كل من محاليل الاستخلاص المبردة سابقاً باستخدام الخلاط الكهربائي، تم تجربة نسبتي استخلاص 3:10 (وزن: حجم) و 1:5 (وزن: حجم)
2) **الأوراق والأفرع الحديثة لنبات التين:** اتبعت طريقة (Dahot *et al.*, 1990) لاستخلاص الأنزيم باستخدام المحاليل المذكورة أعلاه. تم تجربة نسبتي استخلاص 3:10 (وزن: حجم) و 1:5 (وزن: حجم) حيث تم وزن 20 و30 غ من الأوراق بعد فرمها جيداً ثم جنست في 100 مل من كل من محاليل الاستخلاص المبردة مسبقاً باستخدام الخلاط الكهربائي.
3) **أزهار نبات الخرشوف البري:** اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل(Nouani *et al.*, 2009) لاستخلاص الأنزيم باستخدام المحاليل المذكورة سابقاً وبنسبة استخلاص 1:10 (وزن: حجم) حيث تم وزن 10 غ من الأزهار المجففة (بتلات الزهرة بنفسجية اللون) والمقطعة جيداً ثم جنست في 100 مل من كل من محاليل الاستخلاص المبردة مسبقاً باستخدام الخلاط الكهربائي.

- بالنسبة لبذور عباد الشمس وأوراق نبات التين وأزهار نبات الخرشوف استمرت عملية الاستخراج لمدة 24 ساعة عند 4 درجات مئوية. مع التحريك بشكل دوري باستخدام المحرك المغناطيسي ضمن حمام مائي ثلجي. ومن ثم الترشيح على عدة مراحل باستخدام قطعة قماش قطني وورق ترشيح للحصول على المستخلص الخام ثم تم الحفظ في البراد ضمن عبوات معتمة لحين الاستخدام.

4) **ثمار الكيوي:** أما بالنسبة لثمار فاكهة الكيوي فقد تم استخدام الإجراء الذي اتبعه (Thimmaiah, 2006) لاستخراج الإنزيم الخام، حيث تم مجانسة 50 غ من أنسجة الثمار في 100 مل من كل من محاليل الاستخلاص المبردة مسبقاً بنسبة استخلاص 1:2 (وزن: حجم) باستخدام الخلاط الكهربائي. وهنا تم تجربة زمنين للاستخلاص الأول النقع لمدة ساعتان والثاني النقع لمدة 24 ساعة عند 4 درجات مئوية. مع التحريك بشكل دوري باستخدام المحرك المغناطيسي ضمن حمام مائي ثلجي. ومن ثم الترشيح على عدة مراحل باستخدام قطعة قماش قطني وورق ترشيح للحصول على المستخلص الخام ثم حفظ في البراد ضمن عبوات معتمة لحين الاستخدام

رابعاً: تقدير فعالية التخثر للمستخلصات المحضرة:

تم تحديد فعالية تخثر الحليب باتباع الإجراء الذي وصفه (IDF, 1992) كالتالي:

- استرجاع 12 غ من الحليب الفرز المجفف لكل 100مل $CaCl_2$ بتركيز 10 ميليمول pH =6.5
- التحضين ضمن حمام مائي على درجة حرارة 45 م° لمدة 30 دقيقة
- توزيع الحليب ضمن أنابيب اختبار 10 مل لكل انبوب واضافة 1 مل من المستخلص لكل منها ومن ثم التحضين عند الدرجة 45 م°
- تم تقدير نقطة التخثر أثناء الاهتزاز اليدوي لأنبوب الاختبار، على فترات زمنية قصيرة جدًا. وتم توثيق وقت التخثر عندما أصبحت الجسيمات المنفصلة ملحوظة.
- حساب زمن التخثر بالثواني وتقدير فعالية التخثر بالعلاقة:
- MCA u/ml = 2400/T x S/E

حيث أن: T هو زمن التخثر بالثواني، S (ml) حجم الحليب (الركيزة)،

E (ml) حجم المستخلص.

يتم التعبير عن فعالية تخثر الحليب بالوحدة (U) وتعرف الوحدة الواحدة من الفعالية التخثرية على أنها كمية الإنزيم المطلوبة لتخثر 1 مل من الركيزة خلال 40 دقيقة عند 35 م°

4-النتائج والمناقشة

يوضح الجدول (1) تأثير محاليل مختلفة في استخلاص أنزيم مخثر للحليب من بذور عباد الشمس وبزمن استخلاص 24 ساعة، حيث لوحظ أن محلول خلات الصوديوم المنظم بتركيز 50 ميليمول عند رقم pH = 5 والحاوي على 5% من كلوريد الصوديوم وبنسبة استخلاص 30% قد أعطى أفضل استخلاص اذ بلغت الفعالية التخثيرية 52.74 وحدة/مل وبالمقارنة مع المحاليل الأخرى أعطى نفس المحلول ولكن بنسبة استخلاص 20% (33.33 وحدة /مل)، أما القيم الأخرى فقد تراوحت ما بين 25.5 وحدة/مل و30.7 وحدة/مل لكل من الماء المقطر بنسبة استخلاص 20 و30% على التوالي و 28.6 وحدة /مل و 34.04 وحدة/ مل لمحلول كلوريد الصوديوم بتركيز 5% ونسبة استخلاص 20 و30% على التوالي. وعليه تم اختيار محلول خلات الصوديوم المنظم بتركيز 50 ميليمول ودرجة pH = 5 والحاوي على 5% من كلوريد الصوديوم كمحلول منظم للاستخلاص. وهذا يتفق مع (Nasr *et al.*, 2016) الذي أكد أن بذور عباد الشمس المستخلصة مع 5٪ كلوريد الصوديوم في محلول خلات الصوديوم بتركيز 50 ميليمول، عند رقم حموضة 5.0، كان لها أعلى فعالية في تجبن الحليبMCA وأقل في زمن التخثر مقارنةً بتلك المستخلصة باستخدام محلول أسيتات فقط (رقم الحموضة 5.0). كما واتفقت هذه النتائج مع ملاحظة (Talib *et al.*, 2009) (Mohamed *et al.*, 2009) اللذين أفادا بأن مستخلص نبات التوت البري S. Dubium باستخدام منظم الخلات فقط كان له فعالية تخثر حليب أقل من المستخلص مع محلول خلات الصوديوم بوجود 5% كلوريد الصوديوم، ويعزى ذلك بسبب زيادة القوة الأيونية في المحلول، مما يعزز استقرار الإنزيم ونشاطه التخثري. كما أن وجود NaCl بتركيز معتدل يعزز نشاط إنزيمات تخثر الحليب مقارنة باستخدام محاليل منظمة فقط، حيث يؤدي إلى تحسين التفاعلات بين الإنزيم والبروتينات المستهدفة (Lombardi *et al.*, 2017).

الجدول 1 فعالية التخثير لمستخلص بذور نبات عباد الشمس بزمن استخلاص 24 ساعة

محاليل الاستخلاص	الماء المقطر		5%$NaCl_2$		50 ميليمول Na(CH3COO) pH 5 +5٪$NaCl_2$	
نسبة الاستخلاص	%20	%30	%20	%30	%20	%30
فعالية التخثر وحدة/مل	25.5	30.7	28.6	34.04	33.33	52.74

تشير النتائج الموضحة في الجدول 2 الى أن أفضل محلول لاستخلاص أنزيم الفيسين من الأوراق والأفرع الحديثة لنبات التين هو محلول فوسفات الصوديوم المنظم بتركيز 50 ميليمول ودرجة pH=7 والمحتوي على 2% من كلوريد الصوديوم وبنسبة استخلاص 30% وقد تميز عن بقية المحاليل اذ أعطى أعلى فعالية تخثيرية 39.5 وحدة/مل وبالمقارنة مع المحاليل الأخرى أعطى نفس المحلول ولكن بنسبة استخلاص 20%(9.38 وحدة/مل) وأعطى نفس المحلول دون إضافة 2% من NaCl له (3.91 وحدة/مل و 28.5 وحدة/مل) بنسبة استخلاص 20 و30% على التوالي أما القيم الأخرى فقد تراوحت ما بين (11.86 وحدة/ مل و 29.44 وحدة /مل) لكل من الماء المقطر بنسبة استخلاص 20 و30% على التوالي. أما الاستخلاص باستخدام محلول تريس HCl بتركيز 100 ميليمول و رقم pH = 9 لم يحدث أية تخثر عند نسبة استخلاص 20% وعند النسبة 30% بلغت فعالية التخثر 7.27 وحدة/مل. وعليه كان أفضل المحاليل هو محلول فوسفات الصوديوم المنظم بتركيز 50 ميليمول ورقم pH = 7 والمحتوي على 2% من كلوريد الصوديوم وبنسبة استخلاص 30%. ويعود ذلك لقدرة هذا المحلول على توفير بيئة مستقرة للإنزيم تحافظ على نشاطه التخثري، حيث يعمل على ضبط درجة الحموضة المثلى التي تتوافق مع استقرار ونشاط الفيسين، بالإضافة إلى تأثير الأيونات الموجودة (NaCl) التي قد تعزز من ثبات الإنزيم وتحسن تفاعله مع الركيزة (Qurashi & Jabbar, 2009).

كما وقد اختلفت النتائج مع (حميد جابر وآخرون، 2014) حيث بينت دراستهم أن محلول الاستخلاص تريس HCl بتركيز 100 ميليمول ورقم pH = 9 قد أعطى أعلى فعالية نوعية للبروتييز. هذا قد يعود إلى اختلاف مصادر الإنزيم وظروف الاستخلاص والتقييم، حيث يمكن أن تؤثر عوامل مثل درجة الحرارة ووقت الاستخلاص وتركيز المحلول بشكل كبير على استقرار ونشاط الفيسين. كما أن نسبة الاستخلاص الأعلى (30%) مع محلول فوسفات الصوديوم المحتوي على NaCl تعزز من تركيز الإنزيم النشط مقارنة بنسبة 20%، مما يرفع من فعالية التخثير. علاوة على ذلك، فإن وجود NaCl قد يقلل من التداخلات غير المرغوبة بين البروتينات ويزيد من ذوبانية الإنزيم، مما يحسن كفاءته (Morellon-Sterling *et al.*, 2020).

الجدول (2): فعالية التخثر لمستخلص أوراق نبات التين بزمن استخلاص 24 ساعة

محاليل الاستخلاص	الماء المقطر		100 ميليمول Tris HCl pH 9		50 ميليمول NaH_2PO_4 PH 7		50 ميليمول NaH_2PO_4 PH 7 + 2% $NaCl_2$	
نسبةالاستخلاص	%20	%30	%20	%30	%20	%30	%20	%30
فعالية التخثر وحدة/مل	11.86	29.44	—	7.27	3.91	28.5	9.38	39.5

أما بالنسبة لمستخلص الأزهار المجففة لنبات الخرشوف البري باستخدام ثلاثة أنواع من المحاليل كان أفضلها محلول حمض الستريك بتركيز 100ميليمول ورقم pH = 3.5حيث تم التخثر خلال زمن قصير فبلغت الفعالية التخثيرية (190.47 وحدة/مل) كما هو موضح في الجدول 3 والتي انخفضت مع محلول خلات الصوديوم المنظم بتركيز 100 ميليمول ودرجة pH= 5 والمحتوي على 0.2% من حمض البوريك اذ بلغت (119.40 وحدة /مل) وكانت أقل بالنسبة للماء المقطر اذ بلغت (51.61 وحدة /مل) وعليه اعتمد محلول حمض الستريك بتركيز 100 ميليمول ورقم pH = 3.5 للاستخلاص ويعزى ذلك إلى أن الظروف الحمضية المنخفضة تعزز نشاط البروتياز النباتي المسؤول عن التخثر، حيث يعمل حمض الستريك على تحسين إذابة البروتينات وتفعيل الإنزيمات البروتينية مثل السينازات الموجودة في الخرشوف، مما يؤدي إلى تخثر أسرع وأكثر فعالية مقارنة بالمحاليل الأخرى مثل خلات الصوديوم أو الماء المقطر (Bravo Bolívar *et al.*, 2023).

كما أظهرت الدراسات أن استخدام محاليل ذات pH منخفضة (حوالي 3) مع حمض الستريك يعزز من نشاط إنزيمات التخثر في مستخلصات الخرشوف، مما يفسر ارتفاع الفعالية التخثيرية مقارنة بنتائج (García *et al.*, 2014) التي استخدمت محلول منظم عند pH = 5.5 وأظهرت فعالية أقل.

الجدول 3 فعالية التخثر لمستخلص نبات الخرشوف البري بنسبة استخلاص 10% وزمن استخلاص 24 ساعة

محاليل الاستخلاص	الماء المقطر	حمض الستريك ميليمول 100 pH 3.5	100 ميليمول $Na(CH_3COO)$ pH 5 +حمض بوريك 0.2%
فعالية التخثر وحدة/مل	51.61	190.47	119.40

وضح الجدول 4 أن أفضل محلول استخلاص لثمار الكيوي الطازجة وبنسبة استخلاص 1:2 خلال فترة زمنية تراوحت ساعتان هو الماء المقطر والذي أعطى أعلى فعالية تخثرية (41.30 وحدة /مل) بينما انخفضت هذه القيمة عند إطالة زمن الاستخلاص الى 24 ساعة فكانت (32.65 وحدة/مل) في حين أنها تراوحت بين (28.67 وحدة /مل و 26.31 وحدة /مل) لمحلول سترات الصوديوم بتركيز 100 ميليمول ورقم pH = 5 خلال فترتي الاستخلاص ساعتين و24 ساعة على التوالي، بينما بلغت (32.87 وحدة/مل و29.81 وحدة /مل) لمحلول فوسفات الصوديوم بتركيز 20 ميليمول ورقم pH = 7.2 خلال فترتي الاستخلاص ساعتين

و24 ساعة على التوالي. وعليه تم استخدام الماء المقطر كمحلول استخلاص. وهذا اختلف مع النتيجة التي تم الحصول عليها من قبل (Al-Zubaidy, 2017) والتي أظهرت أن مستخلص الكيوي مع محلول فوسفات الصوديوم pH=7 قد أعطى أعلى فعالية تخثيرية. وقد فسرت النتائج المتعلقة بتفوق فعالية التخثير لمستخلص الكيوي باستخدام الماء المقطر خلال فترة استخلاص قصيرة (ساعتان) مقارنة بفترات أطول أو محاليل أخرى مثل سترات الصوديوم وفوسفات الصوديوم، بأن إنزيم الأكتينيدين في الكيوي يتمتع بكتلة جزيئية صغيرة (حوالي 23.5-27 كيلو دالتون)(Puglisi *et al.*, 2014) ويكون أكثر نشاطًا واستقرارًا عند ظروف معينة مثل pH حوالي 7 ودرجة حرارة معتدلة. عند فترات استخلاص طويلة (24 ساعة)، قد يتعرض الإنزيم للتخرب أو فقدان النشاط بسبب تحلله الذاتي أو تفاعلات غير مرغوبة، مما يقلل من فعاليته التخثرية. يمكن أن تؤثر عوامل مثل تركيز الإنزيم، نوع المحلول، ودرجة الحموضة على استقرار الأكتينيدين ونشاطه، حيث يُظهر الإنزيم استقرارًا جيدًا في نطاق pH من 3.5 إلى 8.5 ودرجات حرارة تصل إلى 50 درجة مئوية (Dhiman *et al.*, 2021). بالتالي، استخدام الماء المقطر لفترة قصيرة قد يحافظ على نشاط الأكتينيدين بشكل أفضل مقارنة بفترات أطول أو محاليل أخرى قد تؤدي إلى تغيرات في البيئة المحيطة بالإنزيم تسبب تخربه أو تثبيطه.

الجدول 4: فعالية التخثر لمستخلص ثمار الكيوي بنسبة استخلاص 1:2

محاليل الاستخلاص	الماء المقطر		$Na_3C_6H_5O_7$ 100 ميليمول pH 5		NaH_2PO_4 20 ميليمول pH 7.2	
زمن الاستخلاص	2 ساعة	24 ساعة	2 ساعة	24 ساعة	2 ساعة	24 ساعة
فعالية التخثر وحدة/مل	41.30	32.65	28.67	26.31	32.87	29.81

يبين الجدول 5 مقارنة بين الفعالية التخثيرية للمستخلصات النباتية الخام حيث نلاحظ وجود اختلافات في فعالية التخثر بين المستخلصات النباتية التي تم تقييمها والذي يمكن أن يعزى الى اختلاف البروتييز السائد في كل نوع (Su *et al.*, 2009) التباين في تكوين مواد التخثير النباتية يعود إلى عوامل بيئية وزراعية مثل نوع التربة والظروف المناخية التي تؤثر في نمو النباتات وتركيبها الكيميائي، مما يجعل استخدام المستخلصات النباتية الخام غير مستقر من حيث الفعالية (Saleem & Bachmann, 2019)

لوحظ تفوق مستخلص أزهار الخرشوف مقارنة مع بقية المستخلصات النباتية المدروسة وهذا اتفق مع (Liburdi *et al.*, 2019)، حيث أعطى مستخلص الخرشوف أعلى فعالية مقارنة مع مستخلصات الباباظ والتين، وأيضاً توافق هذا مع (Liburdi *et al.*, 2022) الذي أظهر في دراسته تفوق مستخلص بذور عباد الشمس والسمسم على بذور الكتان والعصفر، وهذا يعود لتركيزها العالي ونوعية البروتييزات الفعالة التي تشبه في خصائصها إنزيم الكيموسين، المسؤول عن تخثر الحليب.

وفي دراسة مماثلة أجراها (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013) بين تفوق مستخلص فاكهة الكيوي على مستخلصات البطيخ والزنجبيل وهذا يعود لاحتواء فاكهة الكيوي على بروتييزات ذات نشاط مشابه

للكيموسين. بالإضافة إلى ذلك، تؤثر العوامل البيئية والزراعية في تركيبة هذه الإنزيمات في النباتات، مما ينعكس على نشاطها التخثري.

الجدول 5: مقارنة فعالية التخثر وحدة/مل بين المستخلصات النباتية الخام

المستخلص النباتي الخام	مستخلص بذور عباد الشمس	مستخلص أوراق التين	مستخلص أزهار الخرشوف	مستخلص ثمار الكيوي
الفعالية التخثرية وحدة/مل	52.74	39.5	190.47	41.30

الاستنتاجات:

- تباينت فعالية التخثير وفقًا لطرق الاستخلاص من حيث النسبة المأخوذة من المادة وتركيب المحلول المنظم ورقم pH ومدة الاستخلاص. لهذا السبب، من الضروري اختيار أنسب مادة تخثر نباتية لتعزيز جودة المنتج النهائي.
- ارتفاع تركيز المادة النباتية يؤدي الى زيادة فعالية المستخلص.
- أفضل محلول استخلاص بالنسبة لبذور عباد الشمس هو خلات الصوديوم المنظم بتركيز 50 ميليمول ورقم pH = 5 والحاوي على 5% من كلوريد الصوديوم ونسبة استخلاص 3:10 (وزن: حجم) وبزمن 24 ساعة.
- أفضل محلول استخلاص بالنسبة لأوراق التين هو فوسفات الصوديوم المنظم بتركيز 50ميليمول ورقم pH = 7 والمحتوي على 2% من كلوريد الصوديوم وبنسبة استخلاص 3:10 (وزن: حجم) وزمن 24 ساعة
- أفضل محلول استخلاص بالنسبة لنبات الخرشوف هو حمض الستريك بتركيز 100ميليمول ورقم pH = 3.5 وبنسبة استخلاص 1:10 وزمن 24 ساعة
- أفضل محلول استخلاص بالنسبة لثمار الكيوي هو الماء المقطر بنسبة استخلاص 1:2 وزمن ساعتين
- مستخلص نبات الخرشوف البري قد يكون بديلاً مناسبًا للمنفحة الحيوانية، كونه أكثر نشاطًا من باقي المستخلصات النباتية.
- تمثل النتائج التي تم الحصول عليها من هذه الدراسة خطوة أولى مهمة في تحديد مواد الفعالية التخثرية لبعض المستخلصات النباتية ولذلك، هناك حاجة إلى مزيد من الأبحاث لتقييمها.

المراجع باللغة العربية:

1-**حميد جابر**، أم البشر. **محمود علي**، روضة. **سلام سلمان**، مروة، (2014).استخلاص وتنقية إنزيم الفيسين من أوراق التين واختبار كفاءته التحليلية. مجلة البصرة للعلوم الزراعية، مج. 27، ع. 1، ص. 106–115.

2- **حسن الشراجي،** صادق. **جثير عبود،** صبري. **عبد الرحمن شاكر،** خالدة (2009) .استعمال بروتييز الديباج Calotropis procera في تسريع إنضاج جبن المونتتيري Monterey Cheese. المجلة الأردنية في العلوم الزراعية. المجلد 5، العدد 4.

3- **مصطفى عبد الرحمن،** سوسن (2013). استخدام مستخلص بذور العصفر في تصنيع الجبن الأبيض الطري. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، ISSN: 1646-1813

المراجع باللغة الانكليزية:

1. Alavi, F., & Momen, S. (2020). **Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry.** *International Dairy Journal*, 107, 104709.
2. Al-Zubaidy, M. A. (2017). **Optimizing extraction conditions of actinidin from kiwifruit (Actinidia deliciosa).** *Al-Mustansiriyah J Sci*, 28, 61-67.
3. Ben Amira A, Besbes S, Attia H, Blecker C (2017). **Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making**: A review**.** *Int J Food Prop* 20: S76–S93
4. Bravo Bolívar, M. S., Pasini, F., Marzocchi, S., Ravagli, C., & Tedeschi, P. (2023). **Future perspective and technological innovation in cheese making using artichoke (Cynara scolymus) as vegetable rennet**: A review. *Foods*, 12(16), 3032.
5. Chávez-Garay DR, Gutiérrez-Méndez N, Valenzuela-Soto ME, García-Triana A (2016). **Partial characterization of a plant coagulant obtained from the berries of Solanum elaeagnifolium.** *CyTA – J Food* 14(2):200–205
6. Chazarra, S., Sidrach, L., López-Molina, D., & Rodríguez-López, J. N. (2007). **Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (Cynara scolymus, L.) flowers.** *International Dairy Journal*, 17(12), 1393-1400
7. Dahot, M.U.; Khan, M. Y. and Memon, A. N. (1990**). Screening of some pakistani plants for milk clotting activity.** *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 3(4): 284-286.
8. Darwish, M. S. (2016). **Influence of Plant Based Coagulant (Enzyme Extracts from Albizia and Sunflower Seeds) on Quality of Domiati Cheese.** *J. Food and Dairy Sci., Mansoura Univ.,* Vol. 7 (12): 501- 506
9. Delgado FJ, Joaquín RP, José GC, Ramírez R, Isidro R (2010). **Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening**. *Int J Food Sci Technol* 45(3):512–519
10. Dhiman, V. K., Chauhan, V., Kanwar, S. S., Singh, D., & Pandey, H. (2021). **Purification and characterization of actinidin from Actinidia deliciosa and its utilization in inactivation of α-amylase.** *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1), 213.
11. Egito, A. S., Girardet, J. M., Laguna, L. E., Poirson, C., Mollé, D., Miclo, L., ... & Gaillard, J. L. (2007). **Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ-casein.** *International dairy journal*, 17(7), 816-825.

12. García V, Rovira S, Boutoial K, Álvarez D, López MB (2014). **A comparison of the use of thistle (Cynara cardunculus L.) and artichoke (Cynara scolymus L.) aqueous extracts for milk coagulation.** *Dairy Sci Techno* l95(2):197–208
13. Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodríguez-Carmona E, Baumann K, Giuliani M, Parrilli E, Branduardi P, Lang C, Porro D, Ferrer P, Tutino ML, Mattanovich D, Villaverde A (2008). **Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins**: a host comparative overview. *Microb Cell Factories* 7(1):11
14. Harboe M, Broe ML, Qvist KB (2010). **The production, action and application of rennet and coagulants**. *In: Law B, Tamine A (eds) Technology of cheesemaking. Blackwell Publishing, Chichester*, pp 98–129
15. IDF. (1992). **Bovine rennets. Determination of total milk- clotting activity.** *IDF .standard (Vol. 157.International Dairy Federation, Brussels, Belgium*
16. Jacob M, Jaros D, Rohm H (2011). **Recent advances in milk clotting enzymes**. *International Journal of Dairy Technology.* 64 (1),14–33.
17. Liburdi, K., Boselli, C., Giangolini, G., Amatiste, S., & Esti, M. (2019). **An evaluation of the clotting properties of three plant rennets in the milks of different animal species**. *Foods*, 8(12), 600
18. Liburdi, K., Cucci, S., & Esti, M. (2022). **Oilseed Extracts from Local Markets as Promising Coagulant Agents for Milk from Various Mammalian Species.** Foods, 11(14), 2137.
19. Lombardi, J., Pellegrino, J. M., Soazo, M., Corrêa, A. P. F., Brandelli, A., Risso, P., & Boeris, V. (2018). **Mineral fortification modifies physical and microstructural characteristics of milk gels coagulated by a bacterial enzymatic pool**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 296-301.
20. Mazorra-Manzano MA, Perea-Gutiérrez TC, Lugo-Snchez ME, Ramirez-Suarez JC, Torres-Llanez MJ, Gonzlez-Crdova AF, Vallejo-Cordoba B (2013). **Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts**. *Food Chem* 141(3):1902–1907.
21. Mazorra-Manzano, M. A., Moreno-Hernández, J. M., & Ramírez-Suarez, J. C. (2018). **Milk-clotting plant proteases for cheesemaking.** In Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes (pp. 21-41). *Cham: Springer International Publishing.*
22. Mohamed Ahmed, I. A., I. Morishima, E. E. Babiker, and N. Mori. (2009). **Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from Solanum dubium fresen seeds**. *Food Chem*. 116:395–400.
23. Moreno-Hernández JM, Hernández-Mancillas XD, Coss-Navarrete EL, Bañuelos-Pérez MJ, Osuna-Ruiz I, Rodríguez-Tirado VA, Salazar-Leyva JA, Mazorra-Manzano MA (2017). **Partial characterization of the proteolytic properties of an enzymatic extract from "aguama" Bromelia pinguin L. fruit grown in Mexico.** *Appl Biochem Biotechnol* 18(1):181–196
24. Morellon-Sterling, R., El-Siar, H., Tavano, O. L., Berenguer-Murcia, Á., & Fernández-Lafuente, R. (2020). **Ficin: a protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis.** *International journal of biological macromolecules*, 162, 394-404.

25. Nasr, A. I., Mohamed Ahmed, I. A., & Hamid, O. I. (2016). **Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (Helianthus annuus) seeds**. *Food science & nutrition*, 4(5), 733-741.
26. Nouani, A., E. Dako, A. Morsli, N. Belhamiche, S. Belbraouet, M.M. Bellal and A. Dadie, (2009**). Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (Cynara scolymus) and from the fig tree latex (Ficus carica) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria**. *J. Food Technol*., 7: 20-29.
27. Nicosia, F., Puglisi, I., Pino, A., Caggia, C., & Randazzo, C. (2022). **Plant Milk-Clotting Enzymes for Cheesemaking.** *Foods*, 11.
28. Puglisi, I.; Petrone, G.; Piero, A.R.L. (2014) **A Kiwi Juice Aqueous Solution as Coagulant of Bovine Milk and Its Potential in Mozzarella Cheese Manufacture.** *Food Bioprod. Process*. 92, 67–72.
29. Qurashi, A. A. F., & Jabbar, A. D. (2009). **Isolation, purification and partial characterization of ficin from Ficus carica latex.** *Journal of Wasit for Science and Medicine*, 2(2), 55-66.
30. Roseiro LB, Barbosa M, Ames JM, Wilbey RA (2003). **Cheesemaking with vegetable coagulants-the use of Cynara L. for the production of ovine milk cheeses.** *Int J Dairy Techno* l56(2):76–85.
31. Saleem, M., & Bachmann, R. T. (2019). **A contemporary review on plant-based coagulants for applications in water treatment.** *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 72, 281-297.
32. Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). **Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking:** A review. *Dairy Science & Technology*, 94(1), 5-16.
33. Su, H. P., Huang, M. J., & Wang, H. T. (2009). **Characterization of ginger proteases and their potential as a rennin replacement.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*,89(7), 1178-1185.
34. Talib, A. M., M. M. Abubakar, I. A. Jideani, and A. Hassan. (2009). **Use of Jiben seeds extract to manufacture soft white cheese.** *Am. J. Appl. Sci*. 6:551–554.
35. Tamer MI, Mavituna F (1997). **Protease from freely suspended and immobilized Mirabilis jalapa**. *Process Biochem* 32:195–200
36. Tejada L, Vioque M, Gómez R, Fernández-Salguero J (2008). **Effect of lyopHilisation, refrigerated storage and frozen storage on the coagulant activity and microbiological quality of Cynara cardunculus L. extracts.** *J Sci Food Agric* 88(8):1301–1306
37. Thimmaiah SK. (2006). **Standard methods of biochemical analysis.** *Kalyani publishers, Ludhiyana*, 106-107.
38. Yegin S, Dekker P (2013). **Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering.** *Dairy Sci Technol.* 93:565–594.