متوفرة على الموقع:http://www.basra-sciencejournal.org

ISSN –1817 –2695

إمكانية استعمال انزيم الببسين المستخلص من معدة اسماك الهامور *Epinephelus coioidis* (Hamilton, 1822) في تصنيع الجبن الابيض الطري

عمار ياسر جاسم السراجي[1] محمد زيارة اسكندر[2]

1- قسم الفقريات البحرية/مركز علوم البحار/جامعة البصرة

2- قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية/كلية الزراعة/ جامعة البصرة

E-mail address: amar.zmn76@yahoo.com

الاستلام 13-2-2012، القبول 13-5-2012

الخلاصة

شملت الدراسة استخلاص انزيم الببسين EC:3.4.23.1 من معدة سمك الهامور *Epinephelus coioidis* , باستعمال 10% محلول ملحي بنسبة (1 : 2 وزن/حجم), ومن ثم رسب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع بلغت 65% لزيادة التركيز, فكانت الفعالية التحللية والتخثرية للانزيم 0.745 و 11.687 (وحدة/مل) على التوالي, وهذا ادى الى زيادة نسبة الفعالية التخثرية/الفعالية التحللية فكانت 16.408 والذي يعد ارتفاعه من المعايير المهمة في اعتماد بدائل المنفحة التقليدية. وجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التخثرية للانزيم تراوح بين 5 – 6.5 وانخفضت الفعالية التخثرية بارتفاع الرقم الهيدروجيني 7, وكانت درجة الحرارة المثلى للفعالية التخثرية الببسين عند 45 م, ولوحظ ان زيادة تركيز كلوريد الصوديوم ادى الى انخفاض الفعالية بصورة كبيرة. استعمل الببسين السمكي في صناعة الجبن الابيض الطري وقورن مع الجبن المنتج بالمنفحة التقليدية ولوحظ ارتفاع النسبة المئوية للنتروجين الذائب/النتروجين الكلي للنموذجين بزيادة فترة الخزن (1 و 3 و 5 و 7) ايام عند درجة حرارة الثلاجة, وكانت نتائج التركيب الكيمياوي والتقويم الحسي للجبن المنتج بالببسين السمكي مقاربة للجبن المنتج بالمنفحة التقليدية.

الكلمات المفتاحية: انزيم الببسين , الهامور , ***Epinephelus coioidis*** , الجبن الابيض الطري

1- المقدمة

إن استعمال الإنزيمات في الصناعات الغذائية له أهمية كبيرة في إنتاج الغذاء وحمايته, وتعد الإنزيمات المحللة للبروتين النوع الأكثر أهمية اذ تشمل حوالي 25% من الإنزيمات التجارية في العالم ، إذ يمكن تحضيرها من مصادر نباتية وحيوانية وميكروبية [18] .

يعتبر الببسين (EC3.4.23.1) من البروتيزات الحامضية ذات الفعالية العالية في البيئة الحامضية [21] وهو موجود في العصير المعدي بتركيز 400 ملغم/لتر وظيفته كسر البروتين الغذائي في المعدة ، اذ يفرز الببسين من خلايا الغشاء المخاطي المعدي بهيئة غير فعالة تعرف بالببسينوجين الذي يتحول الى ببسين بواسطة التحلل البروتيني [22].

تعد المنفحة الحيوانية (المستخلص الملحي للمعدة الرابعة للعجول الرضيعة) المخثر التقليدي المستخدم في صناعة الجبن الا ان الزيادة السكانية وما صاحبها من زيادة في استهلاك الجبن نوعاً وكماً من ناحية والقوانين التي منعت ذبح الحيوانات الصغيرة من ناحية اخرى . أصبح من الضروري إيجاد البدائل المناسبة لهذا المخثر لاستخدامها في صناعة الجبن، ومن هذه البدائل استخلاص الببسين من بعض الحيوانات مثل الخنازير [11]، الدواجن [10] , الابقار [12]، الأسماك , 25 ,1] [26, الجمال [2]. قد لاقت بعضها استحساناً من مصنعي الجبن في حين استبعد بعضها الاخر بسبب ما اظهر من قوة تحلل بٍ عالية مما ادى الى ظهور الطعم المر وبشكل مبكر فضلا عن القوام غير المتماسك الذي تترتب عليه فقدان نسبة من الخثرة في الشرش وبالتالي نقصان في المحتوى البروتيني [7]. استعملت انزيمات الببسين في كثير من النظم الصناعية والتطبيقية منها: مجال تصنيع الاغذية في تطرية اللحوم وفي صناعة الاجبان وانتاج المتحللات البروتينية وفي صناعة البيرة, وفي مجال الصناعي في صناعة المنظفات ودباغة الجلود وفي الكيمياء الزراعية, والمجال الطبي في صناعة المستحضرات الصيدلانية وفي التطبيقات التحليلية (السريرية) والطبية [27,28,29,30]

نتيجة للأنواع الكثيرة من الأسماك المستعملة تجارياً التي تصل الى 20000 نوع لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى امكانية استعمال انزيم الببسين المستخلص من اسماك الهامور في صناعة الجبن الابيض الطري ودراسة خواصه الحسية خلال فترة الخزن.

2- المواد وطرائق العمل

2-1. استخلاص انزيم الببسين السمكي

استخلص الانزيم الخام من 650 غم لـ 4 معدات من اسماك الهامور التي تم الحصول عليها من منطقة الفاو في محافظة البصرة بلستعمال 10% من المحلول الملحي NaCl حسب الطريقة التي ذكرها [19], بعدها تم تركيز المستخلص بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع بلغت 65% واجراء الديلزة للراسب باستعمال الماء المقطر.

2-2. تقدير الفعالية التحللية

قدرت الفعالية التحللية للإنزيم المستخدم في الدراسة (الببسين السمكي) حسب طريقة [20] باستخدام الكازين كمادة للتفاعل.

2-2-1. المحاليل المستعملة

1. محلول دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.2 مولاري وبرقم هيدروجيني 2
2. محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 1 مولاري
3. محلول الكازين

حضر بإذابة 3غم من الكازين في 90 مل ماء مقطر مع التحريك والتسخين على درجة 90 م ثم اضيف اليه 2.5مل من محلول رقم2 مع التحريك حتى الذوبان واكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

4. محلول المادة الاساس

حضر بخلط حجم واحد من محلول رقم 1 وحجم واحد من محلول رقم 3 واربعة حجوم من الماء المقطر

5. محلول TCA 10%

2-2-2. طريقة العمل

اضيف 0.2 مل من المستخلص الانزيمي الى 2مل من محلول رقم 4 وحضن في حمام مائي بدرجة حرارة35م ولمدة 20 دقيقة ثم اضيف 3مل من محلول رقم 5 لإيقاف التفاعل، حضر محلول الكفء (blank) بنفس الطريقة عدا اضافة محلول رقم 5 قبل اضافة المستخلص الانزيمي اجريت بعد ذلك عملية النبذ المركزي 5000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة وقيست الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر.

تعرف الفعالية التحللية بأنها كمية الأنزيم التي تسبب زيادة في الأمتصاصية مقدارها 0.01 عند 280 نانومتر تحت ظروف التجربة.

2-3. تقدير الفعالية التخثرية

تم تقدير الفعالية التخثرية حسب ما ذكر ه [2] وتلخصت باسترجاع 12 غم حليب الفرز المجفف ب100 مل من محلول كلوريد الكالسيوم 0.01 مولاري وعدل الرقم الهيدروجيني الى 6.5 وحفظ في الثلاجة لمدة 18 ساعة، اخذ 10 مل من الحليب المسترجع في انبوبة اختبار داخل حمام مائي ع ند درجة 35 م°. اضيف 1 مل من المستخلص الانزيمي المحضر مع التحريك الدائري الى حين ظهور بدايات التخثر، سجل الزمن بالثواني، وحسبت الفعالية التخثرية وفقاً لما ذكر ه [5] وحسب المعادلة التالية:-

$$\text{الفعالية التخثرية} = \frac{2400}{\text{وقت التخثر بالثواني}} \times \text{عدد مرات التخفيف}$$

تعرف الفعالية التخثرية بأنها كمية الأنزيم اللازمة لتجبن 1 مل من الحليب خلال دقيقة واحدة تحت ظروف التجربة.

2-4. تقدير تركيز البروتين

قدر تركيز البروتين حسب طريقة لوري [16] باستخدام كاشف فولن (Folin – Ciocalteu) و المحلول القياسي Bovine Serum Albumin (BSA).

2-5. تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الانزيم التخثرية

ضبط الرقم الهيدروجيني للحليب البقري الخام بعد البسترة على درجة 65م\30 دقيقة من 5.0- 7.0 وبفارق 0.5 درجة في الرقم الهيدروجيني من انبوبة الى أخرى باستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك ومحلول هيدروكسيد الصوديوم 1عياري واستخدمت لتقدير الفعالية التخثرية كما ذكر في المعادلة السابقة وفقاً لما ذكره[5].

2-6. تأثير درجة الحرارة في فعالية الانزيم التخثرية

قدرت الفعالية التخثرية للانزيم وفقاً لما ذكره[5] في مدى من درجات الحرارة تراوح بين 20-60 م°.

2-7. تأثير كلوريد الصوديوم في فعالية الانزيم التخثرية

قدرت الفعالية التخثرية للإنزيم في الحليب الخام بعد البسترة والمضاف الي هـ تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم تراوحت من (1-10)غم/100 مل حليب.

2-8. صناعة الجبن الابيض الطري

تم تصنيع الجبن الطري باستعمال الانزيم السمكي وكذلك من المنفحة التقليدية من شركة Christian Hansen الدنماركية ذات قوه تجبنية 1-50000 وكما هو مذكور على العبوة (بعد توحيد الفعالية التخثرية للانزيم) حسب الطريقة التي ذكرها [13] واخذت النماذج لإجراء التحليلات الكيمياوية وحفظ الناتج في محلول ملحي 10% في درجة حرارة الثلاجة . تم اجراء التقييم الحسي خلال الخزن للفترات 1 و 7 ايام من قبل عدد من المقيمين باستخدام نظام 10 درجات المتبع من قبل [17].

2-9. التحليلات الكيمياوية

قدرت النسبة المئوية للدهن والبروتين والحموضة والرقم الهيدروجيني والمواد الصلبة الكلية في الحليب والشرش والجبن حسب الطريق الذي ذكرها [15], اما النسبة المئوية للنتروجين الذائب في الجبن فقدرت حسب ما ذكر في [14] .

3- النتائج و المناقشة

3-1. استخلاص الانزيم ودراسة الفعالية التحللية والتخثرية

يبين الجدول (1) كلاً من الفعالية التحللية والتخثرية للبيسين السمكي بعد الاستخلاص بالمحلول الملحي اذ كانت 4.866 و 0.556 (وحدة/مل) على التوالي, وبعد الترسيب بكبريتات الامونيوم فقد وجد زيادة في الفعالية التخثرية بصورة اكبر من الفعالية التحللية اذ كانت 11.687 و 0.7125 (وحدة/مل) على التوالي وهذا ادى الى زيادة نسبة الفعالية التخثرية/الفعالية التحللية اذ كانت النسبة 8.751 قبل الترسيب و 16.408 بعد الترسيب التي يعد ارتفاعه نسبة الفعالية التخثرية/الفعالية التحللية من المعايير المهمة في اعتماد بدائل المنفحة التقليدية[1], وكانت هذه النتائج مقاربة لما وجدته [1] اذ بلغت النسبة الفعالية التخثرية/ الفعالية التحليلة للبيسين المنقى 13.66

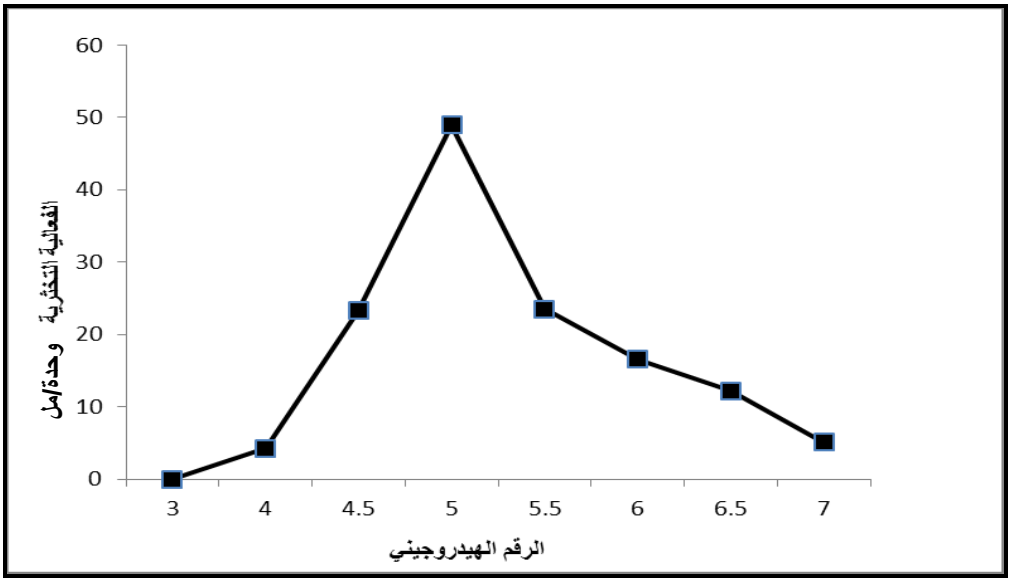
جدول (1) الفعالية التحللية والتخثرية للانزيم السمكي قبل وبعد الترسيب بكبريتات الامونيوم

الانزيم	الفعالية التخثرية(وحدة/مل)	الفعالية التحللية(وحدة/مل)	الفعاليةالتخثرية/الفعالية التحللية
المستخلص الخام	4.866	0.556	8.751
الترسيب بكبريتات الامونيوم	11.687	0.7125	16.408

3-2. تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الانزيم التخثرية

يوضح الشكل (1) ان الفعالية التخثرية للبيسين السمكي ازدادت بانخفاض قيمة الرقم الهيدروحيني للحليب، وكانت الفعالية التخثرية عند رقم هيدروجيني 5 - 7 وهذا مناسب عند تصنيع الجبن الابيض الطري لان ارتفاع الحموضة يؤدي الى حصول خثرة جامدة وتغير في تركيبها الكيمياوي اذ تفقد كمية كبيرة من الاملاح وتؤدي الى قوام قصير سهل الكسر في الجبن النهائي [4], وجاءت هذه النتائج مقاربة لما وجده [8] في ان الفعالية

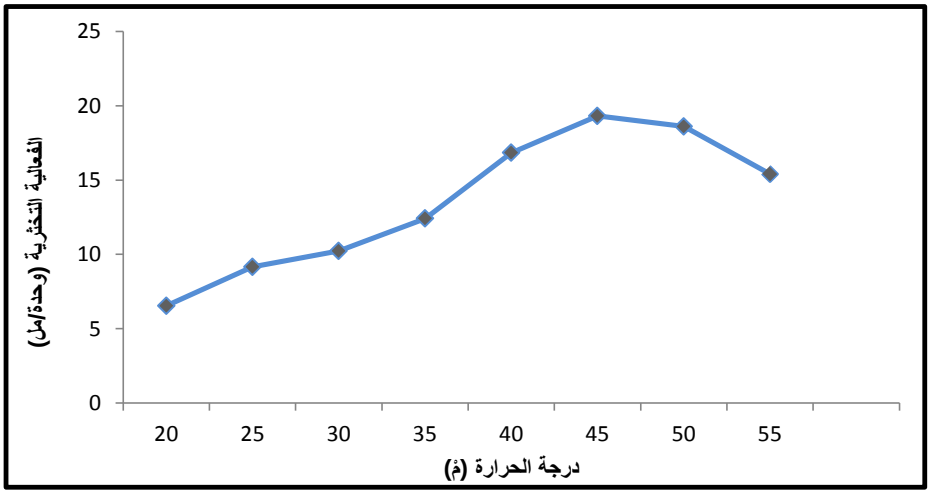
التخثرية لبيسين الاغنام والدجاج قد انخفضت مع ارتفاع الرقم الهيدروجيني من 5.8–7 والى ما توصلت اليه [1] في ان الفعالية التخثرية لبيسين سمك الجري انخفضت مع ارتفاع الرقم الهيدروجيني من 5.8 – 7.



شكل (1) تأثير الرقم الهيدروجيني في الفعالية التخثرية لانزيم البيسين المستخلص من معدة سمك الهامور

3-3. تأثير درجة الحرارة في الفعالية التخثرية للانزيم

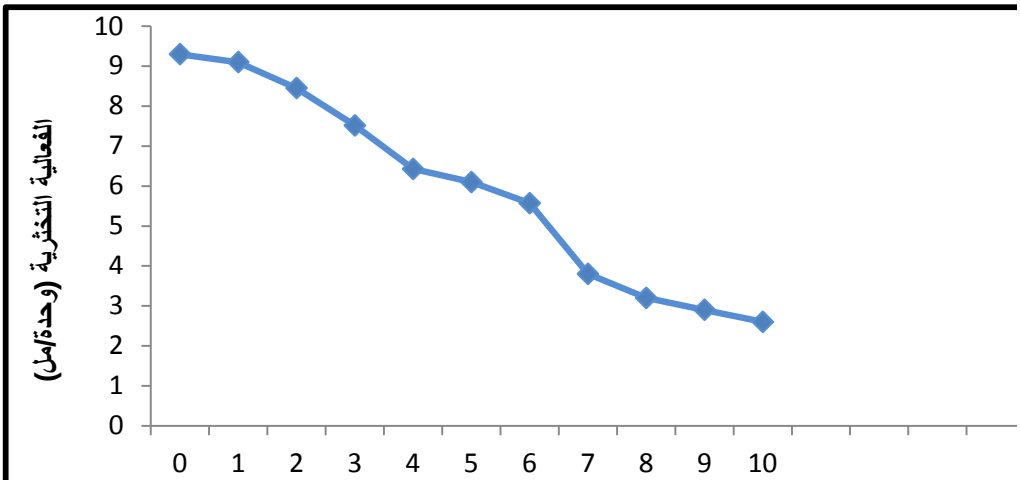
يبين الشكل (2) تأثير درجات حرارة الحليب في الفعالية التخثرية اذ يظهر ان الفعالية التخثرية ازدادت بزيادة درجة حرارة الحليب فكانت اعلى فعالية عند درجة حرارة 45 م° ثم بدأت بالانخفاض، و يظهر ايضاً ان الفعالية التخثرية عند حرارة 35 م كانت مناسبة لإنتاج الجبن الابيض الطري اذ يفضل ان تكون درجة حرارة الانتاج بهذه الحدود وذلك لتفادي انكماش الخثرة وبالتالي سرعة فقدان الشرش ومن ثم تكوين خثرة جامدة ومطاطة بدرجة عالية [4]. تأتي هذه النتائج متقاربة مع ما وجده [23] من ان انزيم البيسين المنقى من معدة سمك كود الاطلسي Atlantic cod يمتلك اعلى فعالية تخثرية بدرجة حرارة 40 م.



شكل (2) تأثير درجة الحرارة في الفعالية التخثرية لانزيم البيسين المستخلص من معدة سمك الهامور

3-4. تأثير كلوريد الصوديوم في فعالية الانزيم التخثرية

يوضح الشكل (3) زيادة تركيز كلوريد الصوديوم في الحليب والذي ادى الى انخفاض الفعالية التخثرية للإنزيم السمكي اذ لوحظ ان التركيز 10% أعطى انخفاضاً كبيراً في الفعالية التخثرية وقد يكون ذلك بسبب تكوين اواصر فوسفات الكالسيوم بين اجزاء الكازين وبالتالي تكوين شبكة الخثرة وترسيبها [3] لهذا استخدم محلول ملحي تركيزه 10% لحفظ الجبن لأنه يؤثر على عمل الانزيم المتخلف في الجبن وعلى نشاط الأحياء المجهرية وبالتالي تأخير تكوين الطعم المر. وتأتي هذه النتائج موافقة لتلك التي حصل عليها [1] باستعمال ببسين سمك الجري ولكذلك تتفق النتائج مع تلك التي وجدها [24] بان كلوريد الصوديوم له تأثير مثبط على فعالية ببسين الخنزير ومنفحة العجول.



شكل (3) تأثير تركيز كلوريد الصوديوم في الفعالية التخثرية لإنزيم الببسين المستخلص من سمك الهامور

3-5. التركيب الكيمياوي للحليب المستخدم في صناعة الجبن

تم دراسة التركيب الكيمياوي للحليب المستعمل في صناعة الجبن الابيض الطري وكانت نتائج تحليل مكونات الحليب مبينة في (الجدول 2).

جدول (2) التركيب الكيمياوي للحليب المستخدم في صناعة الجبن

المكونات	النسبة المئوية
البروتين %	3.4
الدهن %	3.7
المواد الصلبة الكلية %	11.3
المواد الصلبة غير الدهنية%	7.6
الحموضة %	0.14
الرقم الهيدروجيني	6.7
الوزن النوعي	1.028

3-6. التركيب الكيمياوي للجبن المنتج

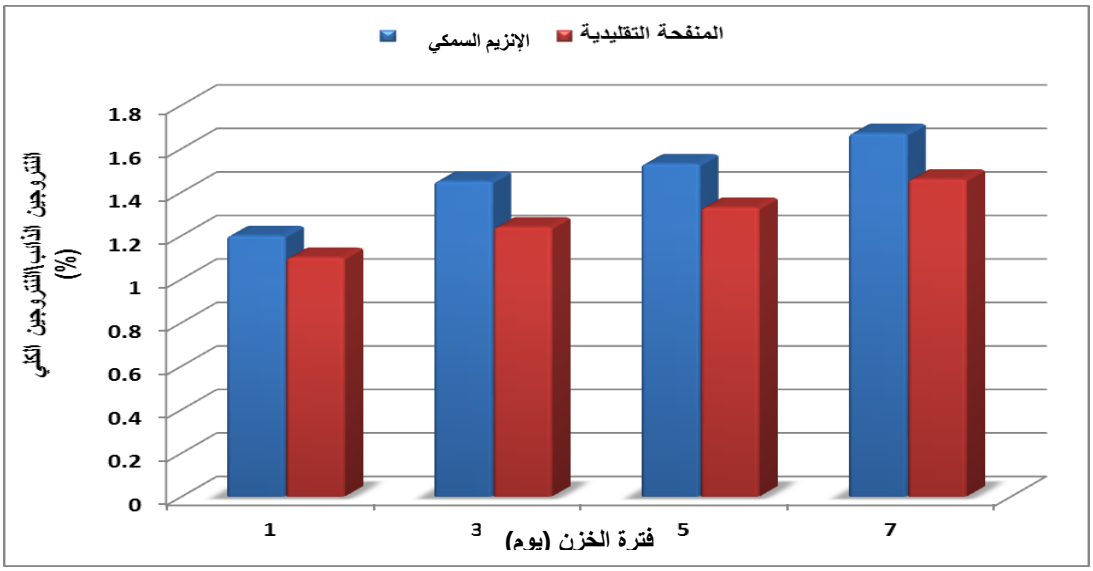
يبين الجدول (3) التركيب الكيمياوي للجبن الأبيض الطري المنتج باستعمال المنفحة التقليدية والإنزيم السمكي وذلك بعمر يوم واحد وقبل خزنه بالمحلول الملحي. اذ يلاحظ ان نسبة الرطوبة والبروتين والدهن كانت 62.1 و 16.19 و 14.7 على التوالي للجبن المنتج بالمنفحة التقليدية، وهي مختلفة قليلا مع نسبة الرطوبة والبروتين والدهن للجبن المنتج بالإنزيم السمكي والتي بلغت 63.1 و 15.46 و 14.4 على التوالي وهذا انعكس على نسبة التصافي في كل من النموذجين، وقد يعود سبب الاختلاف الى ان المنفحة التقليدية اكثر احتفاظاً بالدهن بسبب تماسك الخثرة من الإنزيم السمكي اذ لوحظ ارتفاع نسبة الدهن البروتين في الشرش المنتج بالإنزيم السمكي عنه في المنفحة التقليدية 0.26 و 0.94% على التوالي للسمكي و 0.15 و 0.89% على التوالي للمنفحة التقليدية.

جدول (3) التركيب الكيمياوي للجبن المنتج باستعمال المنفحة التقليدية والببسين السمكي

المكونات	الجبن المنتج باستعمال	
	المنفحة التقليدية	ببسين السمكي
الرطوبة الكلية %	62.1	63.1
البروتين %	16.19	15. 46
الدهن %	14.7	14.4
الحموضة الكلية %	0.17	0.17
الرقم الهيدروجيني	6.6	6.5
التصافي %	17.1	16.8

3-7. نسبة النتروجين الذائب الى النتروجين الكلي

يوضح الشكل (4) زيادة النسبة المئوية للنتروجين الذائب الى النتروجين الكلي في كل من النموذجين مع تقدم فترة الخزن وان كانت الزيادة اكثر بقليل في الانزيم السمكي من المنفحة التقليدية الا ان خزن الجبن في محلول ملحي 12% ودرجة حرارة الثلاجة قد حد بصورة كبيرة من تحلل البروتين الى الحد غير المرغوب فيه اذ لم يعط أي طعم مر، وتعد النسبة المئوية للنتروجين الذائب الى النتروجين الكلي من المعايير التي يعتمد عليها في معرفة تاثير المخثرات في نوعية الجبن ولاسيما خلال فترة الخزن والانضاج وان الغاية من تقدير هذة النسبة هي معرفة فعالية الانزيم في تحلل البروتين [6]. وجاءت هذه النتائج متقاربة مع [1] اذ بلغت النسبة المئوية 2% في الجبن المنتج من ببسين سمك الجري عند خزنه في اليوم السابع عند درجة حرارة 7 م.



شكل(4) النسبة المئوية للنتروجين الذائب/النتروجين الكلي للجبن المنتج باستعمال المنفحة والبيسين السمكي لمدة خزن 7 ايام في درجة حرارة الثلاجة

3-8. التقييم الحسي للجبن المنتج

يبن الجدول (4) نتائج معدل التقييم الحسي لكل من الجبن المصنع بالإنزيم السمكي والمنفحة التقليدية المخزنة لفترة 1 – 7 ايام عند درجة حرارة 4م, وقد اتصف الجبن بنكهة جيدة خالية من أي طعوم غريبة اذ لم يلاحظ أي مرارة في المنتوج عند فترة الخزن, وظهر هناك تباين قليل لصفة القوام في اليوم السابع وهذا ربما يعود الى الزيادة في تحلل الكازين بفعل الانزيم السمكي اذ ان قوام الجبن يتأثر بتحلل الكازينات والدهن [9].

جدول(4) نتائج معدل التقييم الحسي للجبن المنتج باستعمال البيسين السمكي والمنفحة التقليدية

نوع المخثر	المنفحة التقليدية		البيسين السمكي	
الصفات	اليوم الاول	اليوم السابع	اليوم الاول	اليوم السابع
النكهة	9	8	9	8
القوام	10	9	9	7
المرارة	10	9	10	8
التماسك	10	8	9	8
الفتحات	10	10	10	9
اللون	10	10	10	10
المجموع	**59**	**54**	**57**	**50**

4- الاستنتاجات

1. تعد معدة اسماك الهامور مصدراً جيدا لانزيم الببسين فضلا عن مصادره الاخرى.
2. امكانية الحصول على انزيم الببسين ذي الفعالية التخثرية الجيدة باستعمال التنقية الجزئية بالمحلول الملحي وكبريتات الامونيوم.
3. يمتلك الانزيم صفات جيدة لتحمله درجات حرارة عالية من ناحية الفعالية التخثرية.

5- المصادر

[1] **حمادي, دنيا سعد علي,** فصل وتنقية وتوصيف الببسين من معدة اسماك الجري *Siluris glanis*. رسالة ماجستير, جامعة بغداد (2001).

[2] **مجيد, غياث حميد وناصر, اميرة كاظم و الركابي, علي خضير,** استخلاص انزيم الببسين الجملي واستخدامه في صناعة الجبن الابيض الطري العراقي. مجلة البصرة: 7(2) (2007).

[3] **سعيد, نعمة احمد,** عزل ودراسة خواص الببسين من الاغنام المحلية. رسالة ماجستير, كلية الزراعة, جامعة الموصل (1988).

[4] **علي, لطفي عبدالمطلب وسليم, رياض محمد,** صناعة الجبن والالبان المتخمرة. مطابع جامعة الموصل (1983).

[5] **محي الدين, محمد عمر,** تنقية وتوصيف انزيم البروتيز الحامضي بديل المنفحة المنتج من العفن *Rhizomucor miehei* Mo-96. اطروحة دكتوراه, كلية الزراعة, جامعة بغداد (1998).

[6] **الطويل, سعد ضياء وديع,** فصل وتنقية وتوصيف انزيم البروتيز من اوراق نبات الدييباج *Calotropis procera* واستخداماته التطبيقية. رسالة ماجستير كلية الزراعة, جامعة بغداد (2000).

[7] **الموسوي, رجاء كاظم باقر,** تأثير تجزئة بعض الانزيمات المخثرة على المحتوى البروتيني للجبن الطري. رسالة ماجستير, كلية الزراعة, جامعة البصرة (1996).

[8] **اليونس, زينة كاظم عيسى,** إستخلاص وتنقية أنزيم الببسين من معدة بعض الحيوانات وإمكانية ربطه واستعماله في الأنظمة الغذائية. اطروحة دكتوراه, كلية الزراعة, جامعة البصرة (2011).

[9] **Davis, J. G.** Cheese basic technology. Vol. 1. Ist ed. J. and Churchill, Ltd. London, UK. **(1965).**

[10] **Gordin, A. and Rosenthal**. Effect of chicken pepsin as milk clotting enzyme. J. food protection. 41: 684-688. **(1977**)

[11] **Green, M. L.** Assessment of swine, bovine and chicken pepsins as rennet substitute for cheddar cheese-making. J. dairy Res., 39: 261-273. **(1972).**

[12] **Guinee, T. P. and Wilkinson, M. G.** Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. International Journal of Dairy Technology, 45 (4): 94 – 104. **(1992).**

[13] **Kawai, M. and Mukai, N.** Studies on milk-clotting enzymes produced by Basidomycetes. part1- screening tests of Basidomycetes for the production of milk-clotting enzymes. Agric. Biol. Chem., 34(1): 159-163. **(1970).**

[14] **Kosikowski, F.** Cheese and fermented milk food, 2^{nd} . Ed., New York, USA. **(1982).**

[15] **Ling, E. R.** A text-book of dairy chemistry. vol. 2. Practical, 3^{rd} Ed. Chapman and Hall Ltd. London. UK. **(1963).**

[16] **Lowery, O. H.; Resobrough, N. J.; Farr, A.L. and Randall, R. J.** Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biological Chem., 193(1): 265-275. **(1951).**

[17] **Nelson, I. A. and Trout, G. M.** Judging dairy products. The Olsen

of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). Food Chem 121: 49-55. **(2010)**

[26] Klomklao, S.; Kishimura, H.; Yabe M. and Benjakul, S. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*coryphaenoidespectoralis*). Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., 147: 682-689. **(2007).**

[27] Nalinanon, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W. and Kishimura, H. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthustayenus*). Food Chem104: 593-601. **(2007).**

[28] Benjakul, S.; Klomklao, S. and Simpson, B. K. Enzymes in fish processing. In Enzymes in Food Technology (2ndedn), Whitehurst R. J., Van Oort M., Eds. Blackwell Publishing, Chichester: 211-225. **(2010).**

[29] Gorgas, F. J. S. Dental medicine. A manual of dental material medica and therapeutics, Nabu Press, Washington, 48-50. **(2009).**

[30] Gupta, R. , Beg, Q. K. and Lorenz, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. Applied microbiology and Biotechnology, 59:15-32. **(2002).**

Publishing Co. Mil Wankees, Wis., 53212 USA. **(1965).**

[18] Temiz, H.; Akut; U.; Okumus, E. and Turhan, S. The partial purification and properties of pepsin obtained from turkey proventriculus. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 12: 450-456. **(2007).**

[19] Temiz, H.; Okumus, E.; Aykut, U.; Dervisoglu, M. and Yazici, F. Partial purification of pepsin from turkey proventriculus. World J. Microbiol. Biotechnol. 24(9): 1851 – 1855. **(2008).**

[20] Witaker, J. R. Properties of the Proteolytic enzymes of commercial ficin. J. Food Research, 22: 483-493. **(1958).**

[21] Barrett, A. J. In: Protein degradation in health and disease. (Eds., Evered, D.C. and Whelan, J.) Vol.4: 1-9 CIBA Foundation symposia. Excerpta Medica. **(1980)**

[22] Walsh, C. Enzymatic Reaction Mechanisms**.** W. H. Freeman and company. Sanfrancisco. **(1979).**

[23] Brewer, P.; Helbig, N. and Haard, N. F. Atlantic cod pepsin – characterization and use as a rennet subatitute. J. Food Sci. Technol., 17(1): 38-43. **(1984)**.

[24] Wahba, A. and EL-abbassy, F. Milk clotting activity of rennet and of rabbit, sheep and porcine pepsins. Egyption J. Dairy Sci., 9:5-10. **(1986).**

[25] Nalinanon, S.; Benjakul, S. and Kishimura, H. Biochemical properties