

HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS POR UN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE FLOR DE NARANJO AGRIO (*Citrus aurantium*) Y SU POTENCIAL COAGULANTE PARA PRODUCCIÓN DE QUESOS

HYDROLYSIS OF PROTEINS BY AN ENZYMATIC EXTRACT OF SOUR ORANGE (*Citrus aurantium*)
FLOWERS AND MILK-CLOTTING PROPERTIES FOR CHEESE PRODUCTION

Mazorra-Manzano MA^{*1}, Moreno-Hernández JM¹, Torres-Llenez MJ¹, Ramírez-Suarez JC², González-Córdova AF¹ y Vallejo-Córdoba B¹

¹Laboratorio de Biotecnología de Lácteos, Química y Autenticidad de Alimentos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), Carretera a La Victoria Km. 0.6, Hermosillo, Sonora, México. 83000 | ²Laboratorio de Calidad, Química y Bioquímica de Productos Pesqueros. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), Carretera a La Victoria Km. 0.6, Hermosillo, Sonora, México. 83000

RESUMEN

La búsqueda de nuevas fuentes de proteasas es un área de investigación de gran actividad por su uso potencial en procesos biotecnológicos en áreas de la medicina, alimentos e industria de los detergentes. En alimentos, las proteasas extraídas de plantas han sido consideradas sustitutos adecuados del cuajo natural para la elaboración de quesos, así como en la producción de hidrolizados, ablandadores de carne, agentes digestivos, etc. El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad de extractos de flores de naranjo agrio para coagular la leche y su acción sobre distintos sustratos proteicos, como hemoglobina, albumina y caseína. La actividad proteolítica que presentaron estos extractos en un amplio rango de pH, indican la presencia de diferentes tipos de proteasas (e.g., aspárticas, serinas y cisteínas). La actividad proteolítica en condiciones ácidas y el patrón de degradación de caseínas, sugieren la presencia de proteasas tipo quimosina y ofrece una fuente de enzimas coagulante. La alta actividad proteolítica en un amplio rango de temperatura y pH, hacen de las flores de cítricos una nueva fuente de proteasas con uso potencial en distintos procesos biotecnológicos (e.g., producción de quesos).

Palabras clave: proteasas, coagulación de la leche, flor de azahar, quesos, coagulantes vegetales

ABSTRACT

Plant proteases have been considered as good rennet substitutes for milk coagulation during cheese making process. This has motivated the screening and study of new sources of proteases due to the potential use in biotechnological processes such as in medicine, food and detergent industry. Milk-clotting activity in orange sour flower extracts was determined and its action on protein substrates such as hemoglobin, albumin and caseins was evaluated. The high concentration, broad pH range for activity, and possible different type of proteases suggests that citrus flower offer a high potential as a new source of plant proteases for use in different biotechnological processes. In addition, the degradation pattern of caseins and the proteolytic activity found

at low pH, suggests the presence of putative chymosin-like proteases with potential use as milk-clotting agents for cheese making.

Keywords: proteases, milk-clotting, azahar, cheese, plant coagulants, chymosin

INTRODUCCIÓN

La quimosina (EC 3.4.23.4) es una proteasa aspártica de gran importancia para la industria quesera. Tradicionalmente, esta enzima se extrae del estómago de bovinos donde se encuentra en alta concentración durante los primeros meses de vida, siendo en bovinos adultos remplazada por pepsina (EC 3.4.23.1) (Andren, 2011). Este extracto enzimático, conocido como cuajo o rennina, es un coagulante natural que tradicionalmente se utiliza para coagular la leche durante el proceso de elaboración de quesos. Quimosina cataliza la hidrólisis específica del enlace peptídico Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína, provocando la desestabilización de las micelas caseicas y su subsecuente agregación para la formación del gel lácteo (Dalgleish, 1992; Home y Banks, 2004; Harboe *et al.*, 2010).

La producción/consumo de quesos a nivel mundial es alrededor de los 20 millones de toneladas y se espere que esta cifra se incremente a 21 millones de toneladas para el 2015 (OECD/FAO, 2011). La creciente demanda de quesos a nivel mundial aunado a la disminución de la fuente natural del cuajo, ha incentivado la búsqueda de nuevas fuentes de proteasas con características de especificidad adecuada (alta actividad coagulante y baja actividad proteolítica) para la elaboración de quesos (Jacob *et al.*, 2011). En los últimos años, el uso de quimosina natural se ha ido remplazando paulatinamente por la quimosina producida por fermentación (FPC, por sus siglas en inglés) utilizando hongos y bacterias a los cuales se les ha introducido el gen de la quimosina bovina. Actualmente, la FPC o quimosina recombinante es la preparación enzimática más utilizada a nivel mundial ya que cerca del 90 % de los quesos producidos en Estados Unidos y la Gran Bretaña utilizan este tipo de coagulante (Andren, 2011; GMO-Compass, 2012). No obstante, algunos sectores

*Autor para correspondencia: Miguel A. Mazorra-Manzano
Correo electrónico: mazorra@ciad.mx

Recibido: 13 de enero de 2013

Aceptado: 8 de marzo de 2013

de la población aun rechazan su consumo por razones éticas, religiosas y/o tradición (Roseiro *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2010), así como por prohibiciones legales en el uso de organismos genéticamente modificados (GMOs) en algunos países europeos (Jacob *et al.*, 2011).

Todo lo anterior, ha estimulado la investigación sobre las enzimas coagulantes extraídas de plantas y han sido consideradas una opción viable para ayudar a satisfacer esta demanda. Además, el interés de la industria farmacéutica y biotecnológica sobre el uso de estas fuentes se ha incrementado, no solo por la actividad proteolítica que presentan hacia diferentes sustratos proteicos sino también a que presentan actividad en un amplio rango de pH y temperatura, ofreciendo oportunidades para innovar en nuevos procesos.

El uso de proteasas de origen vegetal en alimentos y procesos industriales no es reciente. Las proteasas papaína, bromelina, ficina y cucumisina, aisladas de papaya (*Carica papaya*), piña (*Ananas comosus*), higo (*Ficus carica*) y melón (*Cucumis melo*), respectivamente (Yamagata *et al.*, 1994; Feijoo y Villa, 2011), han sido utilizadas para el ablandamiento de carnes y modificadores de la textura de algunos alimentos, además de otras aplicaciones biotecnológicas (Sullivan y Calkins, 2010; Ha *et al.*, 2012).

En países como España, Portugal, Oeste de África, India y China, el uso de proteasas de plantas es una práctica tradicional para la elaboración de quesos y otros productos lácteos (Lopes *et al.*, 1998; Roseiro *et al.*, 2003; Adetunji y Salawu, 2008; Su *et al.*, 2009). Un ejemplo típico lo representa el uso de extractos de flores de cardo *Cynara cardunculus* para la elaboración de quesos artesanales en la Península Ibérica, productos que por su características exquisitas de sabor y textura, son altamente valorados y algunos hasta protegidos por una denominación de origen (PDO) (Freitas *et al.*, 2000; Roseiro *et al.*, 2003).

Por otro lado, existen recursos agrícolas y desechos agroindustriales que pudiesen poseer compuestos de alto valor que no son aprovechados por el desconocimiento de sus constituyentes. El cultivo de cítricos de naranjo, limón, mandarina y toronja para el aprovechamiento de sus frutos es una actividad agrícola que se ha intensificado en los últimos años. *Citrus aurantium*, conocido como naranjo agrio o amargo, es considerado por su tamaño y calidad de sus frutos como uno de los mejores porta injertos de cultivares comerciales de cítricos. Además, por el color de sus frutos y aroma de sus flores es un árbol ornamental típico de parques y jardines del Estado de Sonora. Sin embargo, la mayor parte de sus frutos y flores no se aprovechan pudiendo presentar una fuente potencial de compuestos de alto valor, como proteasas.

La búsqueda de nuevas fuentes vegetales de proteasas para la producción de quesos y otros procesos biotecnológicos, es un área de investigación de gran interés que requiere un mayor dinamismo a nivel básico y tecnológico. La elaboración de productos lácteos con aromas, sabores y texturas novedosas, así como nuevas propiedades funcionales, es un área de investigación que requiere ser explorada a

profundidad. La búsqueda y aplicaciones de nuevas fuentes de proteasas en el procesamiento de alimentos coadyuvarían al desarrollo de nuevas innovaciones biotecnológicas constantemente demandadas por el sector industrial.

El presente estudio reporta el potencial que representa la flor de naranjo agrio como una nueva fuente de proteasas mediante la evaluación de las características proteolíticas de extractos enzimáticos crudos hacia diferentes sustratos proteicos, así como su potencial para coagular de la leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Extractos Enzimáticos y Determinación de Proteína

Se obtuvieron flores frescas de naranjo agrio del árbol *Citrus aurantium*, mediante agitación, en el período de floración (Febrero-Marzo 2012). Se colectaron aproximadamente 500 g de flor proveniente de 3 árboles seleccionados al azar. Las flores fueron homogenizadas con solución Tris-HCl 0,02M (pH 7) en una relación 1:5 (p:v). El homogenizado fue filtrado y centrifugado a 7000 x g por 20 min a 4 °C. Los extractos de flor de naranjo (EFN) se mantuvieron en hielo y analizados el mismo día de su preparación.

El contenido de proteína en los extractos se determinó mediante el ensayo Dc de Bio-Rad (Biorad Laboratories, Hercules, CA), utilizando albumina de suero bovino (BSA) como estándar.

Actividad Coagulante de la Leche (ACL)

La actividad coagulante de la leche de extractos de flor de naranjo (EFN) se determinó en el rango de temperatura de 35-80 °C, utilizando leche pasteurizada descremada (1 %) con 0,02% de CaCl₂ de acuerdo a Arima *et al.* (1970). El tiempo transcurrido desde la adición del extracto hasta la primera aparición de signos de coagulación fue registrado como tiempo de coagulación. El tiempo de coagulación a cada una de las temperaturas fue determinado por triplicado y el experimento realizado en 3 ocasiones. Una unidad coagulante de leche (UCL) se define como la cantidad de extracto requerido para coagular 100 mL de leche en 40 min bajo las condiciones del ensayo.

Actividad Proteolítica

La actividad proteolítica fue determinada utilizando como sustratos albumina de suero bovino (BSA) o hemoglobina al 1 %. La mezcla de ensayo (0,5 mL) contenía 50 µL del extracto de flor de naranjo y 0,45 mL de BSA disuelta en fosfato de sodio 0,1M a pH 7,0 o hemoglobina en acetato de sodio 0,1M a pH 4,0. Las muestras fueron incubadas a 50 °C por 1 h para posteriormente detener la reacción mediante la adición de 0,5 mL of ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Las muestras inactivadas fueron incubadas sobre hielo por 30 min y posteriormente centrifugadas a 15000 x g por 20 min a 4 °C. El incremento en absorbancia del sobrenadante respecto a su muestra control fue determinado a 280 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Vis Varian Cary 50 Bio (Varian, Palo

Alto, CA, USA). La actividad fue expresada en unidades de actividad proteolítica, definidas como la cantidad de enzima requerida para causar un incremento de una unidad de absorbancia bajo condiciones del ensayo.

Hidrolisis de Sustratos Proteicos por Extractos Enzimáticos de Flor de Naranja

El perfil de degradación de hemoglobina, BSA y caseínas por el extracto de flor de naranja se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) de acuerdo al método Laemmli (1970). La reacción se llevó a cabo mediante la adición de 50 μL del EFN a 450 μL de BSA o caseína al 1 % en una solución de fosfatos de sodio 0,1M a pH 7,0 o con hemoglobina al 1 % en citrato de sodio 0,1 M a pH 3,4. Posteriormente las muestras fueron incubadas a 50 °C por 0, 20, 40, 60, 120, 240, 360, y 480 min. Inmediatamente después de la incubación, 100 μL de la mezcla fue inactivada mediante la adición de un mismo volumen de solución muestra de SDS, calentada a 100 °C por 5 min para su posterior análisis por SDS-PAGE. La separación electroforética se realizó en una cámara de electroforesis Mini-Protean II (BioRad, Hercules, CA) a 100 V por 90 min utilizando geles de poliacrilamida al 15 %. La tinción de los geles se realizó utilizando azul de coomassie.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos enzimáticos de flor de naranja (azahar) presentaron un contenido de proteína entre 25 y 36 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se ha reportado que la concentración de proteína en flor de naranja se encuentra en un rango de 8 a 15 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de flor fresca y que ésta disminuye con el estado floral (Sagee y Lovatt, 1991). La capacidad que tienen los extractos enzimáticos de plantas para coagular leche, depende de factores tales como concentración y tipo de proteasas. Los resultados mostraron que las proteasas presentes en los extractos crudos de extractos de flor de naranja se encuentran en concentraciones adecuadas para coagular la leche. La actividad coagulante de los mostró un efecto marcado en la dependencia de la temperatura (Figura 1). La mayor actividad coagulante (0,31 UCL mL^{-1}) se presentó en el rango de temperatura de 60 a 70 °C, con actividades relativas mayor al 70 % a temperatura por encima de los 40 °C (Figura 1). Esto indica que dependiendo de la temperatura, se requieren entre 3 y 5 mL de extracto fresco de flor de naranja para coagular 100 mL de leche en 40 min. El extracto perdió actividad a temperaturas mayores de 70 °C debido posiblemente a la inactivación térmica de la enzima. Resultados similares del efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasas ha sido reportado para extractos de especies de *Solanum* (trompillo) de *Euphorbia mili* (corona de espinas), *Scorzonera hispánica* (churrimana) con zonas de máxima actividad en el rango de temperaturas de 40 a 65 °C y su inactivación a temperaturas mayores de 70 °C (Mohamed-Ahmed *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2012).

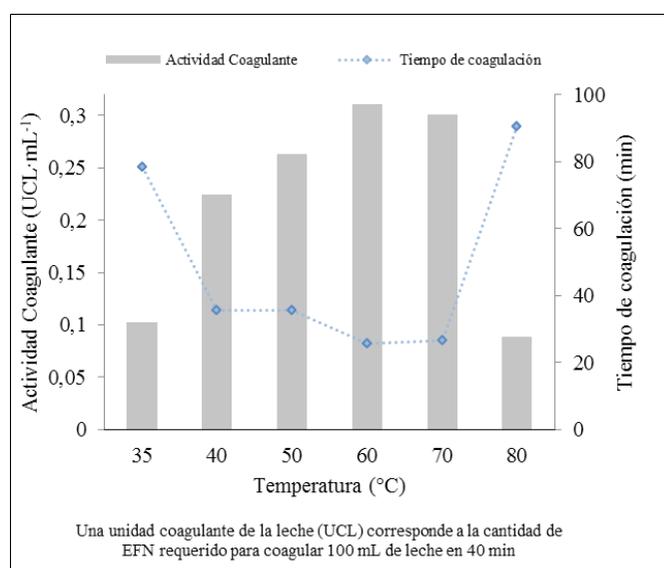


Figura 1. Efecto de la temperatura sobre la actividad coagulante y tiempo de coagulación de extractos crudos de flor de naranja

Figure 1. Temperature effect on milk-clotting activity and coagulation time of raw citrus flower extracts

Las proteasas presentes en los EFN fueron capaces de hidrolizar diferentes sustratos proteicos, tales como albumina de suero bovino (BSA), hemoglobina y caseínas (Figura 2). Los EFN mostraron actividad a diferentes valores de pH. La actividad detectada a pH ácido (pH 3,5) podría reflejar la actividad de proteasas tipo aspárticas (Dunn, 2002; Mazorra-Manzano *et al.*, 2010) mientras que la actividad en la región neutra y alcalina evidencian la posible presencia de proteasas tipo serina y cisteína, ya que la mayoría de estas enzimas muestran actividad en un amplio rango de pH (Gaur y Wadhwa, 2008; Yadav *et al.*, 2012). Lo anterior indica que los extractos crudos de flor de naranja podrían ser utilizados para la modificación enzimática de diversos sustratos proteicos en procesos como la producción de hidrolizados proteicos. Además, la actividad proteolítica en la región ácida y la acción sobre caseínas es de gran relevancia en la coagulación de la leche durante el proceso de elaboración de quesos. Esta actividad podría indicar la presencia de proteasas tipo quimosina (aspárticas), grupo al cual pertenecen la mayoría de las enzimas que han resultado ser exitosas para la elaboración de quesos (Silva *et al.*, 2002; Vairo *et al.*, 2008).

La acción de las proteasas presentes en extractos de naranja sobre caseínas, se puede observar en la Figura 3 con la aparición de un fragmento peptídico de aproximadamente 14 kDa. Este fragmento corresponde a la para-kappa-caseína (para- κ -CN, f_{1-105}) generado por la hidrólisis específica del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína durante la fase primaria del proceso enzimático de coagulación de la leche (Dalgleish, 1992). La acción de las proteasas de extractos de flor de naranja sobre caseínas ofrece un potencial como enzimas coagulantes para la elaboración de quesos; sin embargo, se requieren mayores estudios sobre su composición enzimática.

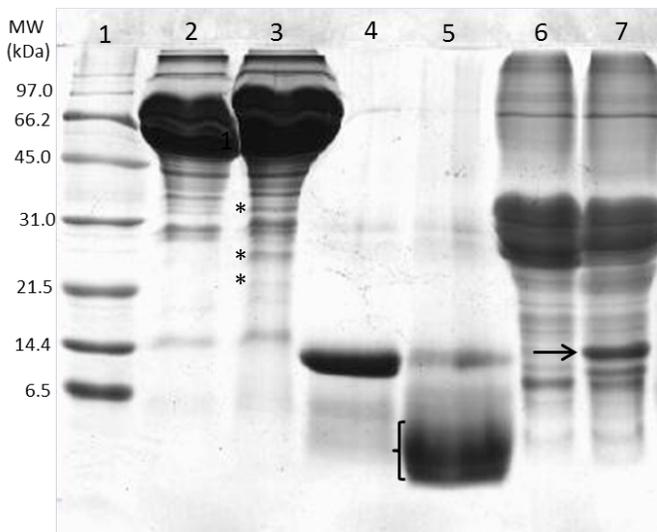


Figura 2. Degradación de albumina de suero bovino (BSA), hemoglobina y caseínas por proteasas presentes en extractos crudos de flor de naranjo

Figure 2. Degradation pattern of bovine serum albumin (BSA), hemoglobin, and caseins by proteases present in raw citrus flower extract

Líneas 2 y 3 corresponde a BSA control y después de su incubación con extractos de flor de naranjo (EFN), respectivamente. Líneas 4 y 5 corresponde a hemoglobina antes (control) y después de su incubación con EFN, respectivamente. Líneas 6 y 7 corresponde a las caseínas antes y después de su incubación con EFN, respectivamente. La BSA y caseínas se incubaron con EFN en fosfato de sodio 0.1M, pH 7.0 a 50°C por 60 min. Hemoglobina se incubó en citrato de sodio pH 3.4 a 50°C por 60 min. Línea 1 corresponde a los marcadores de peso molecular de amplio rango (BioRad). La separación se realizó en un gel de poliacrilamida-SDS al 15% cargando 60 µg de proteína por pozo. Asteriscos (*) , corchete ({} y flecha (→) señalan los productos representativos de la degradación de BSA, hemoglobina y caseínas por extractos de flor de naranjo, respectivamente.

ca (tipos de enzimas), propiedades, así como las características del gel y queso producido.

CONCLUSIONES

Los extractos de flor de naranjo agrio poseen diferentes tipos de proteasas activas y su actividad hacia diferentes sustratos proteicos, sugiere su uso para la producción de hidrolizados proteicos a partir de diversas fuentes de proteínas. Esta nueva fuente de enzimas abre un campo de investigación para el estudio básico de las proteasas en cítricos, representando un potencial para su obtención y futuras aplicaciones biotecnológicas como la producción de quesos e hidrolizados proteicos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo técnico brindado por los estudiantes María de Jesús Añorve Naranjo, Azucena Ochoa Andalla, Beyri G. Sandoval Maldonado, Miriam E. Cobián Aguayo

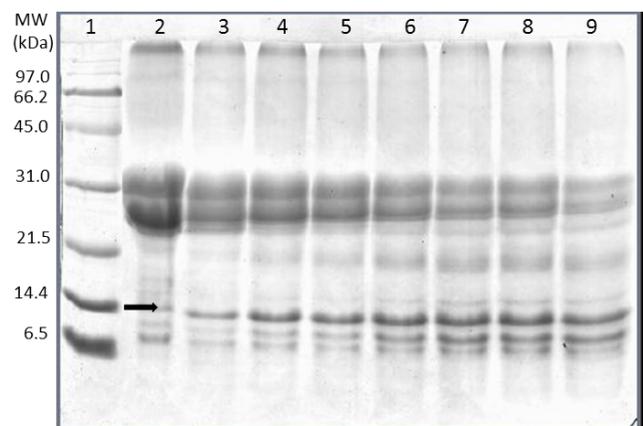


Figura 3. Patrón de degradación de caseínas por las proteasas presentes en el extracto crudo de flor de naranjo.

Figure 3. Degradation pattern of caseins by proteases present in raw citrus flower extract

Líneas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 corresponden a caseínas después de la incubación con EFN a 50 °C, pH 7.2, durante 0, 20, 40 y 60, 120, 240, 360 y 480 min, respectivamente. Línea 1 corresponde a los marcadores de peso molecular de amplio rango (BioRad). La separación se realizó en un gel de poliacrilamida-SDS al 15% cargando 60 µg de proteína por pozo. La flecha marca la banda correspondiente a la para-kappa-caseína (f1-105) proveniente de la hidrólisis específica del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ en la κ-caseína.

y Jesús A. Ibarra Galeana, durante su estancia de verano científico financiada por el programa DELFIN y la Academia Mexicana de Ciencias (AMC). De igual forma se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del programa de repatriación (Ref. 07-76399) y al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC (CIAD) por el apoyo brindado.

REFERENCIAS

- Adetunji, V.O., Salawu, O.T. 2008. West African soft cheese 'wara' processed with *Calotropis procera* and *Carica papaya*: A comparative assessment of nutritional values. *African Journal of Biotechnology* 7: 3360-3362.
- Andren, A. 2011. Cheese: rennets and coagulants. In: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Science*. Academic Press, Oxford, UK, pp. 574-578.
- Arima, K., Ya, J., Iwasaki, S. 1970. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In: Pearlman, E. G., Lorand, L. (Ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp. 446-459.
- Dalgleish, D.G., 1992. The enzymatic coagulation of milk. In: Fox, P. F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 1. Elsevier Applied Science, New York, pp. 579-619.
- Dunn, B.M. 2002. Structure and Mechanism of the Pepsin Like Family of Aspartic Peptidases. *ChemInform* 34: 4431-4458.
- Feijoo, L., Villa, T.G. 2011. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food and Bioprocess Technology* 4: 1-23.
- Fonseca, K.C., Morais, N.C.G., Queiroz, M.R., Silva, M.C., Gomes,

- M.S., Costa, J.O., Mamede, C.C.N., Torres, F.S., Penha-Silva, N., Beletti, M.E., Canabrava, H.A.N., Oliveira, F. 2010. Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopilii* latex. *Phytochemistry* 71: 708-715.
- Freitas, A.C., Macedo, A.C., Malcata, F.X. 2000. Technological and organoleptic issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Food Science and Technology International* 6: 351-370.
- Gaur, S., Wadhwa, N. 2008. Alkaline protease from senesced leaves of invasive weed *Lantana camara*. *African Journal of Biotechnology* 7: 4602-4608.
- GMO-Compass. 2012. Information on Genetically modified Organisms. <http://www.gmo-compass.org/eng/database/enzymes/83.chymosin.html>.
- Ha, M., Bekhit, A.E.D.A., Carne, A., Hopkins, D. L. 2012. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*. 134: 95-105
- Harboe, M., Broe, M.L., Qvist, K.B. 2010. The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants. In: Law, B., Tamine, A. (Eds.), *Technology of Cheesemaking*. Blackwell Publishing, United Kingdom, pp. 98-129.
- Home, D.S., Banks, J.M. 2004. Rennet-induced Coagulation of Milk. In: Patrick F. Fox, P.L.H.M. T.M.C., Timothy, P.G. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. I. Academic Press, pp. 47-70.
- Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology* 64: 14-33.
- Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., Batish, V.K. 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology* 30: 243-258.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lopes, A., Teixeira, G., Liberato, M., Pais, M., Clemente, A. 1998. New vegetal sources for milk clotting enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 5: 63-68.
- Mazorra-Manzano, M.A., Tanaka, T., Dee, D.R., Yada, R.Y. 2010. Structure-function characterization of the recombinant aspartic proteinase A1 from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 71: 515-523.
- Mohamed-Ahmed, I.A., Morishima, I., Babiker, E.E., Mori, N. 2009. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. *Food Chemistry* 116: 395-400.
- OECD-FAO. 2011. *Agricultural Outlook 2011-2020*. Chapter 9, Dairy. <http://www.oecd.org/site/oecd-faoagriculturaloutlook/48184340.pdf>
- Roseiro, L.B., Barbosa, M., Ames, J.M., Wilbey, R.A. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants - The use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology* 56: 76-85.
- Sagee, O., Lovatt, C.J. 1991. Putrescine content parallels ammonia and arginine metabolism in developing flowers of the 'Washington' navel orange. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 280-285.
- Silva, S.V., Barros, R.M., Malcata, F.X. 2002. Hydrolysis of Caseins By Extracts of *Cynara Cardunculus* Precipitated by Ammonium Sulfate. *Journal of Food Science* 67: 1746-1751.
- Su, H., Huang, M., Wang, H. 2009. Characterization of ginger proteases and their potential as a rennin replacement. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 1178-1185.
- Sullivan, G.A., Calkins, C.R. 2010. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science* 85: 730-734.
- Vairo, S., Silva, S.V., Cimino, C., Malcata, F.X., Priolo, N. 2008. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. *Food Chemistry* 106: 997-1003.
- Yadav, R., Patel, A., Jagannadham, M. 2012. Neriifolin S, a dimeric serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn.: Purification and biochemical characterisation. *Food Chemistry* 132: 1296-1304.
- Yamagata, H., Masuzawa, T., Nagaoka, Y., Ohnishi, T., Iwasaki, T. 1994. Cucumisin, a serine protease from melon fruits, shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor. *Journal of Biological Chemistry* 269: 32725-32731.