

Quelques caractéristiques physico-chimiques de l'extrait chromatographié des écorces de l'*Ongokea gore*

LIBOUGA David Gabriel

Laboratoire de Biochimie - Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro Industrielles - Université de N'gaoundéré
B.P. 455 - N'GAOUNDÉRE, Cameroun - Afrique Centrale - Tél / Fax +237.225.27.51 - e mail/libouga@yahoo.fr

RESUME

Des travaux antérieurs ont montré que la macération des écorces de l'*Ongokea gore* dans du $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 3 % (p/v) permet d'obtenir un extrait capable de coaguler le lait. On s'est intéressé à l'étude de quelques caractéristiques physico-chimiques de cet extrait chromatographié. La gel filtration a été faite en utilisant le Sepharose CL-6B comme gel, les mesures spectroscopiques à l'aide du spectrophotomètre UV à balayage de longueur d'onde entre 250 et 350 nm et les mesures de fluorimétrie à l'aide du spectrofluorimètre à balayage de longueur d'onde entre 290 et 410 nm. La température de dénaturation a été obtenue par analyse enthalpique différentielle et l'électrophorèse a été faite sur gel de polyacrylamide en présence du sodium dodécyl sulfate et d'un kit des protéines de masse moléculaires connues. On a conclu que l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* peut être séparé en plusieurs fractions dont une possède une activité coagulante. Cette fraction absorbe en UV ($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$) et a un maximum d'émission de fluorescence à 330 nm comme la plupart des protéines. Sa température de dénaturation est de 87,4 °C ; elle est constituée des protéines de masses moléculaires 14,5, 42, 43 et 94 kDa. Ces masses moléculaires grossièrement divisibles par 15 laissent penser à l'existence des monomères.

Mots clés : Chromatographie, protéine, masse moléculaire, coagulation, *Ongokea gore*

ABSTRACT

The solution obtain after macerating *Ongokea gore* barks in 3 % (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ has a milk clotting activity. Authors investigates some biochemical characteristics of a chromatographed crude extract. Gel filtration using Sepharose CL-6 was used. Spectroscopic analysis were performed using a UV spectrophotometer scanning from 250 to 350 nm and a spectrofluorimeter scanning from 290 to 410 nm. The denaturation temperature was obtained using a Differential Scanning Calorimetry then electrophoresis was done on polyacrylamide gel in presence of sodium dodecyl sulfate and a kit of proteins the molecular of which are well known. It is concluded that by gel filtration it can be obtain a fraction that has milk clotting activity; its UV maximum absorption is around 278 nm while its maximum fluorimetric emission is around 330 nm so as many proteins. Their compound are denatured around 87.4 °C. It is made up of 4 main proteins the molecular weight of which are 14.5, 42, 43 et 94 kDa. For these molecular weight are roundly divisible by 15, it can be thought of monomeres.

Key words: Chromatography, protein, molecular weight, milk clotting, *Ongokea gore*

INTRODUCTION

Les fromagers camerounais importent les enzymes coagulants notamment la présure. Cette importation pose de nombreux problèmes: coût prohibitif, conditions d'acheminement désastreuses, délais de livraison très longs... etc. Il est possible de fabriquer localement la présure à partir des caillettes des veaux de zébu (*Bos indicus*) abattus avant le sévrage mais l'abattage des jeunes ruminants est interdit. Les végétaux constituent un autre source de préparation des enzymes coagulants. Plusieurs d'entre eux ont été répertoriés: *Cynara* (CAMPOS *et al.*, 1990; FIGUEIREDO et PAIS, 1990; HEIMGARTNER *et al.*, 1990; CORDEIRO *et al.*, 1992; FARO *et al.*, 1992; MACEDO *et al.*, 1993; LLORENTE BERTA *et al.*, 1997, CARDOSO *et al.*, 1998), *Eriosema shirensense* (LOPES *et al.*, 1998), *Solanum dubium* (YOUSIF BASHIR *et al.*, 1996). Alors que au Cameroun, plusieurs auteurs ne s'intéressent qu'à d'autres enzymes végétales (OMOKOLO *et al.*, 2000), OTANI *et al.*, 1991 ont recensé les plantes susceptibles de servir de matière première pour la préparation des extraits coagulants. La principale difficulté des extraits coagulants d'origine végétale est qu'ils ont une faible activité coagulante ainsi des grosses quantités d'extraits sont nécessaires pour coaguler un volume relativement petit du lait. Il s'avère donc nécessaire dans un premier temps de concentrer ces extraits d'origine végétal. Divers auteurs ont concentré de tels extraits (ÖNER et AKAR, 1993; TAMER, 1993, UCHIKOBA et KANEDA, 1996; ASAKURA TOMIKO *et al.*, 1997; CARDOSO *et al.*, 1998) et des essais en fromagerie ont donné des résultats comparables à ceux où la présure était utilisée (OTANI *et al.*, 1991; ÖNER et AKAR, 1993; BROOME et LIMSOWTIN, 1998). LIBOUGA *et al.*, (2002) ont montré qu'on pouvait coaguler le lait en utilisant les extraits des écorces de l'*Ongokea gore* mais les volumes d'extrait mis en œuvre sont relativement importants. Pour mettre en route diverses techniques de concentration: ultrafiltration, la précipitation par diminution ou par augmentation de la force ionique... etc (HARRIS et ANGAL, 1995), il est nécessaire d'avoir des informations sur le produit à concentrer: nature chimique, poids moléculaire... etc. Le but de ce travail est d'étudier quelques caractéristiques biochimiques de l'extrait chromatographié des écorces de l'*Ongokea gore*. L'*Ongokea gore* est un arbre de la forêt tropicale; il a été décrit au Cameroun (VILLIERS, 1973). Il s'étend de l'ex-Zaïre à la Côte d'Ivoire; il mesure 8 à 10 m de haut et peut être identifié par la taille de son tronc, son écorce et ses feuilles (DÉTIENNE, 1991). Son bois jaune utilisé en menuiserie est naturellement résistant

contre la biodégradation due au moisissures et termites (TSUNODA, 1990); son écorce très riche en tannins (VILLIERS, 1973) est utilisée comme purgatif dans la pharmacopée traditionnelle.

MATERIEL ET METHODES

Extrait coagulant

Les écorces fraîches de l'*Ongokea gore* provenant de l'agglomération de Makak (3°33' longitude est, 11°02' latitude nord; LETOUZEY (1968). L'extrait coagulant de l'*Ongokea gore* est obtenu en macérant de 50 g d'écorce fraîchement prélevées dans 100 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 3% (p/v) et de H_3BO_3 à 2% (p/v) (pH \approx 6,3) pour éviter la putréfaction; ce H_3BO_3 à 2% (p/v) est préparée à partir d'une solution aqueuse de H_3BO_3 à 12,5% (p/p) selon ANIFANTAKIS et GREEN (1980). La macération se fait à 4°C pendant 24 H. Après filtration sur papier Whatman, les tissus végétaux sont éliminés et la solution est centrifugée (10 000 g, 4°C, 30 mn). Le surnageant constitue l'extrait brut des écorces de l'*Ongokea gore*.

Chromatographies

Le tamisage moléculaire se fait à l'aide d'un collecteur de fraction de Pharmacia Fine Chemicals et d'une colonne de dimension 2,6 x 90 cm. Le gel est le Sepharose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals) et l'éluant l'acide N-2 hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonique (HEPES, Merck) 15 mM, pH 7,5. Le volume du gel est de 400 ml, le débit 72 ml x H⁻¹, le volume des fractions 8,5 ml. Le détecteur est réglé à 280 nm. Le déroulement du papier enregistreur est de 1 mm / mn et la sensibilité de l'enregistreur 10 mV.

Les échantillons sont les extraits des écorces de l'*Ongokea gore*; ils ont été obtenus de deux façon. Pour la 1^{ère} chromatographie, l'échantillon est l'extrait brut des écorces de l'*Ongokea gore* lyophilisé puis redissout dans de l'acide N-2 hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonique (HEPES, Merck) 15 mM, pH 7,5 et filtré sur colonne PD 10 (Pharmacia Fine Chemicals) pour dessalage. Quant à la 2^{ème} chromatographie, l'échantillon est le mélange lyophilisé des fractions 30 à 45 de la 1^{ère} chromatographie.

Mesures spectroscopiques et analyse enthalpique différentielle

Les échantillons sont les lyophilisats de l'extrait de l'*Ongokea gore*, après la 2^{ème} chromatographie. Ces lyophilisats sont dissouts dans de l'HEPES 15 mM,

pH 7,5 et dialysés (4 °C, 24 H) contre ce même tampon. Ces solutions sont ensuite filtrées sur filtre de porosité 2 µ.

Les spectres UV sont tracés à l'aide d'un spectrophotomètre à balayage de longueur d'onde (250 à 350 nm) et les dérivées 1^{ère} et 2^{ème} sont tracées grâce à un logiciel intégré. La fluorimétrie a été mesurée à l'aide du spectrofluorimètre (SLM 4800C); la cuve utilisée a une largeur de 1 cm. On excite à 280 nm et le balayage de la longueur d'onde se fait entre 290 et 410 nm.

L'analyse enthalpique différentielle (*Differential Scanning Calorimetry* ou *DSC*) a été faite à l'aide d'un calorimètre différentiel programmé (Setaram, DSC 111) incorporé à un automate programmable et calibré avec indium et gallium. Dans des capsules en acier inoxydable on

introduit 127,2 mg de solution de l'extrait de l'*Ongokea gorv.* Le balayage de température est effectué entre 5 et 130 °C avec une cinétique de 3 °C et une fréquence d'échantillonnage de une mesure toutes les 0,8 s. L'expérience a été répétée 4 fois.

Electrophorèse

L'électrophorèse est faite en présence d'un gradient de concentration de polyacrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS) sans agent dénaturant. La coloration du gel est faite avec du bleu de coomassie dans l'acide trichloracétique à 12,5 % puis la décoloration par l'acide acétique à 5 et 10 %. Les protéines de référence (Kit *Electrophoresis* de *Pharmacia Fine Chemicals*) sont l'α lactalbumine (14 kDa), l'inhibiteur trypsique (20 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), la sérum albumine bovine (67 kDa) et la phosphorylase b (94 kDa)

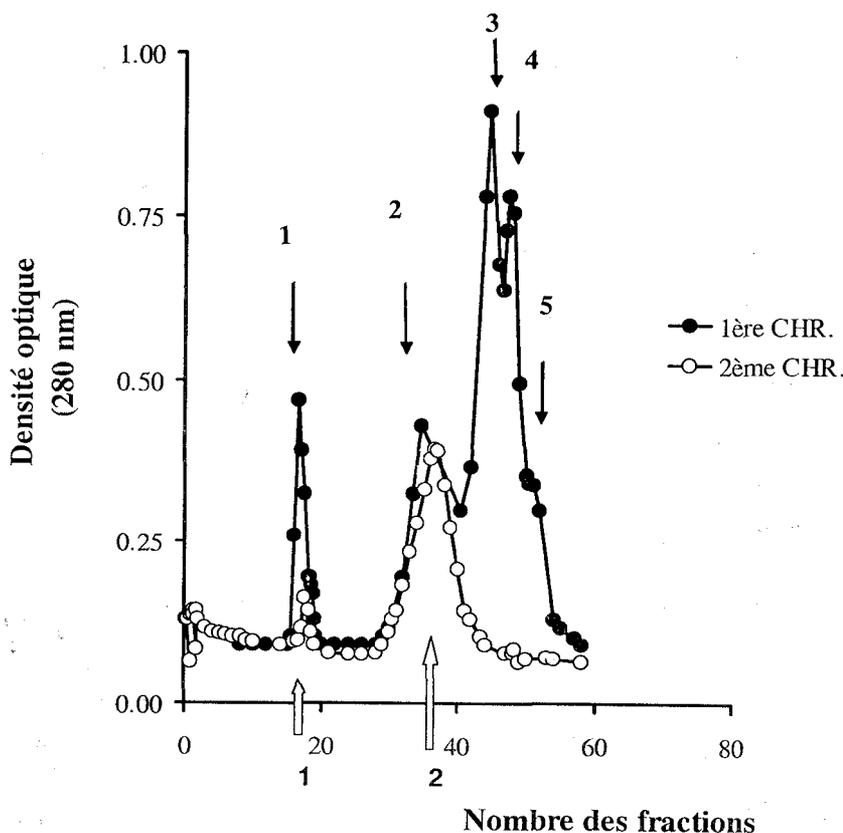


Figure 1 : Chromatogramme de l'extrait des écorces de l'*Ongokea gorv*

Colonne 2,6 × 90 cm; gel, sepharose CL-6B, volume du gel 400 ml, éluant acide N-2 Hydroxyéthylpiperazine-N'-ethanesulfonique 15 mM, pH 7,5; débit 72 ml / h; fraction de 8,5 ml. Déroulement du papier enregistreur 1 mm / mn; sensibilité de l'enregistreur 10 mV. Absorbance à 280 nm.

L'échantillon est pour la 1^{ère} chromatographie l'extrait brut des écorces de l'*Ongokea gorv* et pour la 2^{ème} chromatographie le mélange lyophilisé des fractions 30 à 42 de la 1^{ère} chromatographie.

Les flèches verticales dirigées vers le bas indiquent les emplacements des différents pics du 1^{er} chromatogramme ; celles dirigées vers le haut indiquent ceux du 2^{ème} chromatogramme. Les symboles 1^{ère} CHR et 2^{ème} CHR indiquent respectivement 1^{ère} et 2^{ème} chromatographie.

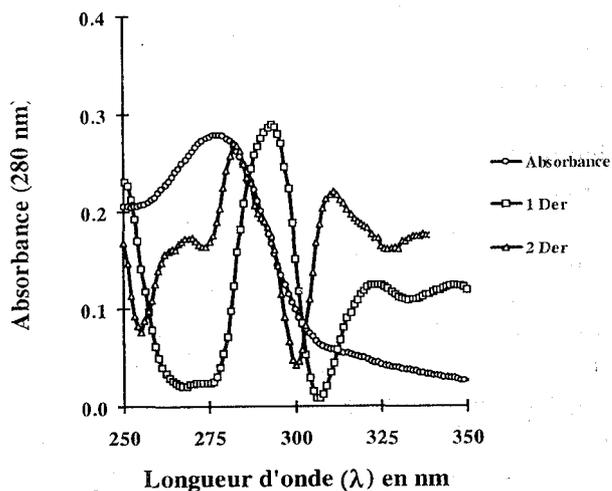


Figure 2a

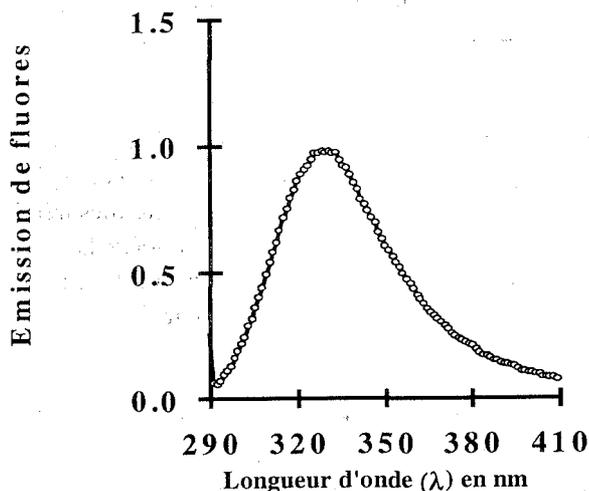


Figure 2b

Figure 2 : Spectres (a) UV et (b) d'émission de fluorescence de l'extrait re-chromatographié des écorces de l'*Ongokea gore*.

Le tampon est de l'acide N-2 Hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonique 15 mM, pH 7,5; cuve de trajet optique 1 cm ; (a) Spectre UV : balayage de longueur d'onde entre 250 et 350 nm ; les symboles 1 Der et 2 Der indiquent respectivement la dérivée première et la dérivée seconde des valeurs de l'absorbance ; (b) spectre d'émission de fluorescence ; excitation à 280 nm et balayage de longueur d'onde entre 280 et 490 nm.

Analyse statistique

Les valeurs moyennes sont suivies des écarts types.

Traitement des enregistrements des tables traçantes

Les enregistrements des tables traçantes ont été analysés au scanner puis retracés à l'aide du logiciel *Ungraph* (Biosoft, Cambridge, United Kingdom).

RÉSULTATS

La figure 1 représente les chromatogrammes de la 1^{ère} de la 2^{ème} chromatographie. Le 1^{er} chromatogramme est fait de 5 pics, le 1^{er} pic étant un pic d'exclusion moléculaire. Seul les fractions correspondant au 2^{ème} pic ont donné des temps de floculation appréciables : 8 à 50 mn selon les fractions. Les fractions correspondant aux autres pics ont des maximum d'absorption inférieurs à 250 nm et donnent sur du lait reconstitué des temps de floculation supérieur à 2 H. Sur la figure 2_a est représenté le spectre UV avec les dérivés 1^{ère} et 2nd. Ces courbes dérivées montrent clairement que le maximum d'absorption se situe bien à 278 nm. La figure 2_b représente le spectre d'émission de fluorescence avec un maximum d'émission de fluorescence au voisinage de 330 nm. La figure 3 représente un thermogramme avec son pic de dénaturation. Pour les 4 essais, la température au sommet de ces pics est de $87,4 \pm 0,5$ °C. La photographie de l'électrophorèse

d'un de l'extrait de l'*Ongokea gore* est donnée sur la figure 4 ; on y compte quatre bandes protéiques ; ces protéines ont des masses moléculaires de 14,5, 42, 43 et 94 kDa.

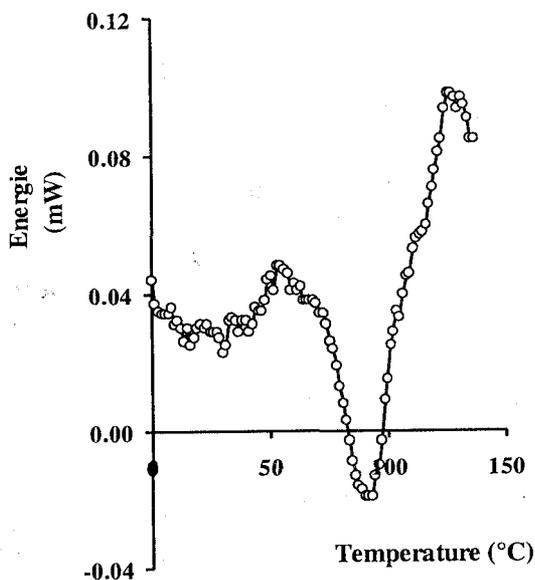


Figure 3 : Thermogramme d'un aliquote (127,2 mg) de l'extrait re-chromatographié des écorces de l'*Ongokea gore*.

Le tampon est de l'acide N-2 Hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonique 15 mM, pH 7,5. Température initiale du four 5 °C, température finale 130 °C ; cinétique 3,0 °C / mn; fréquence d'échantillonnage: une mesure toutes les 0,80 s.

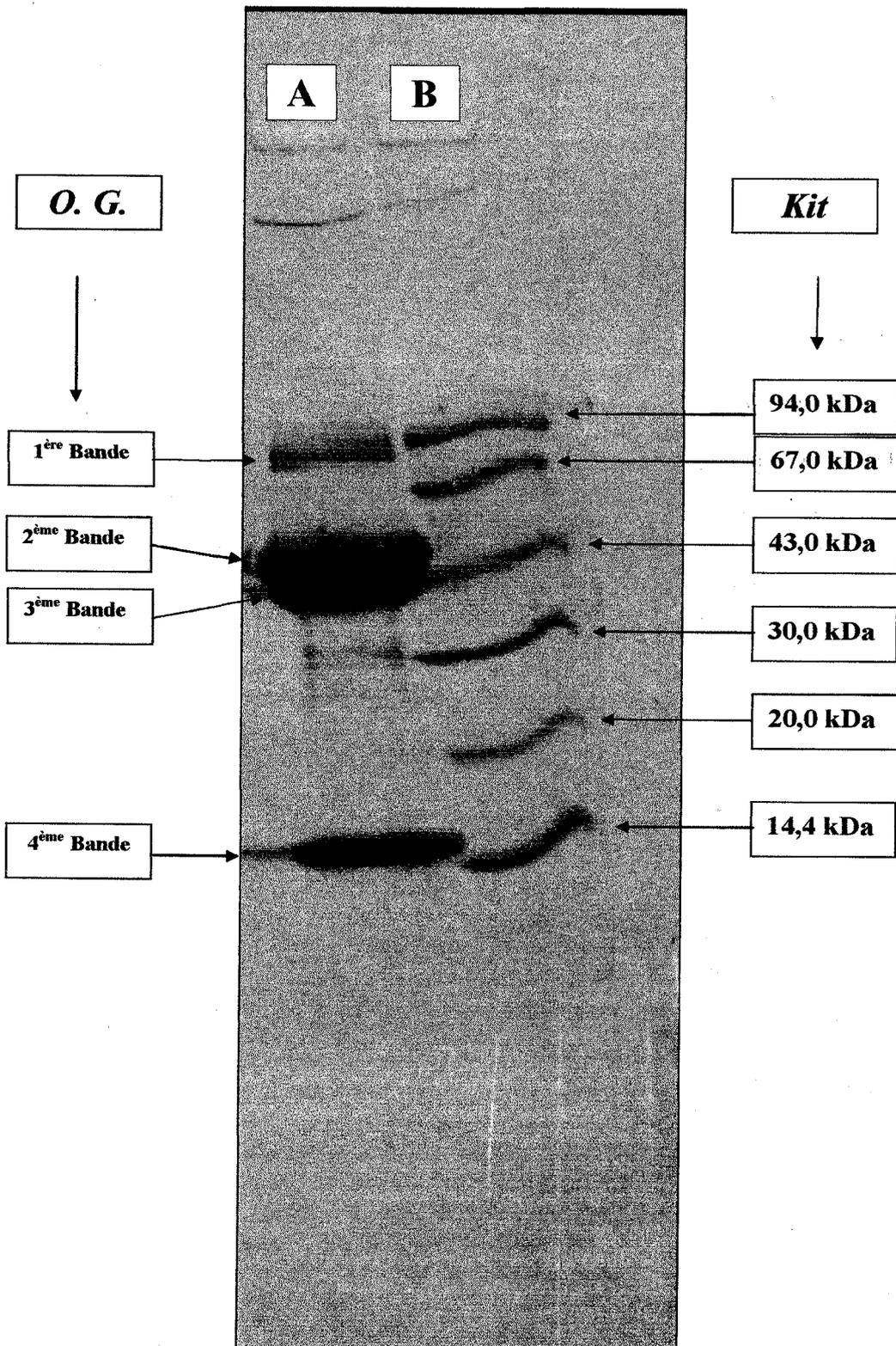


Figure 4 : Electrophorèse d'un aliquote de l'extrait re-chromatographié des écorces de l'*Ongokea gore*. L'électrophorèse est faite en présence d'un gradient de concentration de polyacrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS) sans agent dénaturant. La coloration du gel a été faite avec du bleu de Coomassie dans l'acide trichloracétique à 12,5 % puis la décoloration par l'acide acétique à 5 et 10 %. Les protéines de référence (Kit *Electrophoresis* de *Pharmacia Fine Chemicals*) sont l' α lactalbumine (14 kDa), l'inhibiteur trypsique (20 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), la serum albumine bovine (67 kDa) et la phosphorylase b (94 kDa). Le symbole **O. G.** indique l'*Ongokea gore* ; La lettre **A** indique le puits contenant l'extrait chromatographié des écorces de l'*Ongokea gore* et **B** celui contenant le kit des protéines de référence.

DISCUSSION

L'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* contient quatre groupes de substances parmi lesquelles se trouvent les tannins catéchiques décrits par VILLIERS (1973). Plusieurs auteurs (ÖNER et AKAR, 1993) ont aussi parlé de la composition hétérogène des extraits de *Ficus carica*. Une activité coagulante appréciable (temps de floculation inférieure à 1 h) n'a été retrouvée que dans les fractions correspondant au 2^{ème} pic. La re-chromatographie du mélange des fractions de ce 2^{ème} pic a donné un pic asymétrique traduisant l'hétérogénéité de la composition : on y trouve des substances de masse moléculaires voisines. Certaines ou toutes ces substances donnent le spectre UV classique des protéines avec un maximum au voisinage de 278 nm (présence de la tyrosine et du tryptophane). La forte turbidité observée est due à la présence des chromophores dans la solution. Les spectres des dérivés 1^{ère} et 2nd de la courbe d'absorbance montrent sans ambiguïté qu'il existe un seul maximum ; il est logique de penser à la présence des protéines de composition très voisine. Des tels cas des protéines ayant des propriétés très voisines ont été rencontrés dans les extraits de *Cynara cardunculus* (CORDEIRO *et al.*, 1994). ÖNER et AKAR (1993) ont obtenu plusieurs fractions à partir du latex des plantes. Le spectre de fluorimétrie avec son maximum d'émission autour de 330 nm témoigne de la présence des résidus de tyrosine et de tryptophane donc des protéines. Les bandes obtenues par électrophorèse ainsi que leur nombre indiquent la présence de plusieurs substances protéiques. Le fractionnement des extraits de *Cynara cardunculus* (CORDEIRO *et al.*, 1992 ; LLORENTE *et al.*, 1997), et de *Onopordum turcicum* (TAMER, 1993) ont conduit à l'obtention des protéines enzymatiques et dans le cas de *Cynara cardunculus* CORDEIRO *et al.*, (1994) ont parlé de « cynarase 1, 2 et 3 ». La fraction active des extraits des écorces de *Ongokea gore* pourrait être constituée de 4 protéines de masse moléculaire 94, 43, 42, et 14,5 kDa que l'on pourrait aussi appeler « ongokease 1, 2, 3 et 4 ». Ces masses moléculaires sont grossièrement divisibles par 15, ce qui laisse également penser à des oligomères. La cyproline, protéine extraite des fleurs du *Cynara cardunculus* a une structure oligomérique (CORDEIRO *et al.*, 1994). Il est aussi possible que l'auto-digestion soit à l'origine de l'apparition de certaines bandes ; une telle auto-digestion a été signalée par ASAKURA *et al.*, (1997) au cours de la purification des protéinase des grains de riz. Des enzymes protéolytiques extraites des plantes ont des masses moléculaires voisines de 21 kDa pour la protéase extraite de *Albizia julibrissim* (OTANI *et*

al., 1991,) entre 19 et 24 kDa pour *Onopordum turcicum* (TAMER, 1993), 49 kDa pour *Cynara cardunculus* (FIGUEIREDO et PAIS, 1990) et entre 53 et 57 kDa dans les grains de riz (ASAKURA *et al.*, 1997). Une ou plusieurs des protéines actives de l'*Ongokea gore* sont dénaturées par la chaleur au voisinage de 87,4 °C alors qu'une enzyme très répandue dans le monde végétal, la ribulose 1,5-biphosphate carboxylase / oxygénase est déjà dénaturée à 67,5 °C (BÉGHIN *et al.*, 1993).

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie T. Ngo Bôm Kônde et C.G. Libouga pour la fourniture gracieuse des écorces de l'*Ongokea gore*, M. Ngo Libouga pour la documentation J. C. Milol pour la collaboration technique et L. Ngo Nken Libouga pour la dactylographie.

RÉFÉRENCES

- ANIFANTAKIS M. et GREEN M. L. (1980) Preparation and properties of rennets from lamb's and kid's abomasa. J. Dairy Res. 47, 221-230.
- ASAKURA T., WATANABE H., ABE K., ARAI S. (1997) Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterisation and application to milk clotting. J. Agric. Food Chem. 45, 1070-1075.
- BÉGHIN V., BIZOT H., AUDDREBRAND M., LIBOUGA D. G., DOUILLARD, R. (1993) Differential scanning calorimetric studies of the effects of ions and pH on ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase. Int. J. Biol. Macromol. 15, 195-200.
- BROOME M. C., LIMSOWTIN G. K. Y. (1998) Milk coagulants. Australian Journal of Dairy Technology 53, 188-190.
- CAMPOS R., GUERRA R., AGUILAR M., VENTURA O., CAMACHO L. (1990) Chemical characterisation of protease extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus*). Food Chem. 35, 89-98.
- CARDOSO P., DOMINGOS A., CLEMENTE A., PAIS M. S. (1998) Studies on degradation of aspartic proteinases with milk clotting activity from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent. 63 (4B), 1607-1611.
- CORDEIRO M., JAKOB E., PUHAN Z., PAIS M. S., BRODELIUS P. E. (1992) Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarase from *Cynara cardunculus*: a comparison to chymosin. Milchwissenschaft 47, 681-687.

- CORDEIRO M. C., PAIS M. S., BRODELIUS P. E. (1994) Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum* 92, 645-653.
- DÉTIENNE P. (1991) Clé de reconnaissance par les feuilles des légumineuses des forêts du Cameroun, Congo, Gabon, et de la République Centrafricaine. *Bois For. Trop.* 230, 39-52.
- FARO C. J., MOIR A. J. G., PIRES E. V. (1992) Specificity of a milk clotting enzyme extracted from the thistle *Cynara cardunculus* L.: Action of oxidised insulin and κ casein. *Biotechnol. Lett.* 14, 841-846.
- FIGUEIREDO A. C. D. J., PAIS M. S. S. (1990) Purification and partial characterization of milk clotting of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry (Oxford)* 29, 1405-1410.
- HARRIS E. L. V. ; and ANGAL S. (1995) **Protein Purification Methods**. The Practical Approach Series. Editors Rickwood D. and Hames D. Editors IRL Press at Oxford University Press.
- HEIMGARTNER U., PIETRZAK M., GEERSTEN R., BRODELIUS P., FIGUEIREDO A. C. D. S., PAIS M. S. S. (1990) Purification and partial characterization of milk clotting protease from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry (Oxford)* 29, 1405-1410.
- LETOUZEY R. (1968) *Les Botanistes au Cameroun in Flore du Cameroun* Volume 7 Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, p. 79.
- LIBOUGA D. G., WOMENI H. ET BITJOKA L. (2002) Extrait des écorces de l'*Ongokea gore* : protéolyse et conservation. *Journal of the Cameroon Academy of Sciences* 2, 96-106.
- LLORENTE B. E., BRUTTI C. B., NATALUCCI C. L., CAFFINI N. O. (1997) Partial characterization of a milk clotting proteinase isolated from artichoke (*Cynara scolymus* L., Asteraceae). *Acta Farm. Bonaer.* 16, 37-42.
- LOPES A., TEIXEIRA G., LIBERATO M. C., PAIS M. S., CLEMENTE A. (1998) New vegetal sources of milk clotting enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic.* 5, 63-68.
- MACEDO I. Q., FARO C. J., PIRES E. M. (1993) Specificity and kinetics of milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine kappa-casein. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1537-1540.
- OMOKOLO N. D., BOUDJEKO T., NIEMENAK N. et DJOCGOUE P. F. (2000) Activités chitinases et β (1,3) glucanases dans les racines de *Xanthosoma sagittifolium* infectées par *Pythium myriophyllum*. *Biosciences Proceedings* 7, 446-458.
- ÖNER M. D., AKAR B. (1993) Separation of proteolytic enzymes from tree latex and its utilization in Gaziantep cheese production. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 26, 318-321.
- OTANI H., IWAGAKI M., HOSONO A. (1991) The screening of trees having milk clotting activity. *Anim. Sci. Technol.* 62, 417-423.
- OTANI H., MATSUMORI M., HOSONA A. (1991) Purification and some properties of a milk clotting protease from young seeds of *Albizia julibrissin*. *Anim. Sci. Technol.* 62, 424-432.
- TAMER I. M. (1993) Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnol. Lett.* 15, 427-432.
- TSUNODA K. (1990) The natural resistance of tropical woods against biodeterioration. *Wood Res.* 0, 18-27.
- UCHIKOBA T. et KANEDA-M. (1996) Milk-clotting activity of cucumisin, a plant serine protease from melon fruit. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 56, 325-330.
- VILLIERS J. F. (1973) **Icacinacées, Olacacées, Pentadiplandracées, Opiliacées, Octoknémacées**, Laboratoire de Phanérogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.
- YOUSIF B. H., McMAHON D. J., SHAMMET K. M. (1996) Milk clotting enzyme from *Solanum dubium* plant. *Int. Dairy J.* 6, 637-644.

Received: 01/05/02

Accepted: 12/09/03