مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد 41 (العدد3): الصفحات: 1 – 11

Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vol 41 No. (3):PP: 1 - 11

التنقية الجزئية للبروتياز المنتج من Rhizomucor miehei ودراسة بعض الخواص التكنولوجية

هُذيل الاحمد الجماس[1*] صباح نسيم يازجي[2] عبد الحكيم فهد عزيزية[3]

*1طالب دكتوراه، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق
h.jammas@damascusuniversity.edu.sy
2 أستاذ في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق
sabah.yazji@damascusuniversity.edu.sy
3 أستاذ في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق
a.azizieh@damascusuniversity.edu.sy

تاريخ الايداع: 5/ 4/2023
تاريخ القبول: 24/ 5/ 2023

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب CCBY-NC-SA

الملخص:

هدَفَ البحث إلى دراسة جدوى استخدام البروتياز المنتج من عزلة محلية للفطر Rhizomucor miehei في صناعة الجبن الأبيض بعد تنقيته جزئياً كبديل لمنفحة العجول مكلفة الإنتاج. إذ أُجريت التنقية الجزئية للأنزيم الخام باستخدام عمود التنقية Sephadex-G100. وقورنت المؤشرات الأنزيمية للبروتياز الفطري المُنقَّى جزئياً وحدة سوكسلت/مغ، وبحصيلة أنزيمية مقدارها 4.9%. كما تفَوَّق بروتياز Rhizomucor miehei من حيث نشاط التخثُّر النوعي، ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين، إذ بلغت قيم هذه المؤشرات 3756.18 وحدة سوكسلت/مغ، و362.50 بالمقارنة مع 1576.01 وحدة سوكسلت/مغ، و58.64 على التوالي في المنفحة التجارية. استُخدِمَ البروتياز الفطري في صناعة الجبن الأبيض وفقاً للطريقة التقليدية، وحُدِّدَت النسبة المثلى لإضافة الأنزيم إلى الحليب بناءً على المردود والخواص الحسيَّة للجبن المُنتَج، حيث بلغت 6000 وحدة سوكسلت/مغ. وقد أظهر الجبن المُنتَج باستخدام البروتياز الفطري المنقى جزئياً تقارباً كبيراً مع الجبن المُنتَج باستخدام المنفحة التجارية من حيث المردود الناتج، والخواص الحسيَّة.

الكلمات المفتاحية: بروتياز، تنقية جزئية، جبن أبيض، نشاط تخثُّر الحليب، نشاط حالّ للبروتين، Rhizomucor miehei.

Partial purification and some technological properties of Rhizomucor miehei protease

Houthail Alahmad Aljammas[1]* Sabah Nasim Yazji[2] Abdulhakim Fahdazizieh[3]

[1*] PhD student, Department of Food Sciences, Faculty of Agricultural Engineering, Damascus University, Syriah.jammas@damascusuniversity.edu.sy

[2] Prof, Department of Food Sciences, Faculty of Agricultural Engineering, Damascus University, Syria yazji@damascusuniversity.edu.sy

[3] Prof, Department of Food Sciences, Faculty of Agricultural Engineering, Damascus University, Syria a.azizieh@damascusuniversity.edu.sy

Received: 5/ 4/ 2023
Accepted: 24/ 5/ 2023

Copyright:Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract:

The research aimed to study the feasibility of using the protease from a local isolate of Rhizomucor miehei in cheese-making as a substitute to calf rennet, that is expensive to produce. The partial purification for the crude enzyme was conducted by using gel filtration column (Sephadex G-100). The enzymatic indices of the partially purified fungal protease were compared with those of the commercial rennet. The results showed an increase in the specific activity of the purified enzyme, as it reached 3756.18 Soxhlet unit (SU)/mg, with a recovery of 4.9%. The protease from Rhizomucor miehei exhibited superior specific milk-clotting activity and milk-clotting activity/ proteolytic activity ratio, where they reached 3756.18 SU/mg, and 362.50, respectively compared to 1576.01 SU/mg and 58.64, respectively, in the commercial rennet. The fungal protease was used in the production of white cheese according to the traditional method, where the optimal enzyme-to-milk ratio was determined for the yield and sensory properties of the resulted cheese, which was estimated at 6000 SU/L. Cheese made by using the partially purified fungal protease was quite similar to cheese made by using commercial rennet, in terms of yield and sensory properties.

Keywords: Milk-Clotting Activity, Partial Purification, Protease, Proteolytic Activity, Rhizomucor Miehei, White Cheese.

المقدمة:

تُشكِّل الأجبان عنصراً أساسياً في النظام الغذائي للإنسان، وتبرز الأهمية الغذائية للجبن من خلال محتواها العالي من البروتينات، والأحماض الأمينية، والدهون، والأحماض الدهنية، والكالسيوم، والعناصر المعدنية الأخرى كالفسفور، والزنك، والمغنيزيوم، والحديد، والفيتامينات A، وD، وB2، وB12 (United States Department of Agriculture, 2019; Walther et al., 2010, 38). يستخدم البروتياز في صناعات الألبان وخاصّة في الأجبان (Rao et al., 1998, 607)، وتتمثَّل الوظيفة الأساسيَّة للبروتياز في البدء بعملية تخثُّر الحليب، من خلال الفصل السريع وعالي التَّخصُّص للبروتينات الرئيسة في الحليب (الكازئين) (Visser, 1993, 330).

تُعدّ منفحة العجول الشكل الأكثر استخداماً لأنزيمات تخثر الحليب، ويُشكِّل الكيموزين المكوِّن الأساسي للمنفحة، كما تحتوي على البيبسين (Pepsin A, Pepsin B) والجاستريسين (Pepsin C). وتختلف نسب المكوِّنات بحسب عمر العجول، والتغذية، وطريقة الاستخلاص (Foltmann, 1993, 37, 62-63; Abd-El Salam and Benkerroum, 2006, 174).

يجب أن يقوم الأنزيم المُخثِّر من الناحية المثالية بفصل الرابطة Phe105-Met106 في كازئين كابا خلال عملية تخثُّر الحليب، وبفصل لاحق للكازئينات حصراً بعد الفصل التام للمصل. وبهذه الحالة يمكن استرداد الكازئين للحدّ الأقصى وزيادة مردود الأجبان. أمّا المستوى المرتفع لتحلُّل البروتينات غير المُحدَّد (النشاط البروتيوليتي)، فيمكن أن يؤدِّي إلى تكوين خثرة ذات بنية ضعيفة وفقد كبير للبروتينات والدهن في المصل وانخفاض مردود الجبن. يُبدي الكيموزين نشاط بروتيوليتي منخفض ويظهر تأثيره بشكلٍ خاصّ في كازئين كابا خلال مرحلة التخثُّر، بينما يظهر نشاط بروتيوليتي عام مرتفع في المخثرات الأخرى في كلٍ من كابا كازئين، وبارا كابا كازئين. وتختلف الأنزيمات بنسبة نشاط تخثُّر الحليب إلى النشاط البروتيوليتي، وبالتالي اختلاف مقدار تحلل الكازئين بالاعتماد على زمن تماس الخثرة مع المصل وpH الخثرة عند تصريف المصل، إذ تُفقَد نواتج تحليل الكازئين مع المصل خلال تصريفه (Horne and Lucey, 2017, 121; Fox et al., 2017, 315).

يزداد الإنتاج العالمي للأجبان سنوياً، إذ بلغ مُعدَّل نموّ الإنتاج خلال السنوات الأخيرة حوالي 1.78% سنوياً، وبلغ الإنتاج العالمي للأجبان عام 2021 حوالي 22.08 مليون طن (Shahbandeh, 2022, para. 1).

أدَّى الانخفاض العام في عدد العجول المتاحة للذبح نتيجة الرغبة في الحصول على اللحم إلى انخفاض العرض على المنفحة وغلاء سعرها. كما أنَّ الازدياد الملحوظ في إنتاج الأجبان قاد إلى استنفاذ مصادر المنفحة التقليدية المتوفرة. حفزَّت هذه الحالة البحث عن مصادر بديلة لتغطية الاحتياجات المتزايدة من المنفحة لصناعات الأجبان (Andre´n, 2011, 576; Quaglia and Gennaro, 2003, 2133-2134; Uniacke-Lowe and Fox, 2017, 92). استُخدِمَت المُخثِّرات الحيوانية الأخرى كبديل أقل تكلفة بالإضافة إلى المُخثِّرات النباتية، كما استخدمت المُخثِّرات الميكروبية والتي لاقت انتشاراً واسعاً. وبالرّغم من إظهار العديد من الأنزيمات القدرة على تخثير الحليب فإنَّ أغلبها لا يصلح لأن يكون بديلاً لمنفحة العجول حيث تبدي نشاط حالّ للبروتين (بروتيوليتي) مرتفع (Law, 2002, 92-94).

يعتبر بروتياز فطر Rhizomucor miehei (Mucorpepsin; EC 3. 4. 23. 23) البديل المفضل للمنفحة، إذ يُظهِر الأنزيم نشاط تخثر مرتفع نسبةً إلى النشاط البروتيوليتي، وتخصُّص دقيق في فصل الروابط الببتيدية المماثلة في كازئين كابا Phe105-Meth106 والتي يقوم الكيموزين بتفكيكها، كما يُبدي فعالية مُثلى واستقرار عند قيم الـ pH ودرجات الحرارة المستخدمة في معاملات تصنيع الأجبان، واحتياجات كالسيوم مماثلة. بالإضافة إلى جودة جبن عالية، والاحتمال الضئيل لظهور المذاق المُرّ. ويُستخدم الأنزيم بنجاح للعديد من أنواع الأجبان (Scott et al., 1998, 155).

هدَفَ البحث إلى تنقية البروتياز المنتج من عزلة محلية للفطر Rhizomucor miehei، ودراسة بعض الخواص التكنولوجية للمُحضَّر الأنزيمي بالمقارنة مع المنفحة التجارية.

مواد البحث وطرائقه:

أُجريت الدراسة عام 2022 في مخابر قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة بجامعة دمشق، ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

– **الحليب:** استخدم حليب الأبقار الخامّ لعملية تصنيع الجبن، وقد تمَّ الحصول عليه من مزرعة أبي جرش التابعة لكلية الزراعة في جامعة دمشق.

– **المنفحة التجارية:** استُخدمت أقراص المنفحة التِّجاريَّة Chr. Hansen; BioRen® 97T100 دانماركية المنشأ (وزن القرص 0.5 غ، الفعاليّة الأنزيمية للقرص 100000 (±5%) وحدة سوكسلت، المكوِّنات الأنزيمية: 94–100% كيموزين و0–6% ببسين)، للمقارنة مع المُحضَّر الأنزيمي المُنتَج من العزلات الفطرية. وقد قورنت المؤشِّرات الأنزيمية لكلٍ من المُحضَّرين، كما قورن المردود والخواصّ الحسيّة للجبن الأبيض المُصنَّع بوساطة كل منهما.

تحضير المُخثِّر الفطري:

- **إنتاج البروتياز بالتخمُّر:** استُخدِمَ البروتياز الخام المنتج من عزلة محلية للفطر R. miehei في وسط تخمر صلب استُخدمت فيه نخالة القمح كركيزة أساسية، وأضيف الكازئين بنسبة 1.34%، كما تمّ تحضير محلول ملحي معدني يحوي (غ/ل): $ZnSO_4$. $7H_2O$: 0.07, $MgSO_4$.7H2O: 0.07, $CuSO_4$. $7H_2O$: 0.07, $FeSO_4$: 0.09

مُدِّدَ 10 مل من هذا المحلول إلى 1 لتر، واستُخدم المحلول الأخير لترطيب وسط التخمر بنسبة 80%، وزِّعَ كل 20 غ من وسط التخمر في دورق Erlenmeyer (250 مل)، سُدَّت الدوارق بالقطن وعُقِّمت بالأوتوكلاف عند درجة 121 م° لمدة 20 دقيقة، بعد التبريد حُقِنت الدوارق تحت ظروف معقمة بـ 10% أو ما يعادل 2 مل من مُعلَّق الأبواغ (10^7 بوغة/مل). وأنجز التخمر لمدة 82 ساعة، عند درجة حرارة 40 م° (Aljammas et al., 2022, 1-13).

بعد إتمام التخمر أضيفت 100 مل ماء مقطر (4 م°) إلى وسط التخمر ووضعت الدوارق على هزّاز (New Brunswick Scientific، أمريكي المنشأ) بسرعة 220 دورة/د لمدة ساعة واحدة، وتمَّ فصل الوسط الصلب والميسيليوم عن الوسط المُذيب باستخدام ورق ترشيح Whatman paper No1، ولتصفية المستخلص الأنزيمي عُرِّض للطرد المركزي 5000 دورة/د لمدة 20 دقيقة باستخدام جهاز تثفيل مُبرّد (Heraeus، ألماني المنشأ)، وفُصلت الرشاحة لتقدير المحتوى والنشاط الأنزيمي وإجراء خطوات التنقية (Fernández-Lahore et al., 1998, 84).

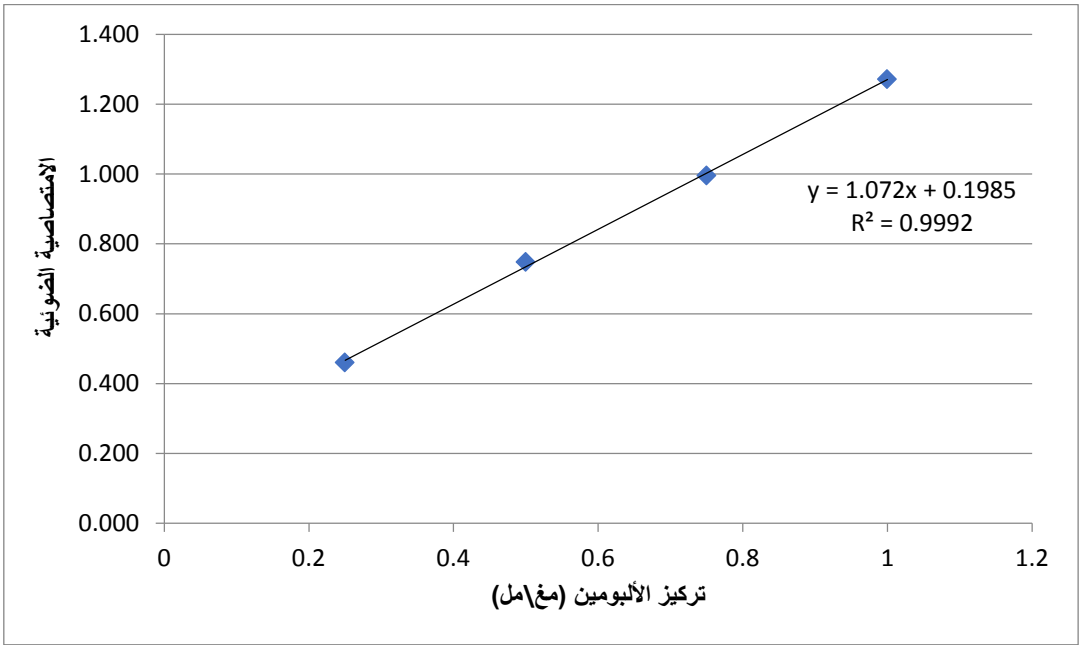
التنقية الجزئية للمستخلص الأنزيمي:

– **الترسيب بكبريتات الأمونيوم:** تمَّ ترسيب البروتينات في المُحضَّر الأنزيمي الخام وفقاً لما ذكره Iwasaki وزملاؤه (1967، 547)، و Kazemi-Vaysari (2002، 100–101) وزملاؤه، و Nooralabettu (2014، 9). وقد أُضيفت بلُّورات كبريتات الأمونيوم إلى المُحضَّر ببطء مع التحريك المستمرّ باستخدام مُحرِّك مغناطيسيّ عند درجة حرارة 4 م° حتى الوصول إلى درجة تشبُّع 75%. تُرك المحلول الناتج تحت التبريد (2–4 م°) لمُدَّة 24 ساعة لرفع نسبة الترسيب. ثُمَّ فُصِلَ الراسب عن السائل الرائق بالطرد المركزي بسرعة 10000 دورة/د لمُدَّة 20 دقيقة، وأضيفت 10 مل من محلول موقي الفوسفات (0.02 M, pH 6) إلى الراسب. وحُفظ محلول الراسب البروتيني عند درجة حرارة 4 م° للاستخدام لاحقاً، كما قُدِّرَ المحتوى البروتيني والنشاط الأنزيمي في جميع مراحل التنقية.

– **التنقية بكروماتوغرافيا النخل الجزيئي:** أُجريت وفقاً لما ذكره Karcher (1995، 170–171)؛ و Abdelouahab وزملاؤه (2015، 349). وقد حُضِّر هلام الترشيح بإضافة 150 مل من محلول موقي الفوسفات (0.02 M; pH 6) إلى 5 غ من حبيبات الديكستران (Sephadex G100- Sigma-Aldrich- USA)، وتَرك المُعلَّق الناتج لمُدَّة 48 ساعة عند درجة حرارة 4 م° للوصول إلى الانتفاخ الكامل للحبيبات. وفُرِّغ الهلام المُتشكِّل من الغازات باستخدام مضخَّة تفريغ، ثُمَّ سُكِب بلطف في عمود زجاجي بأبعاد (30 × 2.6 سم) مع تجنُّب ظهور الفقاعات. غُسل العمود مرَّتين، وتمَّت موازنته باستخدام موقي الفوسفات بمُعدَّل جريان 1

مل/دقيقة. حُقنت 3 مل من محلول الراسب البروتيني المُحضَّر وفق الخطوة السابقة في الجزء العلوي لعمود الترشيح، مع إمرار موقي الفوسفات، وجُمِعَت أجزاء العينة المُسرِّبة من أسفل العمود بمُعدَّل 1 مل للجزء الواحد، وقيست الامتصاصية للأجزاء المُجمَّعة عند طول موجة 280 نانومتر باستخدام مطياف الأشعة فوق البنفسجيَّة (Optizen، كوري المنشأ)، وقُدِّرت الفعالية الأنزيمية للأجزاء المُشكِّلة للقمم البروتينية، ثُمَّ جُمعت الأجزاء ذات الفعاليّة المرتفعة لتوصيف المُحضَّر الأنزيمي الناتج.

تحديد المحتوى البروتيني: حُدِّدَ المحتوى البروتيني للمستخلص الأنزيمي باستخدام طريقة Lowry وزملائه (1951، 265-266)، بقياس الامتصاصية عند طول موجة 750 نانومتر باستخدام مطياف الأشعّة المرئيّة (Secomam ، فرنسي المنشأ)، وباعتماد ألبومين المصل البقري كمنحني قياسي (الشكل 1).



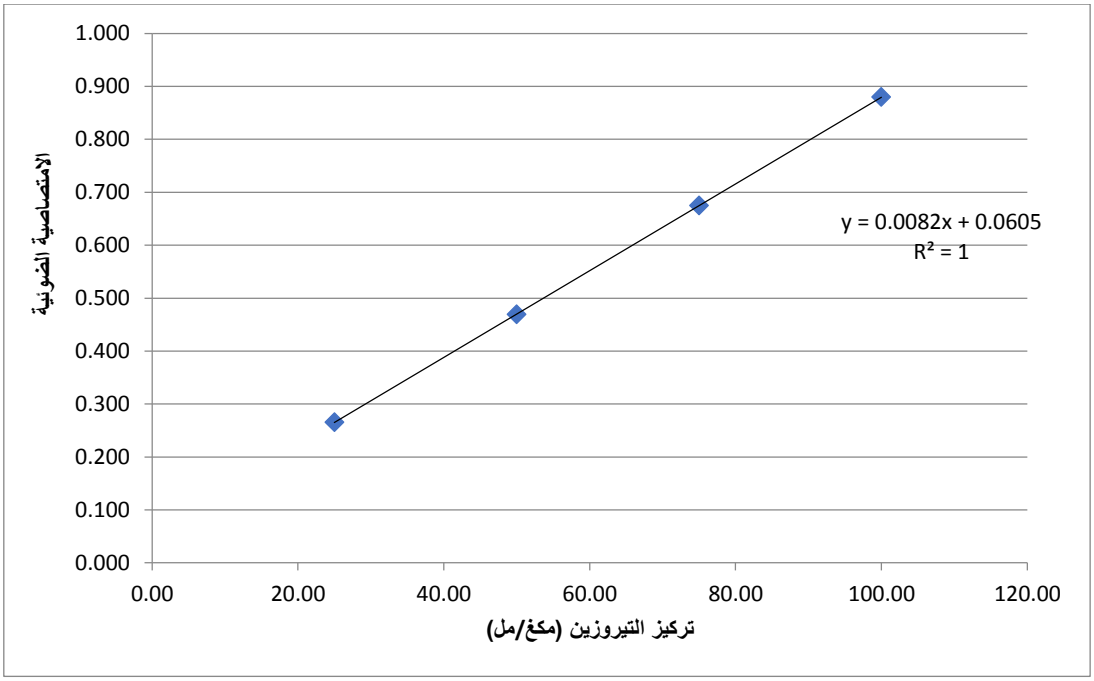
الشكل 1: المنحني القياسي للألبومين

تحديد النشاط الأنزيمي:

– **قدرة الأنزيم على تخثير الحليب (نشاط التخثُّر):** حُدِّدَ تبعاً لطريقة Arima وزملائه (1967، 541–542)، وعُبِّرَ عنه بوحدة سوكسلت. وتُعرَّف بأنَّها كمِّيّة الأنزيم التي تُخثِّر 1 مل من محلول يحوي 0.1 غ مسحوق حليب مقشود و0.0014 غ كلوريد الكالسيوم خلال 40 دقيقة عند درجة حرارة 35 م°.

– **قدرة الأنزيم على حلمهة البروتين (النشاط البروتيوليتي):** حُدِّدَ عن طريق تقدير هضم الكازئين تبعاً لطريقة Kunitz (1947، 306-308). وقد أُضيف 1 مل من المستخلص الأنزيمي المُنقَّى إلى 1 مل من محلول الكازئين (1 % في 0.1 M محلول موقي فوسفاتي Sorensen ، pH 6)، وحُضِّنَ عند درجة حرارة 35 م° لمُدَّة 20 دقيقة، ثم أُضيفت 3 مل من محلول 5 % لحمض الخليك ثلاثي الكلور (TCA) لإيقاف التفاعل وترسيب الكازئين المتبقّي. وحُضِّرَ محلول الشاهد بالطريقة نفسها، عدا إضافة TCA إلى محلول التفاعل قبل إضافة المحلول الأنزيمي، وتُركت المحاليل لمُدَّة ساعة عند درجة حرارة 25 م°، ثم ثُفِّلت بسرعة 5000 دورة/د لمُدَّة 10 دقائق. وبعد الترشيح قُدِّرَ المحتوى من الأحماض الأمينية والببتيدات المتحرِّرة في المحلول الرائق باستخدام طريقة Lowry وزملائه (1951، 265-266) عند طول موجة 750 نانومتر وباستخدام منحني قياسي للتيروزين (الشكل 2). وعُبِّر عن النشاط البروتيوليتي بوحدة بروتياز، وهي الفعاليّة التي تؤدّي إلى تحرير 1 مكروغرام من التيروزين في الدَّقيقة الواحدة تحت ظروف القياس.

– **الفعالية النَّوعيّة للأنزيم:** وهي عدد وحدات الفعالية الأنزيمية لكل 1 مغ من الأنزيم.



الشكل 2: المنحني القياسي للتيروزين

– استخدام المُحضَّر الأنزيمي في تصنيع الجبن والمقارنة بالمنفحة التجارية:

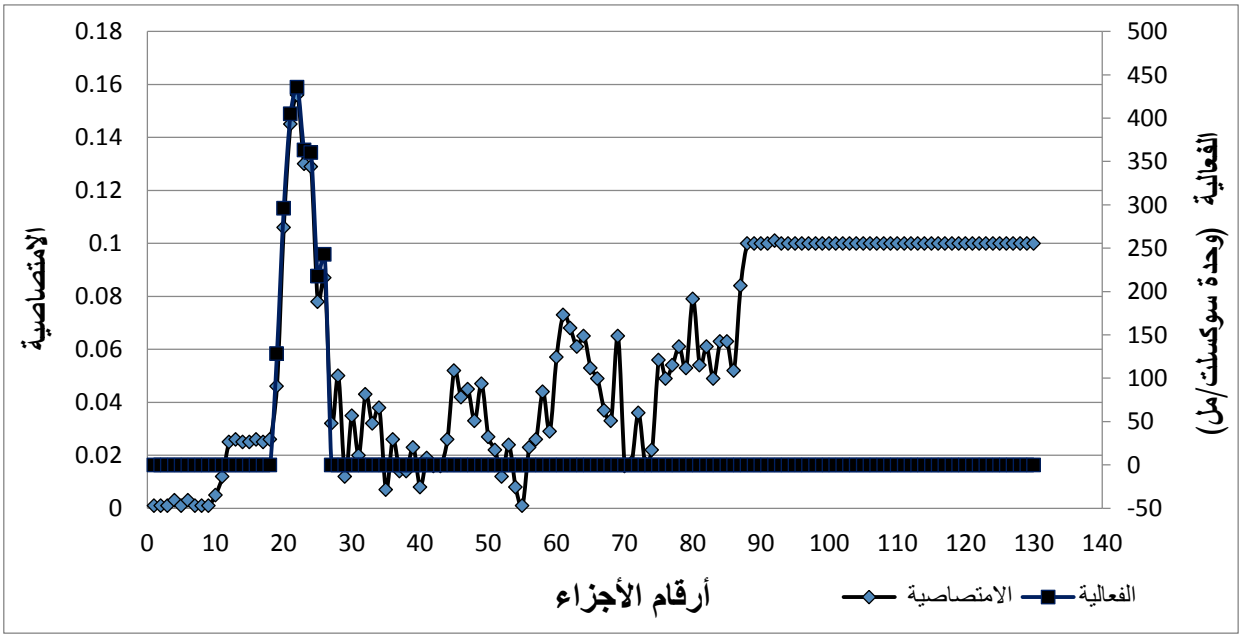
صُنِّعَ الجبن الأبيض وفقاً للطريقة التقليديّة السورية باستخدام البروتياز الفطري والمنفحة التِّجاريَّة Chr. Hansen BioRen® 97T100 كلّ على حدة، تبعاً لما ذكره أبو غرّة وزملاؤه (2010، 253)، وبحسب تعليمات الشركة المُصنِّعة للمنفحة (Chr. Hansen, 2019, 1-4). إذ عُدِّلت درجة حرارة الحليب إلى 38±2 م°، وأُضيف كلوريد الكالسيوم إلى الحليب بنسبة 1.4 غ/ل، ثُمَّ أُضيفت المنفحة بمُعدَّل 5000 وحدة سوكسلت لكل 1 لتر من الحليب (قرص لكل 20 لتر) بعد إذابتها في الماء بنسبة 50:1 مع تحريك الحليب لمُدَّة 2–3 دقائق عند كل إضافة، ثُمَّ حُضِّنَ الحليب عند درجة حرارة 38±2 م° لمُدَّة ساعة واحدة. قُطِّعَت الخثرة الناتجة يدوياً باستخدام آلة حادَّة، وتُركت بعد التقطيع لمدّة 15 دقيقة، ثُمَّ فُصِلَت الخثرة عن المصل بوساطة مصفاة مفروشة بنسيج شاش قطني. وتمَّ كبس الخثرة باستخدام ثقل مناسب لمُدَّة ساعتين لفصل أكبر كمِّيّة من المصل، وإعطاء الشكل المطلوب. أُجري التمليح الجافّ للأقراص الناتجة، وحُفِظَت عند درجة حرارة 4 م° لحين إجراء التقييم الحسِّيّ. صُنِّعَ الجبن باستخدام المُخثِّر الفطري بالطريقة السابقة نفسها بعد تحديد النسبة المُثلى لإضافة المُخثِّر. وقد أُضيفَ المُخثِّر إلى الحليب ضمن النسب 3000–7000 وحدة سوكسلت لكل 1 لتر من الحليب، وحُدِّدَت الإضافة المثلى بناءً على مردود الخثرة والتقييم الحسِّيّ لها. قُطِّعَ الجبن المُصنَّع باستخدام كلٍ من المنفحة والمُخثِّر الفطري ووضِعَت داخل الماء المغلي لمُدَّة 6 دقائق، ثُمَّ بُرِّدَت قبل تقديمها للتقييم الحسِّيّ. أُجري التقييم الحسِّيّ من قبل لجنة مكوَّنة من 20 مُحكِّم وفقاً لأسلوب الجمعية الأمريكية للأجبان (American Cheese Society, 2018, 4-36)، ووفقاً لما ذكره Clark و Costello (2009، 62–70)، إذ أُعطيَت 7 نقاط للرائحة، و30 نقطة للنكهة، و7 نقاط للقوام والملمس، و10 نقاط للمظهر الخارجي.

النتائج والمناقشة:

يُبيِّن الجدول 1 ملخصاً لخطوات التنقية. وقد أدَّى ترسيب البروتياز بسلفات الأمونيوم إلى ارتفاع الفعاليّة الأنزيمية بمقدار 5.92 أضعاف، تُقارب هذه النسبة تلك التي أشار إليها Amer وزملاؤه (2015، 1075) "5.31" عند ترسيب بروتياز Rhizomucor miehei بسلفات الأمونيوم، وتَفوق هذه النسبة درجة التنقية "3.9" التي أشار إليها Kazemi-Vaysari (2002، 102) وزملاؤه عند استخدام سلفات الأمونيوم عند نسب إشباع مختلفة (20–80%). كما أدَّى فصل الراسب الناتج على عمود الترشيح إلى ازدياد الفعاليّة النَّوعيّة للبروتياز وانخفاض في المحتوى البروتيني، ويعود ذلك لاستبعاد البروتينات ذات الأوزان الجزيئيّة المُغايرة في المُحضَّر الأنزيمي خلال مراحل التنقية. ويُبيِّن الشكل 3 قيم الامتصاصية الضَّوئيَّة والفعاليّة الأنزيمية لأجزاء العينة المُجمَّعة من أنبوب التنقية. وقد ظهرت عِدَّة قِمَم بروتينية، وقِمَّة فعاليّة واحدة، وأظهرت الأجزاء 19–26 أعلى امتصاصية للضوء عند طول موجة 280 نانومتر، كما أظهرت هذه الأجزاء ارتفاع في الفعاليّة الأنزيمية، إذ بلغت الفعاليّة الأنزيمية أقصاها 404.99 وحدة سوكسلت/مل في الجزء 22 للقِمَّة البروتينية، بما يُحقِّق تطابق قِمَّتي البروتين والفعاليّة الأنزيمية. وقد أعطى جمع هذه الأجزاء مُحضَّراً أنزيمياً بدرجة نقاوة تعادل 8.5 أضعاف بالمقارنة مع المُحضَّر الأنزيمي الخامّ، وبحصيلة أنزيمية مقدارها 4.9%. ويعود تَشكُّل القمم البروتينية الأخرى إلى وجود بروتينات أُخرى في المُحضَّر الأنزيمي.

الجدول رقم(1): مراحل التنقية للبروتياز المُنتَج من *Rhizomucor miehei*.

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعاليّة الأنزيمية (وحدة سوكسلت/مل)	الفعاليّة الكُلّيّة (وحدة سوكسلت)	تركيز البروتين (مغ/مل)	الفعاليّة النَّوعيّة (وحدة سوكسلت/مغ)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الأنزيمية %
المستخلص الخامّ	68	2258.13	153552.84	5.11	441.90	1	100
الترسيب بسلفات الأمونيوم	10	13548.78	135487.8	5.18	2617.21	5.92	88.24
التنقية بعمود Sephadex G-100	8	282.27	2258.13	0.08	3756.18	8.50	4.9



الشكل 3: قيم الامتصاصية الضَّوئيَّة والفعاليّة الأنزيمية لأجزاء العينة الناتجة عن ترشيح بروتياز Rhizomucor miehei (المُرسَّب بسلفات الأمونيوم)، باستخدام عمود Sephadex-G 100 (بأبعاد 2.6× 30 سم، والموازن بمحلول موقي الفوسفات 0.02 M; pH 6، بمُعدَّل جريان 1 مل/د).

قيست المؤشّرات الخاصّة بالمنفحة التّجاريَّة Chr. Hansen BioRen® 97T100، وقورنت بالمؤشّرات الأنزيمية للمُحضَّر الأنزيمي لبروتياز Rhizomucor miehei المُنقى جزئياً. ويُبيِّن الجدول 2 تَفوّق المُحضَّر الناتج وفق جميع المؤشّرات، إذ تَميَّز المُحضَّر بنشاط تخثُّر نوعيّ مرتفع، ونشاط نوعيّ حال للبروتين منخفض نسبيّاً، ونسبة مرتفعة لنشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين، بالمقارنة مع المُحضَّر التجاري للمنفحة.

الجدول رقم (2): النشاط الأنزيمي للمنفحة التّجاريَّة ومُحضَّر بروتياز *R. miehei*.

المُحضَّر الأنزيمي	نشاط التخثُّر النَّوعيّ (وحدة سوكسلت/مغ)	النشاط الحالّ النَّوعيّ (وحدة بروتياز/مغ)	نشاط التخثُّر / النشاط الحالّ للبروتين
المنفحة التجارية	78.82±1576.01	1.32±26.88	4.75±58.64
مُحضَّر بروتياز R.miehei المُنقّى جزئياً	162.93±3756.18	0.73±10.36	23.26±362.50

يُبَيِّن الجدول 3 نتائج التجارب الأوَّليّة لتحديد نسبة إضافة المُخثِّر الفطري إلى الحليب لصناعة الجبن الأبيض. إذ أعطت الإضافة "6000 وحدة سوكسلت/ل" أعلى مردود للخثرة، بينما انخفض مردود الخثرة بشكل ملحوظ عند النسب الأخرى. كما تأثَّر القوام والشكل الخارجي للجبن المُنتَج بنسبة الإضافة، إذ أعطت النسبة المنخفضة "3000 وحدة سوكسلت/ل" خثرة غير متماسكة ذات قوام مُتفتِّت، بينما كانت الخثرة الناتجة عن نسبة الإضافة المرتفعة "7000 وحدة سوكسلت/ل" ذات قوام قاسي شديد الصلابة. وأظهر الجبن المُنتَج باستخدام النسب المنخفضة (3000 وحدة سوكسلت/ل، و4000 وحدة سوكسلت/ل) احتجازاً أقل للدسم، وانخفاضاً في درجة ظهور النكهة. تترافق النسبة المرتفعة لإضافة البروتياز بنسبة أعلى لتحلل الكازئين خلال المرحلة الأنزيمية للتخثُّر، أو قبل البدء بتجميع الكازئينات وتشكيل الخثرة، ما يؤدِّي إلى تحقيق تنافر أقل للكازئينات وتشكيل خثرة أكثر تماسكاً وبمردود أعلى (Lomholt and Qvist, 1997, 547-548). وتميل الخثرة ذات الشبكة ضعيفة التطوّر إلى فقد الدهن وعدم القدرة على احتجازه (Green and Grandison, 1993, 132). أبدت الخثرة الناتجة عن الإضافة "6000 وحدة سوكسلت/ل" القوام المُتجَبِّن (Curdy)، والنكهة المميّزة لهذا النوع من الجبن، بالإضافة إلى مظهر وقوام مُوَحَّد في كامل المقطع. وبناءً على ذلك فقد تمَّ اختيار هذه النسبة لإنتاج الجبن في المرحلة اللّاحقة.

الجدول رقم(3) : تأثير نسب إضافة بروتياز *R. miehei* في مردود الجبن المُصنَّع وخواصه.

نسبة الإضافة (وحدة سوكسلت/ل)	مردود الجبن (%)	الرائحة (6 درجات)	النكهة (60 درجة)	القوام والملمس (14 درجة)	المظهر الخارجي (20 درجة)	القبول العام (100 درجة)
3000	1.20 ± 5.28^{a}	0.00 ± 2.00^{a}	0.68 ± 48.00^{a}	0.87 ± 9.00^{a}	0.39 ± 12.00^{a}	1.95 ± 71.00^{a}
4000	1.01 ± 5.44^{a}	0.55 ± 2.00^{a}	0.62 ± 48.07^{a}	0.55 ± 9.00^{a}	0.69 ± 12.04^{a}	2.42 ± 71.11^{a}
5000	1.08 ± 7.11^{a}	0.55 ± 5.00^{b}	1.88 ± 55.00^{b}	0.68 ± 10.00^{a}	0.70 ± 14.00^{ab}	3.82 ± 84.00^{bc}
6000	0.71 ± 11.66^{b}	0.44 ± 5.50^{b}	1.49 ± 55.00^{b}	0.78 ± 13.00^{b}	0.96 ± 18.00^{c}	3.68 ± 91.50^{c}
7000	0.48 ± 11.01^{b}	0.39 ± 5.00^{b}	0.55 ± 48.00^{a}	0.83 ± 9.07^{a}	0.39 ± 16.00^{b}	2.17 ± 78.07^{ab}

* القيم في العمود الواحد التي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.05

يُبَيِّن الجدول 4 تقارُب مردود الجبن المُصنَّع باستخدام كلٍ من المنفحة التّجاريَّة والبروتياز من R.miehei إذ لم يظهر اختلاف معنوي في المردود باستخدام كلٍ من المُخثِّرين. وقد أشار Jacob وزملاؤه (2010، 375) إلى نتائج مشابهة حول عدم اختلاف مردود الجبن المُصنَّع باستخدام كلٍ من المنفحة وبروتياز R.miehei. وكانت الخواصّ الحسِّيَّة للجبن المُصنَّع باستخدام كلٍ من المُخثِّرين متقاربة، ولم يظهر اختلاف معنوي عند تقييم جميع الخواصّ. وقد أشار Amer وزملاؤه (2015، 1079) إلى نتائج مشابهة حول تماثل الخواصّ الحسِّيَّة للجبن الأبيض المُصنَّع باستخدام كلٍ من المنفحة وبروتياز R.miehei.

الجدول رقم (4): مقارنة المردود والخواصّ الحسّيّة للجبن المُصنَّع باستخدام كلٍ من المنفحة التِّجاريَّة وبروتياز R.miehei

نوع المُخثِّر	مردود الجبن (%)	الرائحة (6 درجات)	النكهة (60 درجة)	القوام والملمس (14 درجة)	المظهر الخارجي (20 درجة)	القبول العام (100 درجة)
المنفحة التجارية	1.19±11.96[a]	1.16±5.38[a]	4.07±54.01[a]	1.79±12.30[a]	1.92±18.63[a]	8.18±90.31[a]
بروتياز R.miehei	0.66±11.65[a]	1.16±5.38[a]	2.07±54.38[a]	0.88±13.02[a]	1.93±17.69[a]	5.26±90.21[a]

* القيم في العمود الواحد التي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.05

4. الاستنتاجات:

1- تميُّز بروتياز Rhizomucor miehei بنشاط تخثُّر نوعي مرتفع، وقيمة مرتفعة لنشاط تخثر الحليب نسبةً للنشاط الحالّ للبروتين، وهو الأمر المفضل في صناعة الأجبان.

2- تماثُل الجبن الأبيض المُصنَّع باستخدام البروتياز المنتج من Rhizomucor miehei مع الجبن المُصنَّع باستخدام المنفحة التجارية، من حيث المردود والخواص الحسيِّة، ما يظهر جدوى استخدام بروتياز Rhizomucor miehei كبديل مناسب للمنفحة التقليدية.

التمويل: هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم الممول (501100020595).

References:

1. أبو غرّة، صياح؛ هدّال، أحمد؛ وحبيبه، فدوى. (2010). تأثير عمليات تصنيع الجبن الأبيض الناعم المرصوص في الحمولة الجرثومية. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. 26(1)، 247−260.
2. Abdelouahab, N., Nabila, B., Roza, S., Slimane, B., Etienne, D., Pascal, A., and Mouloud, B. M. (2015). Molecular Weight Determination of a Protease Extracted from Mucor pusillus: Comparison Methods. Food and Nutrition Sciences, 6(03), 348.
3. Abd-El Salam, M., and Benkerroum, N. (2006). North African Brined Cheeses. In: A. Y. Tamime (Ed.). Brined Cheeses. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. (p 174).
4. Alahmad Aljammas, H., Yazji, S., and Azizieh, A. (2022). Optimization of protease production from Rhizomucor miehei Rm4 isolate under solid-state fermentation. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 20(1), 1-13.
5. Amer, A. E.A., Hashem, M. I ., Amer, M. E., and Gomaa A. M. (2015). Using sweet whey for production of milk clotting enzyme by Mucor miehei NRRL 3420 in production of white soft cheese. Middle East Journal of Applied Sciences, 5(4), 1068-1081.
6. American Cheese Society, Stephanie Clark, Craig Gile, Vince Razionale, Bill Rufenacht, and Sarah Spira (eds.). American Cheese Society Cheese and Dairy Product Lexicon and Glossary. Denver: American Cheese Society. Version 1 Published February 1, 2018. (pp 4-36).
7. Andre´n, A. (2011). Rennets and Coagulants. In: J. W. Fuquay., P. L. McSweeney., & P. F. Fox. (Eds.). Encyclopedia of dairy sciences (2nd ed.). UK: Academic Press. (p 576).
8. Arima, K., Iwasaki, S., and Tamura, G. (1967). Milk clotting enzyme from microorganisms: Part I. Screening test and the identification of the potent fungus. Agricultural and Biological Chemistry, 31(5), 540-545.
9. Chr. Hansen. (2019). BioRen® 97T100 Product Information Version: 3 PI GLOB EN. Retrieved from https://hjemmeriet.com/en/ChrHansen/Products/BioRen/PI_GLOB_BioRen_97T100_410129_EN.pdf
10. Clark, S., Costello. (2009). Dairy Products Evaluation Competitions. In: S. Clark., M. Costello., M. Drake., & F. Bodyfelt (Eds.). The sensory evaluation of dairy products (2nd ed). Springer Science & Business Media. (pp 62-70).
11. Fernández-Lahore, H. M., Fraile, E. R., and Cascone, O. (1998). Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. Journal of Biotechnology, 62(2), 83-93.
12. Foltmann, B. (1993). General and molecular aspects of rennets. In P. F. Fox (Ed.). Cheese: chemistry, physics and microbiology. Boston, MA: Springer. (pp. 37,62-63).
13. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., and McSweeney, P. L. (2017). Fundamentals of cheese science (2nd ed.). New York: Springer. (p. 315).
14. Green, M. L., and Grandison, A. S. (1993). Secondary (non-enzymatic) phase of rennet coagulation and post-coagulation phenomena. In P. F. Fox (Ed.). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects (2nd ed.). UK: Springer. (pp 118-133).
15. Horne, D. S., and Lucey, J. A. (2017). Rennet-induced Coagulation of Milk. In: P. L. H. McSweeney., P. F. Fox., P. D. Cotter., and D. W. Everett. Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Volume 1. General aspects (4th ed.). UK: Elsevier Academic Press. (p 121).
16. Iwasaki, S., Tamura, G. and Arima, K. (1967). Milk clotting enzyme from microorganisms: Part II. The enzyme production and the properties of crude enzyme. Agricultural and Biological Chemistry, 31(5), 546-551.
17. Jacob, M., Jaros, D., and Rohm, H. (2010). The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory-, pilot-and commercial-scale productions. International journal of dairy technology, 63(3), 370-380.
18. Karcher, S. J. (1995). Molecular biology: a project approach. San Diego, California: Academic Press, Inc. (pp 170-171).
19. Kazemi-Vaysari, A., Kheirolomoom, A., Arjmand, M., and Habibollahi, M. (2002). Optimization of Mucor miehei Rennin production and recovery. Scientia Iranica, 9(1), 99-104.
20. Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. The Journal of General Physiology, 30(4), 291-310.

21. Law, B. A. (2002). Enzymes in the manufacture of dairy products. In: R. J. Whitehurst., & B. A. Law (Eds.). Enzymes in Food Technology. UK: Sheffield Academic Press. (p 92-93).
22. Lomholt, S. B., and Qvist, K. B. (1997). Relationship between rheological properties and degree of κ-casein proteolysis during renneting of milk. Journal of Dairy Research, 64(4), 541-549.
23. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., and Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of biological chemistry, 193(1), 265-275.
24. Nooralabettu, K. P. (2014). Optimisation of ammonium sulfate precipitation method to achieve high throughput concentration of crude alkaline phosphatase from Brown shrimp (Metapenaeus monoceros) hepatopancreas. International Journal of Analytical Bio-Science, 2(1), 7-16.
25. Quaglia, G. B., and Gennaro, L. (2003). ENZYMES| Uses in Food Processing. In: Caballero, B. (Ed.). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition). San Diego, CA, USA: Academic Press. (p 2133-2134).
26. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and molecular biology reviews, 62(3), 597-635.
27. Scott, R., Scott, J. E., Robinson, R. K., and Wilbey, R. A. (1998). Cheesemaking practice (3rd ed.). New York: Springer Science & Business Media. (p 155).
28. Shahbandeh, M. (2022). Annual cheese production worldwide from 2015 to 2021. Retrieved August 17, 2022 from https://www.statista.com/statistics/1120911/cheese-production-worldwide/
29. Uniacke-Lowe, T., and Fox, P. F. (2017). Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties. In: P. L. H. McSweeney., P. F. Fox., P. D. Cotter., and D. W. Everett. Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Volume 1. General aspects (4th ed.). UK: Elsevier Academic Press. (p 92).
30. United States Department of Agriculture. (2019). USDA's FoodData Central. Retrieved August 18, 2022 from https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/328637/nutrients
31. Visser, S. (1993). Proteolytic Enzymes and Their Relation to Cheese Ripening and Flavor: An Overview. Journal of Dairy Science, 76(1), 329–350.
32. Walther, B., Schmid, A., Sieber, R., and Wehrmuller, K. (2010). Cheese in nutrition and health. Medicine& Nutrition,46, 38-51.