

أمثلة ظروف التخمر السائل لإنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* باستخدام منهجية الاستجابة السطحية

هُذيل الاحمد الجماس¹، أ.د. صباح يازجي²، وأ.د. عبد الحكيم عزيزية²

¹ طالب دكتوراه قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق

² أستاذ في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

الملخص:

هدفَ البحث إلى أمثلة ظروف إنتاج البروتياز من عزلة محلية للفطر *Rhizomucor miehei* في وسط تخمر سائل باستخدام تصميم (RSM) Response Surface Methodology، وتضمّن تأثير خمسة عوامل هي: زمن التخمر، ودرجة الحرارة، ودرجة الـ pH، وتركيز الجلوكوز، وتركيز الكازئين، وحُدِّدَت القيم المثلى اعتماداً على كمية الأنزيم المُنتَج وفعاليتَه. تمَّ قياس المحتوى الأنزيمي، نشاط تخثر الحليب (MCA)، النشاط النوعي، النشاط الحال للبروتين (PA)، ونسبة نشاط تخثر الحليب/النشاط الحال للبروتين (MCA/PA) للمستخلص الأنزيمي الناتج لتقييم جودة الأنزيم. وتمثَّلت الظروف المثلى لإنتاج الأنزيم في التحضين على درجة حرارة 40.91 °C، لمدة 89.94 ساعة، وضبط درجة الحموضة الابتدائية عند 5.99، وإضافة الجلوكوز والكازئين بالتراكيز 39.09 g/L، و 1.02% على التوالي. وقد أعطت عملية التخمر عند الظروف آنفة الذكر مستخلصاً أنزيمياً بقيم 3.92 mg/mL، 1191.18 SU/mL، 303.87 SU/mg، 0.97 PU/mg، 313.27 لكلٍ من المحتوى الأنزيمي، نشاط تخثر الحليب، نشاط التخثر النوعي، النشاط الحال للبروتين النوعي، ونسبة (MCA/PA)، على التوالي.

الكلمات المفتاحية: بروتياز، كربون، نتروجين، RSM، *Rhizomucor miehei*.

تاريخ الإيداع: 2021/9/9

تاريخ القبول: 2022/1/30



حقوق النشر: جامعة دمشق - سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

Optimization of Liquid Fermentation Conditions for Protease Production from *Rhizomucor miehei* Using Response Surface Methodology

Houthail AlAhmad Aljammas¹, Prof., Sabah Yazji²
Prof., Abdulhakim Azizieh²

¹ PhD student, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

² Prof, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

Abstract:

The research aimed to optimize the conditions of protease production from local isolate of *Rhizomucor miehei* in liquid medium using Response Surface Methodology (RSM). The design included the effect of five factors: fermentation time, temperature, pH, glucose concentration and casein concentration. Their optimal values were determined depending on the quantity and activity of the produced enzyme. The protein content, milk clotting activity (MCA), specific activity, proteolytic activity (PA) and (MCA/PA) ratio of the extracted enzyme were calculated to evaluate the quality of the enzyme. The optimal conditions were found to be 89.94 hours, 40.91 °C, 5.99, 39.09 g/L, 1.02 % for fermentation period, temperature, initial pH, glucose, and casein concentration respectively.

The performed fermentation process under the optimized conditions gave an enzymatic extract with the values of 3.92 mg/mL, 1191.18 SU/mL, 303.87 SU/mg, 0.97 PU/mg, 314.30 for protein content, milk clotting activity, specific clotting activity, specific Proteolytic activity, and (MCA/PA) ratio respectively.

Key words: Carbon, Nitrogen, Protease, *Rhizomucor miehei*, RSM.

Received: 9/9/2021
Accepted: 30/1/2022



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

المقدمة:

تعتبر صناعة الأجبان التطبيق الرئيس للبروتياز في صناعات الألبان، وتتمثل الوظيفة الأساسية للبروتياز في البدء بعملية تخثر الحليب، من خلال الفصل السريع وعالي التخصص للبروتينات الرئيسية للحليب (الكازئين) (Spreer, 2017, 258-259). تُعتبر منفحة العجول الشكل الأكثر استخداماً لأنزيمات تخثر الحليب، ويُشكل الكيموزين المكون الأساسي لها، ويؤدي المحتوى العالي للكيموزين في المنفحة والتخصص الدقيق للأنزيم إلى حلمة الجزء الأكبر من كازئين كابتا دون الكازئينات الأخرى، ما يحقق أقصى عائد للخثرة وعدم ظهور البيبتيدات ذات الطعم المر، كما أن تحليله اللاحق للخثرة خلال مرحلة الإنضاج يسير ببطء مما يضمن عدم تدهور الخثرة وإعطاء الخواص الحسية والريولوجية التقليدية المرغوبة (Fox and McSweeney, 2012, 1,7; Law, 2010, 89-91).

إنَّ الانخفاض العام في عدد العجول المتاحة للذبح نتيجة الرغبة في الحصول على اللحم أدى إلى انخفاض العرض على المنفحة وغلاء سعرها. كما أنَّ الازدياد الملحوظ في إنتاج الأجبان قاد إلى استنفاد مصادر المنفحة التقليدية المتوفرة (Uniacke-Lowe and Fox, 2017, 92; Andr n, 2021, 352). حفرت هذه الحالة البحث عن مصادر بديلة لتغطية الاحتياجات المتزايدة من المنفحة لصناعات الأجبان، حيث استُخدمت المُخترتات الحيوانية الأخرى كبديل أقل تكلفة بالإضافة إلى المُخترتات النباتية، كما استخدمت المُخترتات الميكروبية والتي لاقت انتشاراً واسعاً. وبالرغم من إظهار العديد من الأنزيمات القدرة على تخثر الحليب فإن أغلبها لا يصلح لأن يكون بديلاً لمنفحة العجول حيث تبدي نشاط حال للبروتين (بروتوليتي) مرتفع (Law, 2002, 92-94). يعتبر بروتياز فطر *Rhizomucor miehei* البديل المفضل للمنفحة، إذ يبدي فعالية مرتفعة لتخثر الحليب ونشاط حال للبروتين منخفض نسبياً، وتخصّص دقيق في فصل الروابط البيبتيدية المماثلة في كازئين كابتا Phe105-Meth106 والتي يقوم الكيموزين بتفكيكها، كما يُبدي فعالية مثلى واستقرار عند قيم الـ pH ودرجات الحرارة المستخدمة في معاملات تصنيع الأجبان، واحتياجات كالسيوم مماثلة. بالإضافة إلى جودة جبن عالية، والاحتمال الضئيل لظهور المذاق المر (Scott, 1998, 155). يتم إنتاج الأنزيمات الميكروبية بشكل رئيسي باستخدام التخميرات المغمورة لسهولة التعامل والتحكم الأمثل في العوامل البيئية مثل درجة الحرارة ودرجة الحموضة، وسهولة عمليات التهوية والخلط وإزالة الحرارة، وسهولة فصل الخلايا عن الوسط وتنقية المنتج، والتحكم الدقيق بمكونات الوسط (Maria de Lourdes and Rai, 2013, 121, 263).

تتأثر عملية التخمر بعدد كبير من العوامل كالحرارة، والـ pH، وطبيعة وتركيب وسط التخمر، والغازات المنحلة، ونظام التخمر (Chisti, 2014, 664). وتبرز أهمية درجة الحرارة بين العوامل الفيزيائية الأخرى المؤثرة في أداء التخمرات، من خلال تحديدها للعديد من العوامل البيولوجية كالنمو، وإنتاج الأنزيمات، وتخریب البروتين، وتنشيط الأنزيمات، تثبيط أو تحفيز إنتاج مُستقلب معين، بالإضافة لموت الخلايا (Sandhya et al., 2006, 322). كما يبرز دور الـ pH كعامل محدد للنمو والنشاط الميكروبي بطرائق مختلفة، كالتأثير في تفاعلات الأكسدة والإرجاع، والتنفس الخلوي، ودرجة الإتاحة البيولوجية للمغذيات والعناصر النادرة، والتأثير في نشاط الأنزيمات الخارجية (Jin and Kirk, 2018, 1-22).

يشكل مصدر الكربون عنصراً ضرورياً لإمداد الخلية بالطاقة والمادة اللازمة للنمو وتخليق العديد من مواد الاستقلاب الأولية والثانوية. كما يعتبر وجود النتروجين ضرورياً للنمو واستقلاب بعض المركبات كالبروتينات والأحماض النووية، وتُحدد كمية النتروجين في أي وسط مقدار الكتلة الحيوية التي يمكن الوصول إليها عند توفر المقدار الكافي من الكربون والمغذيات الأخرى

(McNeil and Harvey, 2008, 103,106). ومن الأهمية بمكان تحديد زمن التخمر الأمثل وخاصة في معاملات الإنتاج الأنزيمي فاختصار زمن التخمر يؤدي إلى إنتاج أقل للأنزيمات وبفعالية أقل، كما أن إطالة فترة التخمر قد تزيد من إمكانية التلوث، وتنشيط الأنزيم أو تخريبه، بالإضافة إلى زيادة تكلفة الإنتاج وانخفاض الإنتاجية (Demir, 2012, 15). وقد أشار Escobar و Barnett (1993، 1009-1013) إلى بدء إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* بالتخمر السائل بعد 24 ساعة من بدء التحضين، ووصول الإنتاج الأنزيمي أقصاه بعد 120 ساعة، وانخفاض الإنتاج في المراحل اللاحقة. كما درس Escobar و Barnett (1993، 1009-1013) إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* في نظام تخمر سائل مستمر، بوجود الجلوكوز بتركيز ثابت (58 g/L)، وعند درجة حرارة 37 °C، وأشارا إلى وصول النشاط الأنزيمي أقصاه بعد 120 ساعة من بدء التخمر، وضبط pH الوسط عند 6.5.

في دراسة لـ Amer وزملائه (2015، 1068-1081) حول تأثير الكربون والنيتروجين في إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* بالتخمر السائل، كان لإضافة الجلوكوز والكاربين إلى وسط التخمر بالتراكيز 20 g/L و 4 g/L الأثر الأكبر في تحسين إنتاج البروتياز. وأشار Silveira وزملاؤه (2005، 931-937) إلى الحصول على أعلى نشاط أنزيمي للبروتياز من *Rhizomucor miehei* بالتخمر السائل بعد 120 ساعة من التحضين على درجة حرارة 35 °C باستخدام الجلوكوز بتركيز (18 g/L). وفي دراسة لـ Seker وزملائه (1998، 525-529) حول إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* وفق نظام التخمر السائل المستمر (الدفعة المغذاة)، حصل الباحثون على أعلى نشاط أنزيمي عند الحفاظ على الجلوكوز في وسط التخمر بتركيز 7.5 g/L، وضبط الـ pH الابتدائي لوسط التخمر عند الدرجة 6.8. وفي دراسة لـ Ayhan وزملاؤه (2001، 153-160) حول إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* بالتخمر السائل، تمثّلت الظروف المثلى للإنتاج باستخدام الجلوكوز بتركيز (29.6 g/L) وضبط الـ pH الابتدائي لوسط التخمر عند 6.8 وعند درجة حرارة 37.6 °C.

هدفَ هذا البحث إلى أمثلة ظروف إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* وفق نظام التخمرات السائلة، باستخدام منهجية الاستجابة السطحية.

مواد وطرائق البحث:

أجريت الدراسة عام 2021 في مخابر قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة بجامعة دمشق، ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية.
- الفطر المستخدم: استُخدمت عزلة محلية للفطر *Rhizomucor miehei*، عُزلت من التربة السورية، وشُخصت وغُرِبلت بين مجموعة من العزلات مسبقاً من قبل الباحثين (الجماس وآخرون، 2020).

- أوساط الزرع:

وسط آجار دكستروز البطاطا (PDA): حُضِرَ بحسب تعليمات الشركة الصانعة (Himedia)، استُخدم لحفظ وتنشيط الفطر وتحضير مُعلَق الأبوغ.

وسط التخمر: حُضِرَ وفقاً لما ذكره Seker وزملاؤه (1999، 525-529)؛ وAndrade وزملاؤه (2002، 106-110) مع بعض التعديلات، حيث استُخدم الجلوكوز كمصدر للكربون، والكاربين كمصدر نيتروجيني، وأضيفت بالتراكيز (30,35,40,45,50 g/L)، و(0.2,0.6,1,1.4,1.8 %) على التوالي، وفق معاملات التصميم الإحصائي المعتمد. كما أضيفت العناصر المعدنية الكبرى وفق

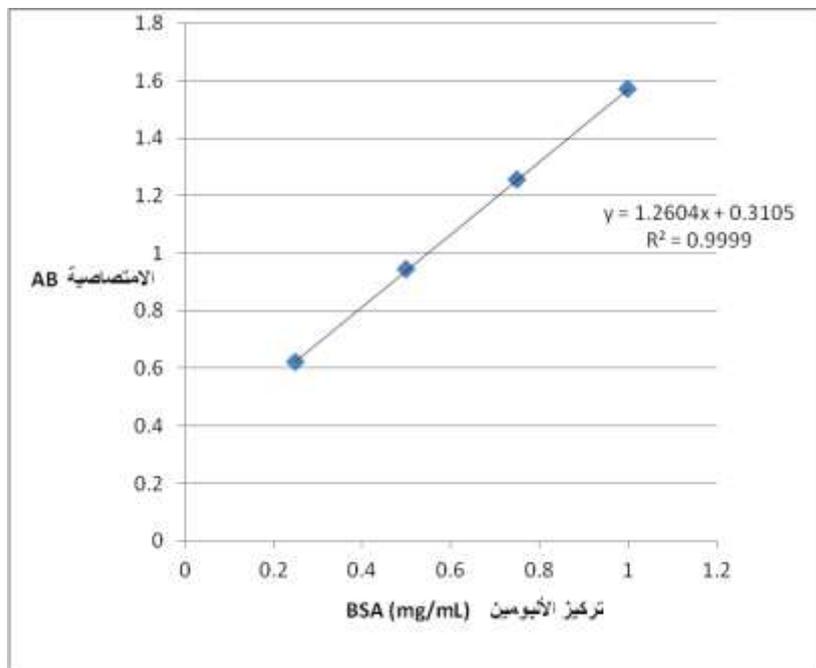
النسب: 2mL/L و0.005 mg/L، بالإضافة إلى الثيامين بنسبة 0.05 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/L K_2HPO_4 , 0.05 g/L KCl من محلول مغذي يحتوي على العناصر الصغرى وفق المكونات:

0.08 g/L $CuSO_4$, 0.5 g/L $MnSO_4$, 1 g/L $ZnSO_4$, 1 g/L $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$, وُزِعَ 50 mL من وسط التخمر في دوارق (Erlenmeyer 250 mL)، وضبطت قيم الـ pH الابتدائية لكل معاملة قبل التعقيم بإضافة HCl (0.1 N) و NaOH (0.1 N) وصولاً للقيم المحددة، سُدَّت الدوارق بالقطن وُعُقِمَت بالأوتوكلاف بدرجة 121 °C لمدة 15 m، بعد التبريد حُفِنَت الدوارق تحت ظروف معقمة بـ 5% أو ما يعادل 2.5 mL من معلق الأبواغ (10^7 بوغاة/mL)، ثُمَّ حُصِنَت الدوارق في حاضنة هزازة دورانية بسرعة (150 rpm) لفترات وبدرجات حرارة مختلفة وفقاً لمعاملات التصميم الإحصائي.

- تحضير مُعَلَّق الأبواغ: لُفِحَ الفطر على أطباق بتري 90 mm تحتوي على 20 mL من بيئة (PDA) وحُصِنَت الأطباق عند درجة 37 °C لمدة 5 أيام، وتمَّ الحصول على اللُّقَّاح بخدش سطح الآجار بوجود 30 mL من الماء المقطر والمُعَمَّم للحصول على مُعَلَّق للأبواغ، فُدِّر تركيز الأبواغ في المُعَلَّق بواسطة (Neubauer chamber).

- استخلاص الأنزيم من وسط التخمر: بعد إتمام التخمر تمَّ فصل الميسيليوم عن وسط التخمر باستخدام ورق ترشيح (Whatman paper No1)، ولتصفية المحلول الأنزيمي عُرِّضَ للترد المركزي (5000 rpm) لمدة 20 min وفُصِلَت الرُّشَاحَة لتقدير المحتوى والنشاط الأنزيمي.

تحديد المحتوى البروتيني: حُدِّدَ المحتوى البروتيني للمستخلص الأنزيمي باستخدام طريقة Lowry وزملائه (1951، 265-275) بقياس الامتصاصية عند طول موجة 750 nm وبعتماد ألبومين المصل البقري (B.S.A) كمنحني قياسي (الشكل 1).



الشكل 1: المنحني القياسي للألبومين.

تحديد النشاط الأنزيمي:

نشاط تخثر الحليب (Milk Clotting Activity): حُدِّدَ تبعاً لطريقة Arima وزملائه (1970، 446-460) وعُبر عنها بوحدة Soxhlet (SU) وتُعرَّف بأنها كمية الأنزيم التي تخثر 1 mL من محلول يحوي 0.1 g مسحوق حليب مقشود و 0.0014 g من كلوريد الكالسيوم خلال 40 min عند درجة حرارة 35 °C.

النشاط الحال للبروتين (Proteolytic Activity): حُدِّدَ عن طريق تقدير هضم الكازئين تبعاً لطريقة Kunitz (1947، 310-291).

الفعالية النوعية للأنزيم: وهي عدد وحدات الفعالية الأنزيمية لكل 1 mg من الأنزيم.

نسبة نشاط تخثر الحليب/النشاط الحال للبروتين (MCA/PA): قُدِّرَت هذه النسبة بقسمة قيمة نشاط تخثر الحليب على قيمة النشاط الحال للبروتين للأنزيم الناتج، وتتناسب قيمة هذه النسبة إيجاباً مع جودة الأنزيم.

التصميم والتحليل الإحصائي: صُمِّمَت التجربة وحُلِّت النتائج باستخدام برنامج Minitab 17، حيث تَمَّت دراسة 5 عوامل تضمنت درجة الحرارة، وزمن التخمر، ودرجة الـ pH، وتركيز الجلوكوز، وتركيز الكازئين، غُيِّرَت قيم هذه العوامل ضمن 5 مستويات (الجدول 1)، واستخدم التصميم المُركَّب المركزي (Central Composite Design) للحصول على 44 معاملة (الجدول 2). حُلِّت النتائج التجريبية للمعاملات باستخدام تحليل الانحدار المتعدد، وتحليل التباين عند مستوى معنوية 0.05، وتمَّ تحديد الظروف المثلى لإنتاج البروتياز باعتماد نشاط تخثر الحليب النوعي، ونسبة نشاط التخثر للنشاط الحال للبروتين (MCA/PA) كمتغيري استجابة، بما يحقق أعلى قيمة لكل من المؤشرين (Dalgleish, 1993, 73; Harboe et al., 2010, 125).

الجدول 1: التصميم التجريبي للمتغيرات المستقلة المستخدمة ومستوياتها.

فواصل ومستويات المتغير					الوحدة	رمز المتغير	المتغيرات المدروسة
+2	+1	0	-1	-2			
120	96	72	48	24	ساعة	X1	زمن التخمر
50	45	40	35	30	°C	X2	درجة الحرارة
7	6	5	4	3	-	X3	pH
50	45	40	35	30	(g/L)	X4	تركيز الكربون
1.8	1.4	1	0.6	0.2	%	X5	تركيز النتروجين

الجدول (2): المعاملات التجريبية للتصميم الإحصائي.

قيم المتغير					المكررات	رقم المعاملة
X5	X4	X3	X2	X1		
0.6	35	4	35	48	1	1
0.6	35	4	35	96	1	2
0.6	35	4	45	48	1	3
0.6	35	4	45	96	1	4
0.6	35	6	35	48	1	5
0.6	35	6	35	96	1	6
0.6	35	6	45	48	1	7
0.6	35	6	45	96	1	8
0.6	45	4	35	48	1	9
0.6	45	4	35	96	1	10
0.6	45	4	45	48	1	11
0.6	45	4	45	96	1	12
0.6	45	6	35	48	1	13
0.6	45	6	35	96	1	14
0.6	45	6	45	48	1	15
0.6	45	6	45	96	1	16
1.4	35	4	35	48	1	17
1.4	35	4	35	96	1	18
1.4	35	4	45	48	1	19
1.4	35	4	45	96	1	20
1.4	35	6	35	48	1	21
1.4	35	6	35	96	1	22
1.4	35	6	45	48	1	23
1.4	35	6	45	96	1	24
1.4	45	4	35	48	1	25
1.4	45	4	35	96	1	26
1.4	45	4	45	48	1	27
1.4	45	4	45	96	1	28
1.4	45	6	35	48	1	29
1.4	45	6	35	96	1	30
1.4	45	6	45	48	1	31
1.4	45	6	45	96	1	32
1	40	5	40	72	2	33
1	40	5	40	72	2	34
1	40	5	40	24	2	35
1	40	5	40	120	2	36
1	40	3	40	72	2	37
1	40	7	40	72	2	38
1	30	5	40	72	2	39
1	50	5	40	72	2	40
0.2	40	5	40	72	2	41
1.8	40	5	40	72	2	42
1	40	5	30	72	2	43
1	40	5	50	72	2	44

النتائج والمناقشة:

أعطت نتيجة التحليل الإحصائي للنتائج معادلتين من الدرجة الثانية تُبين العلاقة بين مؤشرات الاستجابة والعوامل المُرمزة (المعادلتين 1، و 2).

$$(1): \text{spMCA} = -4498 + 9.36.1 X_1 + 83.6 X_2 + 401 X_3 + 59.7 X_4 + 626 X_5 - 0.0506 X_1^2 - 0.961 X_2^2 - 25.49 X_3^2 - 0.720 X_4^2 - 214.8 X_5^2 + 0.0384 X_1 * X_2 - 0.006 X_1 * X_3 - 0.0341 X_1 * X_4 - 0.308 X_1 * X_5 - 1.99 X_2 * X_3 + 0.138 X_2 * X_4 - 1.96 X_2 * X_5 - 0.48 X_3 * X_4 + 2.6 X_3 * X_5 - 2.56 X_4 * X_5$$

$$(2): \text{MCA/PA} = -3915 + 9 X_1 + 94.9 X_2 + 357 X_3 + 36.9 X_4 + 171 X_5 - 0.0562 X_1^2 - 1.101 X_2^2 - 22.52 X_3^2 - 0.362 X_4^2 - 189.8 X_5^2 + 0.0555 X_1 * X_2 - 0.009 X_1 * X_3 - 0.0644 X_1 * X_4 + 0.942 X_1 * X_5 - 1.84 X_2 * X_3 - 0.001 X_2 * X_4 + 1.30 X_2 * X_5 - 0.62 X_3 * X_4 + 17.4 X_3 * X_5 + 0.34 X_4 * X_5$$

بحيث X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 هي زمن التخمر، درجة الحرارة، درجة الـ pH، تركيز الكربون، وتركيز النتروجين على التوالي. ويُبين الجدولان 4، و 5 نتائج تحليل التباين لدلالات العوامل المؤثرة وتفاعلها لكل من معادلة نشاط التخثر النوعي، ونسبة MCA/PA على التوالي، حيث كانت قيم الاحتمالية (P) الخاصة بمعادلتنا الانحدار لكل من نشاط التخثر ونسبة MCA/PA أقل من 0.05 ما يشير إلى الأثر المعنوي لواحد على الأقل من العوامل المستقلة (المتغيرات المدروسة) في العوامل التابعة (متغيرات الاستجابة). ويُبين الجدول 4 أنّ قيم الاحتمالية لكل من الزمن، والـ pH أقل من 0.05 وبالتالي هناك تأثير خطي معنوي لهذه المتغيرات في نشاط التخثر النوعي. بينما كانت قيم الاحتمالية للحرارة والكربون والنتروجين أكبر من 0.05 ما يعني أنه ليس لهذه العوامل تأثير خطي معنوي في نشاط التخثر النوعي. كما يشير الجدول 4 إلى معنوية تأثير تربيع العوامل في نشاط التخثر النوعي، حيث كانت قيم الاحتمالية لكل من مربع الزمن، والحرارة، والـ pH، والكربون، والنتروجين أقل من 0.05. ولم يظهر أثر معنوي لتفاعل المتغيرات المستقلة فيما بينها في نشاط التخثر النوعي.

يبين الجدول (6) أنّ هناك تأثير خطي معنوي لكل من الزمن، والـ pH في نسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين، بينما لم يكن للحرارة والكربون والنتروجين تأثير خطي معنوي في نسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين. ومن جهة أخرى كان لتربيع العوامل المتغيرة فيما عدا الكربون تأثير معنوي في نسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين. ولم يظهر أي أثر معنوي لتفاعل المتغيرات المستقلة فيما بينها في نسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين.

كانت قيم معامل التحديد (R^2) الخاصة بمعادلتنا الانحدار لكل من نشاط التخثر النوعي، ونسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين 90%، و 90.54% على التوالي، ما يعني أنّ العوامل المستقلة مسؤولة عن 90%، و 90.54% من التباين في العوامل التابعة هذه. وكانت قيم الخطأ المعياري لكل من نشاط التخثر النوعي، ونسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين 30.72 و 33.59 على التوالي، وتشير قيم الخطأ المعياري المنخفضة هذه إلى قرب توزع القيم المقاسة من خط الانحدار. كما كانت قيم الاحتمالية لنقص التطبيق (Lack-of-Fit) الخاصة بمعادلتنا الانحدار لكل من نشاط التخثر النوعي، ونسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين أكبر من 0.05 ما يشير إلى كفاءة معادلتنا الانحدار في تحديد العلاقة بين العوامل المستقلة والعوامل التابعة.

يمكن اختزال معادلتنا الانحدار لكل من نشاط التخثر النوعي، ونسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين، بحذف المتغير الأقل معنوية وإعادة تحليل الانحدار وصولاً إلى أقل عدد من المتغيرات غير المعنوية، مع الحفاظ على التسلسل الهرمي لمعادلة الانحدار (أي إبقاء العوامل الخطية غير المعنوية إن كان لتربيع هذه العوامل أو تفاعلها أثر معنوي في المعادلة) (Crawley, 2007, 327).

حيث أعطت عملية الاختزال المعادلتين الآتيتين:

$$\text{spMCA} = -3933 + 7.66 X_1 + 77.2 X_2 + 304.3 X_3 + 57.7 X_4 + 436.3 X_5 - 0.0506 X_1^2 - 0.961 X_2^2 - 25.49 X_3^2 - 0.720 X_4^2 - 214.8 X_5^2 + 0.0384 X_1 X_2 \quad (3).$$

$$\text{MCA/PA} = -2406 + 6.19 X_1 + 72.5 X_2 + 230.3 X_3 + 334.9 X_5 - 0.0483 X_1^2 - 0.920 X_2^2 - 17.99 X_3^2 - 161.5 X_5^2 + 0.0555 X_1 X_2 \quad (4).$$

بحيث أن X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 هي زمن التخمر، درجة الحرارة، درجة الـ pH، وتركيز الكربون، وتركيز النتروجين على التوالي. ويبين الجدولان 8 و 10 تحليل التباين لمعادلتى الانحدار المختزلة لكل من نشاط التخثر النوعي، ونسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين، كما يبين الجدولان 9 و 11 تأثير العوامل في نشاط التخثر النوعي، ونسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين على التوالي وفق معادلتى الانحدار المختزلتين. وقد كانت قيم معامل التحديد (R^2) الخاصة بمعادلتى الانحدار المختزلة لكل من نشاط التخثر النوعي، ونسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين 87.61%، و 85.59% على التوالي، ما يعني أن العوامل المستقلة مسؤولة عن 85.24%، و 84.94% من التباين في العوامل التابعة وفق هذه المعادلة. وكانت قيم الخطأ المعياري لكل من نشاط التخثر النوعي، ونسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين 31.49 و 30.95 على التوالي، وتشير قيم الخطأ المعياري المنخفضة هذه إلى قرب توزع القيم المقاسة من خط الانحدار. كما كانت قيم الاحتمالية لنقص التطبيق (Lack-of-Fit) الخاصة بمعادلتى الانحدار المختزلة لكل من نشاط التخثر النوعي، ونسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين أكبر من 0.05 ما يشير إلى كفاءة معادلتى الانحدار في تحديد العلاقة بين العوامل المستقلة والعوامل التابعة.

يبين الشكل 2 الظروف المثلى لإنتاج البروتين بما يحقق الحصول على أعلى قيم لكل من نشاط التخثر النوعي، ونسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين. إذ تمثلت هذه الظروف في التحضين على درجة حرارة 40.91°C ، لمدة 89.94 ساعة، وضبط درجة الحموضة الابتدائية عند 5.99، وإضافة الجلوكوز والكاربين بالتراكيز 39.09 g/L ، و 1.02% على التوالي. وقد أعطت عملية التخمر عند الظروف آنفة الذكر مستخلصاً أنزيمياً بقيم 3.92 mg/mL ، 1191.18 SU/mL ، 303.87 SU/mg ، 0.97 PU/mg ، 313.27 لكل من المحتوى الأنزيمي، نشاط تخثر الحليب، النشاط التخثر النوعي، النشاط الحال للبروتين النوعي، ونسبة MCA/PA على التوالي. حيث كانت قيم نشاط التخثر النوعي ونسبة MCA/PA مقارنة للقيم المتوقعة وفق معادلتى الانحدار المختزلة وهي 297.44 ± 12 و 326.64 ± 18.33 على التوالي.

الجدول (3): النتائج التجريبية للتصميم الإحصائي.

رقم المعاملة	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	نشاط تخثر الحليب MCA (SU/mL)	نشاط التخثر النوعي (SU/mg)	النشاط الحال للبروتين PA (PU/mL)	النشاط الحال النوعي PA (PU/mg)	نشاط التخثر/ النشاط الحال للبروتين (MCA/PA)
1	1.01	66.11	65.46	0.92	0.91	71.86
2	1.50	151.72	101.15	1.23	0.82	123.35
3	1.51	137.22	90.87	1.01	0.67	135.86
4	2.31	471.32	204.03	2.44	1.06	193.16
5	2.11	371.66	176.14	1.70	0.81	218.62
6	2.72	720.02	264.71	3.11	1.14	231.52
7	2.25	450.41	200.18	2.57	1.14	175.26
8	2.90	831.23	286.63	3.41	1.18	243.76
9	1.60	111.42	69.64	1.13	0.71	98.60
10	2.09	334.00	159.81	2.25	1.08	148.44
11	1.79	172.56	96.40	1.43	0.80	120.67
12	2.20	420.12	190.96	2.90	1.32	144.87
13	2.13	369.38	173.42	1.60	0.75	230.86
14	2.41	621.00	257.68	3.10	1.29	200.32
15	2.29	437.45	191.03	2.60	1.14	168.25
16	2.96	851.30	287.60	3.43	1.16	248.19
17	0.82	72.91	88.91	0.97	1.18	75.16
18	2.01	311.74	155.09	1.95	0.97	159.87
19	1.15	111.92	97.32	1.22	1.06	91.74
20	2.41	512.62	212.71	2.92	1.21	175.55
21	2.10	409.13	194.82	2.10	1.00	194.82
22	3.22	1113.22	345.72	3.74	1.16	297.65
23	2.13	437.57	205.43	2.27	1.07	192.76
24	3.59	921.16	256.59	2.94	0.82	313.32
25	1.10	91.33	83.03	1.02	0.93	89.54
26	1.80	182.41	101.34	1.45	0.81	125.80
27	1.94	191.57	98.75	1.52	0.78	126.03
28	2.30	482.26	209.68	2.41	1.05	200.11
29	2.11	435.76	206.52	2.11	1.00	206.52
30	3.22	775.11	240.72	3.09	0.96	250.84
31	2.09	462.09	221.10	2.13	1.02	216.94
32	3.51	943.47	268.79	3.45	0.98	273.47
33	3.69	920.98	249.59	3.71	1.01	248.24
34	3.70	950.36	256.85	3.85	1.04	246.85
35	0.27	0.00	0.00	0.30	1.11	0.00
36	3.90	1065.38	273.17	4.51	1.16	236.23
37	1.60	151.90	94.94	3.10	1.94	49.00
38	3.19	662.25	207.60	2.49	0.78	265.96
39	2.87	431.15	150.23	2.43	0.85	177.43
40	2.90	615.66	212.30	2.51	0.87	245.28
41	2.10	276.24	131.54	2.01	0.96	137.43
42	3.11	310.99	100.00	2.71	0.87	114.76
43	0.57	61.89	108.58	0.93	1.63	66.55
44	2.31	475.20	205.71	2.28	0.99	208.42

الجدول (4): تحليل التباين لمعادلة الانحدار لنشاط تخثر الحليب النوعي.

المصدر	درجة الحرية DF	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj SS	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj MS	مؤشر فيشر F-Value	قيم الاحتمالية P-Value
الانحدار	21	223435	10639.7	9.43	0.000
المكررات	1	15976	15976.2	14.16	0.001
التأثير الخطي	5	31575	6315.0	5.60	0.002
الزمن	1	21780	21779.8	19.30	0.000
الحرارة	1	21	21	0.02	0.893
pH	1	8769	8769.5	7.77	0.011
الكربون	1	562	562.2	0.50	0.488
النتروجين	1	443	442.7	0.39	0.537
تأثير تجميع العوامل	5	23048	4609.6	4.09	0.009
الزمن*الزمن	1	13604	13603.6	12.06	0.002
الحرارة*الحرارة	1	9230	9230.3	8.18	0.009
pH*pH	1	10394	10394.2	9.21	0.006
الكربون*الكربون	1	5178	5178.2	4.59	0.043
النتروجين*النتروجين	1	18893	18892.8	16.74	0.000
التفاعل ثنائي الاتجاه	10	6607	660.7	0.59	0.808
الزمن*الحرارة	1	681	681.2	0.60	0.445
pH*الزمن	1	1	0.7	0.00	0.981
الزمن*الكربون	1	535	534.5	0.47	0.498
الزمن*النتروجين	1	280	280.1	0.25	0.623
pH*الحرارة	1	3174	3173.7	2.81	0.108
الحرارة*الكربون	1	381	380.9	0.34	0.567
الحرارة*النتروجين	1	492	492.3	0.44	0.516
pH*الكربون	1	187	187.4	0.17	0.688
pH*النتروجين	1	36	35.7	0.03	0.860
الكربون*النتروجين	1	841	840.9	0.75	0.397
الخطأ	22	24822	1128.3	-	-
نقص التطبيق	21	24796	1180.8	44.73	0.117
الخطأ النقي	1	26	26.4	-	-
المجموع	43	248257	-	-	-

الجدول (5): تأثير العوامل المدروسة في نشاط تخثر الحليب النوعي.

معامل تضخم التباين VIF	قيم الاحتمالية P-Value	قيم T	الخطأ المعياري للمعامل	معامل الانحدار	التأثير	العامل
	0.110	-1.67	53.9	-89.8	-	الثابت
						المكررات
1.91	0.001	3.76	7.86	29.56		1
83.66	0.000	4.39	4.05	17.79	35.57	الزمن
11.33	0.893	0.14	35.8	4.9	9.8	الحرارة
11.33	0.011	2.79	35.8	99.7	199.4	pH
11.33	0.488	0.71	35.8	25.2	50.5	الكربون
11.33	0.537	0.63	35.8	22.4	44.8	النتروجين
84.38	0.002	-3.47	0.0583	-0.2025	-0.4050	الزمن*الزمن
1.73	0.009	-2.86	33.6	-96.1	-192.1	الحرارة*الحرارة
1.73	0.006	-3.04	33.6	-102.0	-203.9	pH*pH
1.73	0.043	-2.14	33.6	-72.0	-143.9	الكربون*الكربون
1.73	0.000	-4.09	33.6	-137.5	-274.9	النتروجين*النتروجين
11.33	0.445	0.78	0.990	0.769	1.538	الزمن*الحرارة
11.33	0.981	-0.02	0.990	-0.024	-0.048	pH*الزمن
11.33	0.498	-0.69	0.990	-0.681	-1.362	الزمن*الكربون
11.33	0.623	-0.50	0.990	-0.493	-0.986	الزمن*النتروجين
1.00	0.108	-1.68	23.8	-39.8	-79.7	pH*الحرارة
1.00	0.567	0.58	23.8	13.8	27.6	الحرارة*الكربون
1.00	0.516	-0.66	23.8	-15.7	-31.4	الحرارة*النتروجين
1.00	0.688	-0.41	23.8	-9.7	-19.4	pH*الكربون
1.00	0.860	0.18	23.8	4.2	8.5	pH*النتروجين
1.00	0.397	-0.86	23.8	-20.5	-41.0	الكربون*النتروجين

الجدول (6): تحليل التباين لمعادلة الانحدار لنسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين.

المصدر	درجة الحرية DF	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj SS	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj MS	مؤشر فيشر F-Value	قيم الاحتمالية P-Value
الانحدار	21	198641	9459.1	10.02	0.000
المكررات	1	13205	13205.2	13.99	0.001
التأثير الخطي	5	36279	7255.8	7.69	0.000
الزمن	1	23308	23308.4	24.69	0.000
الحرارة	1	76	76.3	0.08	0.779
pH	1	9184	9184.0	9.73	0.005
الكربون	1	2120	2119.9	2.25	0.148
النتروجين	1	1590	1590.4	1.68	0.208
تأثير تربيع العوامل	5	26954	5390.9	5.71	0.002
الزمن*الزمن	1	16753	16752.6	17.75	0.000
الحرارة*الحرارة	1	12113	12113.2	12.83	0.002
pH*pH	1	8111	8111.3	8.59	0.008
الكربون*الكربون	1	1310	1309.7	1.39	0.251
النتروجين*النتروجين	1	14750	14750.1	15.63	0.001
التفاعل ثنائي الاتجاه	10	10755	1075.5	1.14	0.379
الزمن*الحرارة	1	1419	1419.4	1.50	0.233
pH*الزمن	1	1	1.4	0.00	0.970
الزمن*الكربون	1	1914	1913.8	2.03	0.168
الزمن*النتروجين	1	2618	2618.2	2.77	0.110
pH*الحرارة	1	2712	2711.9	2.87	0.104
الحرارة*الكربون	1	0	0	0.00	0.996
الحرارة*النتروجين	1	217	216.7	0.23	0.637
pH*الكربون	1	311	311.4	0.33	0.572
pH*النتروجين	1	1548	1548	1.64	0.214
الكربون*النتروجين	1	15	14.5	0.02	0.902
الخطأ	22	20765	943.9	-	-
نقص التطبيق	21	20764	988.8	1014.97	0.025
الخطأ النقي	1	1	1	-	-
المجموع	43	219406	-	-	-

الجدول (7): تأثير المتغيرات المدروسة في نسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين.

معامل تضخم التباين VIF	قيم الاحتمالية P-Value	قيم T	الخطأ المعياري للمعامل	معامل الانحدار	التأثير	العامل
	0.073	-1.88	49.3	-92.9	-	الثابت
1.91	0.001	3.74	7.18	26.87		1
83.66	0.000	4.97	3.70	18.40	36.80	الزمن
11.33	0.779	-0.28	32.7	-9.3	-18.6	الحرارة
11.33	0.005	3.12	32.7	102.0	204.0	pH
11.33	0.148	1.50	32.7	49.0	98.0	الكربون
11.33	0.208	-1.30	32.7	-42.5	-84.9	النتروجين
84.38	0.000	-4.21	0.0533	-0.2247	-0.4494	الزمن*الزمن
1.73	0.002	-3.58	30.7	-110.1	-220.1	الحرارة*الحرارة
1.73	0.008	-2.93	30.7	-90.1	-180.1	pH*pH
1.73	0.251	-1.18	30.7	-36.2	-72.4	الكربون*الكربون
1.73	0.001	-3.95	30.7	-121.5	-242.9	النتروجين*النتروجين
11.33	0.233	1.23	0.905	1.110	2.220	الزمن*الحرارة
11.33	0.970	-0.04	0.905	-0.035	-0.069	pH*الزمن
11.33	0.168	-1.42	0.905	-1.289	-2.578	الزمن*الكربون
11.33	0.110	1.67	0.905	1.508	3.015	الزمن*النتروجين
1.00	0.104	-1.70	21.7	-36.8	-73.6	pH*الحرارة
1.00	0.996	-0.01	21.7	-0.1	-0.2	الحرارة*الكربون
1.00	0.637	0.48	21.7	10.4	20.8	الحرارة*النتروجين
1.00	0.572	-0.57	21.7	-12.5	-25.0	pH*الكربون
1.00	0.214	1.28	21.7	27.8	55.6	pH*النتروجين
1.00	0.902	0.12	21.7	2.7	5.4	الكربون*النتروجين

الجدول (8): تحليل التباين لمعادلة الانحدار المختزلة لنشاط تخثر الحليب النوعي.

قيم الاحتمالية P-Value	مؤشر فيشر F-Value	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj MS	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj SS	درجة الحرية DF	المصدر
0.000	18.27	18125.7	217508	12	الانحدار
0.000	16.11	15976.2	15976	1	المكررات
0.000	24.17	23972.1	119861	5	التأثير الخطي
0.000	21.96	21779.8	21780	1	الزمن
0.885	0.02	21.0	21	1	الحرارة
0.000	98.54	97739.5	97739	1	pH
0.862	0.03	30.3	30	1	الكربون
0.593	0.29	290.1	290	1	النتروجين
0.003	4.65	4609.6	23048	5	تأثير تربيع العوامل
0.001	13.71	13603.6	13604	1	الزمن*الزمن
0.005	9.31	9230.3	9230	1	الحرارة*الحرارة
0.003	10.48	10394.2	10394	1	pH*pH
0.029	5.22	5178.2	5178	1	الكربون*الكربون
0.000	19.05	18892.8	18893	1	النتروجين
0.414	0.69	681.2	681	1	التفاعل ثنائي الاتجاه
0.414	0.69	681.2	681	1	الزمن*الحرارة
-	-	991.9	30748	13	الخطأ
0.126	38.79	1024.1	30722	30	نقص التطبيق
-	-	26.4	26	1	الخطأ النقي
-	-	-	248257	43	المجموع

الجدول (9): تأثير المتغيرات في نشاط تخثر الحليب النوعي وفق المعادلة المختزلة.

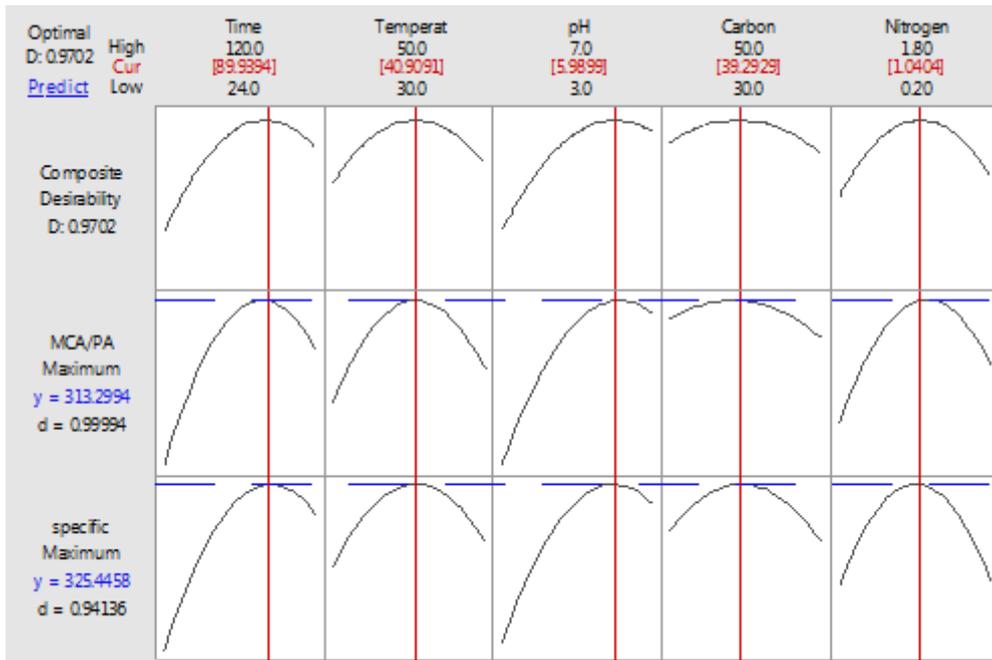
العامل	التأثير	معامل الانحدار	الخطأ المعياري للمعامل	قيم T	قيم الاحتمالية P-Value	معامل تضخم التباين VIF
الثابت	-	-89.8	50.5	-1.78	0.085	-
المكررات						
I		29.56	7.37	4.01	0.000	1.91
الزمن	35.57	17.79	3.80	4.69	0.000	83.66
الحرارة	9.8	4.9	33.5	0.15	0.885	11.33
pH	197.73	98.86	9.96	9.93	0.000	1.00
الكربون	3.48	1.74	9.96	0.17	0.862	1.00
النتروجين	10.77	5.39	9.96	0.54	0.593	1.00
الزمن*الزمن	-0.4050	-0.2025	0.0547	-3.70	0.001	84.38
الحرارة*الحرارة	-192.1	-96.1	31.5	-3.05	0.005	1.73
pH*pH	-230.9	-102.0	31.5	-3.24	0.003	1.73
الكربون*الكربون	-143.9	-72.0	31.5	-2.28	0.029	1.73
النتروجين * النتروجين	-274.9	-137.5	31.5	-4.36	0.000	1.73
الزمن*الحرارة	1.538	0.769	0.928	0.83	0.414	11.33

الجدول (10): تحليل التباين لمعادلة الانحدار المختزلة لنسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين.

المصدر	درجة الحرية DF	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj SS	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj MS	مؤشر فيشر F-Value	قيم الاحتمالية P-Value
الانحدار	10	187789	18779	19.60	0.000
المكررات	1	12787	12787	13.35	0.001
التأثير الخطي	4	126730	31683	33.07	0.000
الزمن	1	24091	24091	25.14	0.000
الحرارة	1	76	76	0.08	0.780
pH	1	101650	101650	106.10	0.000
النتروجين	1	914	914	0.95	0.336
تأثير تربيع العوامل	4	25645	6411	6.69	00.00
الزمن*الزمن	1	16528	16528	17.25	0.000
الحرارة*الحرارة	1	11277	11277	11.77	0.002
pH*pH	1	6906	6906	7.21	110.0
النتروجين*النتروجين	1	14243	14243	14.87	0.001
التفاعل ثنائي الاتجاه	1	1419	1419	1.48	0.232
الزمن*الحرارة	1	1419	1419	1.48	0.232
الخطأ	33	31617	958	-	-
نقص التطبيق	23	31616	988	1014.19	0.025
الخطأ النقي	1	1	1	-	-
المجموع	43	219406	-	-	-

الجدول (11): تأثير المتغيرات في نسبة نشاط التخثر/النشاط الحال للبروتين وفق المعادلة المختزلة.

العامل	التأثير	معامل الانحدار	الخطأ المعياري للمعامل	قيم T	قيم الاحتمالية P-Value	معامل تضخم التباين VIF
الثابت		-78.1	048.	3-1.6	30.11	
المكررات						
1		22.35	26.1	53.6	0.001	1.36
الزمن	32.46	16.23	43.2	5.01	0.000	62.99
الحرارة	-18.6	-9.3	33.0	-0.28	0.780	11.33
pH	201.64	100.82	9.79	10.30	0.000	1.00
النتروجين	19.12	9.56	9.79	0.98	0.339	1.00
الزمن*الزمن	-0.3866	-0.1933	0.0465	-4.15	0.000	63.29
الحرارة*الحرارة	-183.9	-92.0	26.8	-3.43	0.002	1.30
pH*pH	-143.9	-72.0	26.8	-2.68	0.011	1.30
النتروجين*النتروجين	-206.7	-103.4	26.8	-3.86	0.001	1.30
الزمن*الحرارة	2.220	1.110	0.912	1.22	0.232	11.33



الشكل 2: أمثلة إنتاج البروتينات متعددة الاستجابة. حيث يمثل محور السينات القيم المثالية (مدرجة باللون الأحمر)، ويمثل محور العنات القيم المتوقعة (مدرجة باللون الأزرق)، (D): هي الرغبة المركبة لجميع المؤشرات، (d): الرغبة المنفصلة لكل مؤشر على حدا، (0 ≤ d ≤ 1): حيث أن القيم الأعلى لمؤشر الرغبة هي القيم المفضلة، إذ تمثل (1) تحقيق الرغبة المثالية.

تأثير زمن التخمر: كان إنتاج الأنزيم في اليوم الأول من التحضين منخفضاً، كما كان النشاط الأنزيمي لا يذكر، ربما بسبب عدم كفاية الوقت لإنبات الأبواغ الفطرية. ازداد إنتاج الأنزيم ونشاطه في الأيام التالية، وقد أشارت نتائج التحليل الإحصائي إلى الوصول للعملية الأمثل لإنتاج الأنزيم بعد 89.94 ساعة من التحضين. ويعزى ذلك للزمن اللازم لنمو المزرعة والوصول لطور الثبات، إذ يزداد إنتاج البروتيناز في نهاية طور اللوغاريتمي وبداية طور الثبات (Alvarez et al., 2006, 625-630). وقد أشار Barnett و Escobar (1995، 695-700) إلى وصول مزارع الفطر *Rhizomucor miehei* إلى طور الثبات خلال 90-120 ساعة في ظروف نمو مشابهة.

انخفض إنتاج الإنزيم ونشاطه بعد اليوم الرابع من التحضين، ربما بسبب استنفاد المغذيات وتراكم الأحماض العضوية وانخفاض درجة الحموضة. نتائج مقارنة توصل إليها Beyenal وزملاؤه (527-532)، و Escobar و Barnett (1993، 1009-1013). **تأثير درجة الحرارة:** انخفض إنتاج الأنزيم ونشاطه، كما كان النمو الفطري ضعيفاً عند درجة حرارة 30°C. يُعد الفطر *Rhizomucor miehei* من الأنواع المحبة للحرارة المرتفعة (thermophilic)، ومن المتوقع تحسُّن النمو عند درجات الحرارة الأكثر ارتفاعاً، مما ينعكس على تخليق الأنزيمات، حيث لوحظ أعلى نشاط للأنزيم عند درجة حرارة 40°C. وانخفض نشاط الأنزيم عند المستويات الأعلى لدرجة الحرارة، وقد يعود ذلك إلى تجاوز الحرارة المثالية للنمو، أو تخريب الأنزيم في وسط التخمر. نتائج مشابهة توصل إليها Ayhan وزملاؤه (2001، 153-160).

تأثير الرقم الهيدروجيني: أدت قيم الـ pH المنخفضة (3) إلى تثبيط إنتاج الإنزيم، وكان النمو الفطري ضعيفاً، ويعزى ذلك إلى عدم مناسبة هذه القيم للنمو وإنتاج الأنزيمات. ازداد النمو والنشاط الإنزيمي تدريجياً بارتفاع الرقم الهيدروجيني، وصولاً إلى قيم الاستجابة المثلى عند درجة الحموضة (5.99)، نتائج مشابهة توصل إليها Silveira وزملاؤه (2005، 931-937).

تأثير تركيز الكربون: كان التركيز الأمثل لإضافة الجلوكوز هو 39.09 g/L، وقد أعطت التراكيز الأخرى قيم أدنى للمؤشرات المدروسة. يعود انخفاض إنتاج البروتيناز ونشاطه في المعاملات ذات التراكيز المنخفضة للجلوكوز في وسط التخمر إلى عدم كفاية هذه التراكيز للوصول للكتلة الخلوية المطلوبة وإنتاج الأنزيمات، أما انخفاض إنتاج البروتيناز المرافق لتراكيز الجلوكوز الأكثر ارتفاعاً فيعود إلى ما يعرف بكبح الأيض الهدمي (Catabolic repression)، ففي حال غياب الجلوكوز يشارك البروتيناز بتزويد الخلية بالأحماض الأمينية والبيبتيدات لتُشكَّل مصدراً للكربون والطاقة إلى جانب كونها مصدراً للنتروجين ونتيجةً لذلك فقد يحدث تثبيط لتخليق البروتيناز في ظروف الطاقة الخلوية المرتفعة وارتفاع تراكيز الجلوكوز (Chen et al., 2004, 489-498). نتائج مشابهة حول تثبيط إنتاج البروتيناز من *Rhizomucor miehei* بارتفاع تراكيز الجلوكوز في وسط التخمر أشار إليها Escobar و Barnett (1993، 1009-1013). يختلف التركيز الأمثل لإضافة الجلوكوز عن التراكيز التي أشار إليها Ayhan وزملاؤه (2001، 153-160)؛ و Amer وزملاؤه (2015، 1068-1081)؛ و Silveira وزملاؤه (2005، 931-937).

تأثير تركيز الكازئين: تشير النتائج إلى تحقق القيم المثلى لمؤشرات الاستجابة عند إضافة الكازئين بتركيز 1.02%، وتظهر قيم أدنى للمؤشرات عند التراكيز الأخرى. قد لا تكون التراكيز المنخفضة للكازئين كافية لتحفيز إنتاج البروتيناز ونشاطه، ويُفسَّر انخفاض الإنتاج المرافق للتراكيز المرتفعة بأنَّ الجينات المُشَفَّرة للأنزيمات اللازمة لاستهلاك النتروجين تُنظَّم عادةً بآليات استحثاث أو تحفيز متخصصة تخضع لآلية سيطرة رئيسية تعرف بآلية كبح استقلاب النتروجين (Nitrogen Metabolite Repression)، وتبعاً لهذه الآلية فالجينات تُعبَّر بمستويات عالية عند ظروف تحديد النتروجين فقط أما عند النمو بوجود مصادر جاهزة ومفضلة

من النتروجين فذلك يؤدي إلى إعطاء إشارة لإيقاف التعبير الجيني للأنزيمات المحللة، ويمكن بذلك حفظ المصادر النتروجينية الأكثر ارتباطاً حتى استهلاك المصادر المفضلة أو المتاحة (Berger *et al.*, 2008, 1385-1398; Tudzynski, 2014, 1-16). توافق هذه النتائج ما أشار إليه Silveira وزملاؤه (2005، 931-937) و Escobar و Barnett (1995، 695-700)؛ و De Lima وزملاؤه (2008، 578-585).

الاستنتاجات:

تمثلت الظروف المثلى للإنتاج في التحضين على درجة حرارة 40.91 °C، لمدة 89.94 ساعة، وضبط درجة الحموضة الابتدائية عند 5.99، وإضافة الجلوكوز والكازئين إلى وسط التخمر بالتراكيز 39.09 g/L، و 1.02% على التوالي. وبينت النتائج معنوية كل من الزمن، والـ pH في مؤشرات النشاط الأنزيمي للبروتيناز. وقد بلغت قيم نشاط التخثر النوعي ونسبة نشاط التخثر/النشاط النوعي 313.27 و 303.87 SU/mg على التوالي وهي قيم مقارنة للقيم المتوقعة وفق معادلتى الانحدار الخاصة بكل متغير، حيث يمكن استخدام هذه المعادلات للتنبؤ بقيم المتغيرات المستقلة والمتغيرات التابعة في دراسات لاحقة. ويوصى بتتقية وتوصيف البروتيناز المنتج تحت الظروف المثلى آنفة الذكر.

:References المراجع

1. الجماس هُذيل؛ يازجي صباح؛ كرك جمال. (2020). تأثير تركيب وسط التخمر في إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* المعزول من التربة السورية والمصنّف محلياً. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. (قيد النشر).
2. Alvarez, V. M., Von der Weid, I., Seldin, L., & Santos, A. L. S. (2006). Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2. *Letters in applied microbiology*, 43(6), 625-630.
3. 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. *Sciences*, 5(04), 1068-1081.
4. Andrade, V. S., Sarubbo, L. A., Fukushima, K., Miyaji, M., Nishimura, K., & Campos-Takaki, G. M. D. (2002). Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(2), 106-110.
5. Arima, K. Yu. J., and Iwasaki, S. (1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. *Methods in Enzymology*, 19, 446-460.
7. Ayhan, F., Çelebi, S. S., & Tanyolac, A. (2001). The effect of fermentation parameters on the production of *Mucor miehei* acid protease in a chemically defined medium. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76(2), 153-160.
8. Beyenal, H., Şeker, Ş., Salih, B., and Tanyolac, A. (1999). The effect of D-glucose on milk clotting activity of *Mucor miehei* in a chemostat with biomass retention. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 74(6), 527-532.
9. Berger, H., Basheer, A., Bock, S., Reyes-Dominguez, Y., Dalik, T., Altman, F., and Strauss, J. (2008). Dissecting individual steps of nitrogen transcription factor cooperation in the *Aspergillus nidulans* nitrate cluster. *Mol.Microbiol*, 69, 1385–1398
10. Chen, X. G., Stabnikova, O., Tay, J. H., Wang, J. Y., and Tay, S. T. L. (2004). Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge. *Extremophiles*, 8(6), 489-498.
11. Chisti, Y. (2014). Fermentation (Industrial)| Basic Considerations. In R. K. Robinson (Ed.), *Encyclopedia of food microbiology*. Academic press. UK. (p 664).
12. Crawley, M. J. (2007). *The R book*. John Wiley & Sons. UK. (p 327).
13. Dalglish, D. G. (1993). The enzymatic coagulation of milk. In P. F. Fox., P. L. McSweeney., T. M. Cogan., and T. P. Guinee (Eds.). *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Springer, Boston, MA. (P73).
14. De Lima, C. J. B., Cortezi, M., Lovaglio, R. B., Ribeiro, E. J., Contiero, J., and De Araújo, E. H. (2008). Production of rennet in submerged fermentation with the filamentous fungus *Mucor miehei* NRRL 3420. *World App Sci J*, 4, 578-585.
15. Demir, H. (2012). *Production of pectinase from aspergillus sojae by solid-state fermentation*. Doctoral thesis. School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology. (p15).
16. Escobar. J. M. and Barnett. S. M.. (1993). Effect of agitation speed on synthesis of *Mucor miehei* acid protease. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 1009-1013.
17. Escobar, J., and Barnett, S. (1995). Synthesis of acid protease from *Mucor miehei*: integration of production and recovery. *Process biochemistry*, 30(8), 695-700.

18. Fox, P. F., and McSweeney. (2012). Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In: Law, B. A. (Ed.). *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Springer Science & Business Media. New York. (p 1,7).
19. Jin, Q., and Kirk, M. F. (2018). pH as a primary control in environmental microbiology: 1. thermodynamic perspective. *Frontiers in Environmental Science*, 6: 21, 1-22.
20. Andr n A. (2021) Milk-Clotting Enzymes. In: A. L Kelly and L. B Larsen. (Eds.) *Agents of Change: Enzymes in Milk and Dairy Products*. Springer, Cham. (p 352).
21. Harboe, M., Broe, M. L., & Qvist, K. B. (2010). The production, action and application of rennet and coagulants. *Technology of cheesemaking*, 2. (P125)
22. Kunitz, M. (1947). Crystalline Soy Bean Trypsin Inhibitor II . General properties. *J. Gen. Physiol*, 30, 291-310.
23. Law B. A. (2002). Enzymes in the manufacture of dairy products. In R. J. Whitehurst and B. A. Law (Eds.). *Enzymes in Food Technology*. Sheffield. Academic Press. (92-94).
24. Law B. A. (2010). Enzymes in dairy product manufacture. In R. J. Whitehurst & M. Van Oort (Eds.). *Enzymes in food technology* (2nd ed.). Chinchester: Wiley-Blackwell. (pp 89-91).
25. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., and Randall, R. (1951). protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
26. Maria de Lourdes, T. M., & Rai, M. (2013). *Fungal Enzymes*. Boca Raton. CRC Press. (pp 121, 263).
27. McNeil, B., & Harvey, L. (2008). *Practical fermentation technology*. UK. John Wiley & Sons.(p.p 103, 106).
28. Sandhya, C., Sumantha, A., and Pandey, A. (2006). Proteases. In A. Pandey., C. Webb., M. Fernandes., and C. Larroche (Eds.). *Enzyme Technology*. New Delhi. Springer Science+Business Media, Inc. and Asiatech Publishers, Inc. (p 322).
29. Scott, R., Scott, J. E., Robinson, R. K., & Wilbey, R. A. (1998). *Cheesemaking practice*. New York. Springer Science & Business Media. (p 155).
30. Seker, S., Beyenal, H., and Tanyolac, A. (1999). Modeling milk clotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*. *Journal of food science*, 64(3), 525-529.
31. Silveira, G. G., Oliveira, G. M., Ribeiro, E. J., Monti, R., and Contiero, J. (2005). Microbial Rennet Produced by *Mucor miehei* in Solid-State and Submerged Fermentation. *Brazilian Archives of Biotechnology*, vol 48, n 6, pp 931-937.
32. Spreer, E. (2017). *Milk and dairy product technology*. UK. Routledge. (p 258-259).
33. Tudzynski, B. (2014). Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in microbiology*, 5; 656, 1-16.
34. 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. McSweeney., P. F. Fox., P. D. Cotter., & D. W. Everett (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics & Microbiology (Fourth Edition)*. Cambridge, Academic Press. (p. 92).

