تأثير الكربون والنتروجين في إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* Rm4

باستخدام تخمرات الحالة السائلة

هذيل الاحمد الجماس(1) ، صباح يازجي (2)، جمال كرك (3).

الملخص

تمت دراسة تأثير نوع وتركيز عدد من المصادر الكربونية والنتروجينية في إنتاج البروتياز من العزلة المحلية للفطر Rm4 Rhizomucor miehei في وسط تخمر سائل، وتمَّ تقدير كمية الأنزيم المُنتَج والفعالية الأنزيمية في الأوساط المختلفة، وقد أعطى الوسط الحاوي على الجلوكوز بتركيز 40% w/v عائداً ونشاطاً أنزيمياً أعلى منه في الأوساط الأخرى الحاوية على اللاكتوز أو الجلوكوز بتراكيز أخرى، كما كان لإضافة الكازئين بتركيز 1% w/v كمصدر للنتروجين الأثر الأكبر في تحفيز إنتاج البروتياز عنه في الببتون ومستخلص الخميرة. حيث أعطت عملية التخمر لمدة 5 أيام على درجة حرارة 37°c باستخدام الجلوكوز كمصدر للكربون بنسبة 40% w/v والكازئين كمصدر للنتروجين بنسبة 1% w/v مستخلصاً أنزيمياً بقيم 2.16 mg/mL، 369.72 SU/mL، 171.17 SU/mg، 543.71 PU/mg ، لكلٍ من المحتوى الأنزيمي، نشاط تخثر الحليب، النشاط النوعي، النشاط البروتيوليتي، ونسبة (نشاط التخثر/النشاط البروتيوليتي) على التوالي.

الكلمات المفتاحية: بروتياز، كربون، نتروجين، نشاط تخثر الحليب، نشاط بروتيوليتي، Rhizomucor miehei.

(1): طالب دكتوراه.

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

(3): أستاذ في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة الفرات.

المقدمة:

يعتبر البروتياز من أهم الأنزيمات الصناعية ويشكل حوالي 60% من إجمالي المبيعات العالمية للأنزيمات، وتعد الصناعات الغذائية أهم التطبيقات لأنزيمات البروتياز إلى جانب صناعة المنظفات، إذ يستخدم البروتياز في صناعة الخبز، معاملة منتجات وتكييف بروتينات فول الصويا، تطرية اللحوم وفي معاملات تخليق الأسبرتام (Rao *et al.*, 1998). تعتبر صناعة الأجبان التطبيق الرئيسي للبروتياز في صناعات الألبان، وتتمثَّل الوظيفة الأساسية للبروتياز في البدء بعملية تخثر الحليب، من خلال الفصل السريع وعالي التخصص للبروتينات الرئيسية للحليب (الكازئين) (Spreer, 2017).

يتم استخلاص الأنزيم المخثر للحليب من المعدة الرابعة للعجول الرضيعة ويدعى المستخلص بالمنفحة Rennet أما ناتج تنقيته بمكوناته النشطة فيدعى بالكيموزين (Osintsev and Qvsit, 2004) . إنَّ الإنتاج العالمي المتزايد للأجبان خلال السنوات الأخيرة بالارتباط مع انخفاض أعداد العجول المتاحة للذبح نتيجة الرغبة في الحصول على اللحم أدى إلى استنفاذ مصادر المنفحة التقليدية المتوفرة، حفزَّت هذه الحالة البحث عن مصادر بديلة لتغطية الاحتياجات المتزايدة من المنفحة لصناعات الأجبان (Uniacke-Lowe and Fox, 2017). استخدمت المُخثرات المستخلصة من مصادر حيوانية ونباتية كبدائل والتي أثبتت في معظمها عدم مناسبتها، بالإضافة إلى المصادر الميكروبية والتي لاقت قبولاً واسعاً (Tiwari, 2003).

وبالرغم من إظهار العديد من الأنزيمات القدرة على تخثير الحليب فإن أغلبها لا يصلح لأن يكون بديلاً لمنفحة العجول إذ أنها تبدي نشاط بروتيوليتي مرتفع وما يترتب عليه من خسارة في الدهن والنتروجين في المصل وانخفاض الجودة ومردود الخثرة وظهور الببتيدات ذات الطعم المر خاصة في الجبن المنضج (Whitehurst and Law, 2002). يُبدي البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* فعالية مرتفعة لتخثر الحليب ونشاط بروتيوليتي منخفض نسبياً، وتخصُّص دقيق في فصل الروابط الببتيدية المماثلة في كازئين كابا Phe105-Meth106 والتي يقوم الكيموزين بتفكيكها، كما يُبدي قيم pH ودرجات حرارة مثلى واستقرار عند الدرجات المستخدمة في معاملات تصنيع الأجبان، واحتياجات كالسيوم مماثلة. بالإضافة إلى جودة جبن عالية والاحتمال الضئيل لظهور المذاق المر (Scott, 1998).

يتأثر إنتاج البروتياز بشكل خاص بنسبة الكربون والنتروجين (C/N) ووجود بعض السكريات القابلة للاستقلاب أو غيابها، ووجود الأيونات المعدنية بالإضافة إلى عدد من العوامل الأخرى كالـ pH ودرجة الحرارة وزمن التحضين والتهوية وحجم اللقاح (Gupta and Lorenz, 2002).

تُعرَّف التخمرات السائلة بأنها نمو الأحياء الدقيقة في وسط سائل يحتوي على المغذيات اللازمة للنمو (Subramaniyam and Vimala, 2012). يتم الإنتاج الصناعي للأنزيمات الميكروبية بشكل رئيسي باستخدام التخمرات المغمورة لسهولة التعامل والتحكم الأمثل في العوامل البيئية، سهولة عمليات التهوية والخلط وإزالة الحرارة، سهولة فصل الخلايا عن الوسط وتنقية المنتج، والتحكم الدقيق بمكونات الوسط (Maria de Lourdes and Rai, 2013).

يُشكِّل 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. وتُحدِّد كمية النتروجين في أي وسط مقدار الكتلة الحيوية التي يمكن الوصول إليها عند توفر المقدار الكافي من الكربون والمغذيات الأخرى (McNeil and Harvey, 2008).

نظراً لأهمية الموضوع هَدَفَ هذا البحث إلى دراسة تأثير نوع وتركيز عدد من المصادر الكربونية والنتروجينية في إنتاج البروتياز من العزلة المحلية للفطر *Rhizomucor miehei* Rm4 باستخدام تخمرات الحالة السائلة.

مواد وطرائق البحث:

– **الفطر المستخدم:** استخدمت العزلة *Rhizomucor miehei* Rm4 اعتماداً على نتائج بحث سابق.

– **أوساط الزرع:**

وسط آجار دكستروز البطاطا (PDA): حُضِّرَ بحسب تعليمات الشركة الصانعة (Himedia)، استخدم لحفظ وتنشيط العزلات الفطرية وتحضير مُعلَّق الأبواغ.

وسط التخمر: ويتكون من 4.5 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.05 g/L $MgSO_4.7H_2O$, 2 g/L K_2HPO_4, 0.05 g/L KCl، و 2mL/L من محلول مغذي من العناصر الصغرى وفق المكونات:

1 g/L $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$, 1 g/L $ZnSO_4$, 0.5 g/L $MnSO_4$, 0.08 g/L $CuSO_4$ (Seker *et al*., 1999).

استُخدم الجلوكوز واللاكتوز كمصدر أساسي للكربون حيث أضيفت كلاً على حدا بتراكيز مختلفة (10-50 g/L)، ولاختيار المصدر النتروجيني استُبدل الكازئين، مستخلص الخميرة، البيبتون

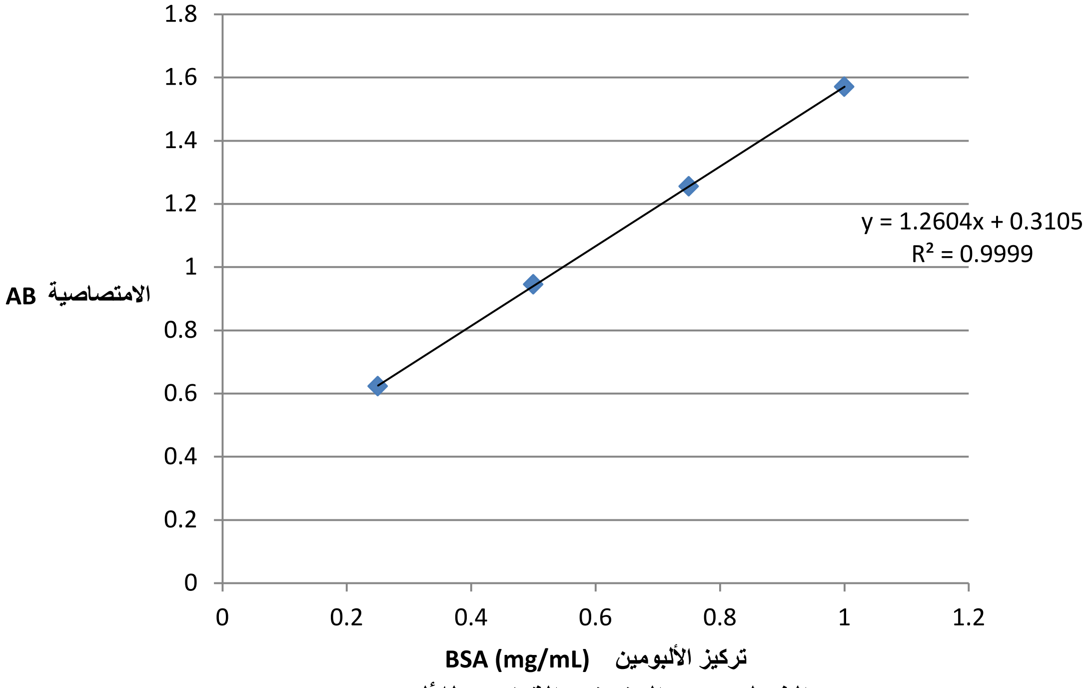
بكبريتات الأمونيوم ضمن مكونات وسط التخمر القياسي حيث أضيفت كلاً على حدا بتراكيز مختلفة (10-50 g/L).

وُزِّعَ 50 mL من وسط التخمر في دوارق (Erlenmeyer 250 mL) سُدَّت الدوارق بالقطن وعُقِّمت بالأوتوكلاف بدرجة 120 ̊c لمدة 15 m، بعد التبريد حُقِنت الدوارق تحت ظروف معقمة بـ 5%) V/W) أو ما يعادل 2.5 mL من معلق الأبواغ (10^7 بوغة/mL).

– **تحضير معلق الأبواغ:** لُقِّحَ الفطر على أطباق بتري 90 mm تحتوي على 20 mL من بيئة (PDA) وحُضِّنت الأطباق عند درجة 37 ̊c لمدة 5 أيام، وتمَّ الحصول على اللقاح بخدش سطح الآجار بوجود 30 mL من الماء المقطر والمعقم للحصول على معلق للأبواغ، قُدِّر تركيز الأبواغ بوساطة (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 عُرِّض للطرد المركزي (5000 rpm) لمدة 20 min وفُصلت الرُشاحة لتقدير المحتوى والنشاط الأنزيمي.

تحديد المحتوى البروتيني: حُدِّدَ المحتوى البروتيني للمستخلص الأنزيمي باستخدام طريقة (Lowry *et al.*, 1951) بقياس الامتصاصية عند طول موجة 750 nm وباعتماد ألبومين المصل البقري (B.S.A) كمنحني قياسي (الشكل 1).

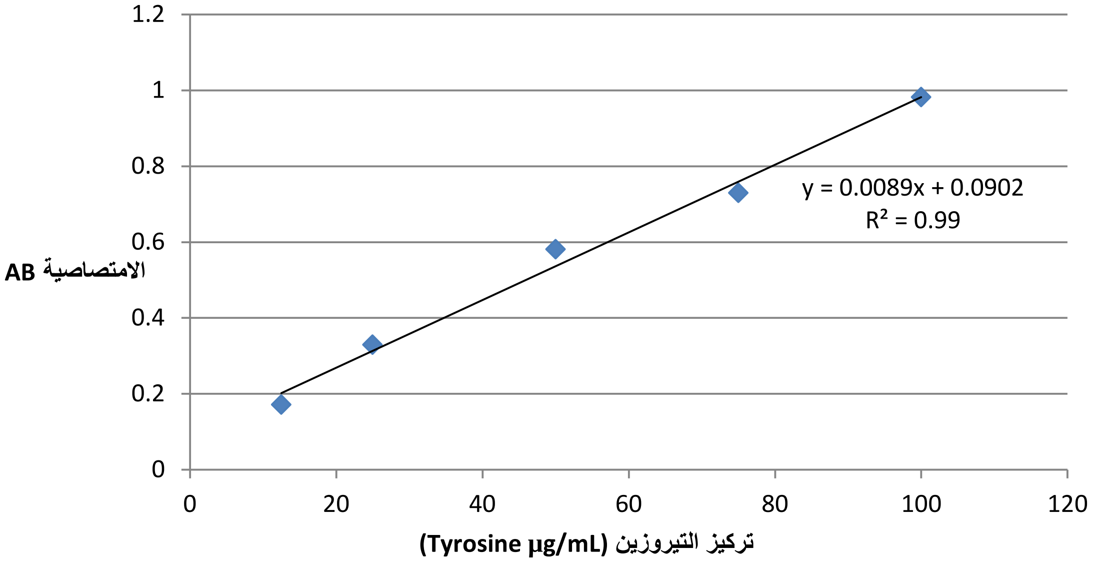


الشكل (1): المنحني القياسي للألبومين.

تحديد النشاط الأنزيمي:

نشاط تخثر الحليب (Milk Clotting Activity): حُدِّدَ تبعاً لطريقة (Arima and Iwasaki, 1970) وعُبِّر 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 كلوريد الكالسيوم خلال 40 min عند درجة حرارة 35°c.

النشاط البروتيوليتي (Proteolytic Activity): حُدِّدَ عن طريق تقدير هضم الكازئين تبعاً لطريقة (Kunitz, 1947) حيث أضيف 1 mL من الراشح الأنزيمي إلى 1 mL كازئين (1 % في 0.1 M محلول منظم فوسفاتي Sorensen، pH 6)، وحُضِّنَ عند درجة حرارة 35°c لمدة 20 min، ثم أضيفت 3 mL من محلول ثلاثي كلورو حمض الخل 5 % (TCA) لإيقاف التفاعل وترسيب الكازئين المتبقي. حُضِّرَ محلول الشاهد بنفس الطريقة عدا إضافة (TCA) إلى محلول التفاعل قبل إضافة المحلول الأنزيمي، تُركت المحاليل لمدة ساعة عند درجة حرارة 25°c، ثم نُبذت بسرعة (5000 rpm) لمدة 10 min. وبعد الترشيح قُدِّرَ المحتوى من الأحماض الأمينية والببتيدات المتحررة في المحلول الرائق باستخدام طريقة (Lowry *et al.*, 1951) عند طول موجة 750 nm وباستخدام منحني قياسي للتيروزين. وعُبِّر عن النشاط البروتيوليتي بوحدة بروتياز (PU) وهي الفعالية التي تؤدي إلى تحرير (1 µg) من التيروزين في الدقيقة الواحدة تحت ظروف القياس.



الشكل (2): المنحني القياسي للتيروزين.

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

نسبة نشاط تخثر الحليب/ النشاط البروتيوليتي (MCA/PA): قُدِّرت هذه النسبة بقسمة قيمة نشاط تخثر الحليب على قيمة النشاط البروتيوليتي للأنزيم الناتج، وتتناسب قيمة هذه النسبة طرداً مع جودة الأنزيم.

التصميم والتحليل الإحصائي: صُمِّمَت التجارب بواقع ثلاث مكررات لكل معاملة وعُبِّرَ عنها بمتوسطات، وتمَّ تحليل كافة النتائج اعتماداً على تحليل التباين (ANOVA) واختبار أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 0.01 باستخدام برنامج IBM SPSS Statics 21.

النتائج والمناقشة:

تأثير مصدر الكربون: يُبيِّن الجدول (1) اختلاف المحتوى والنشاط الأنزيمي باختلاف نوع وتركيز مصدر الكربون، حيث كان للجلوكوز الأثر الأكبر في إنتاج البروتياز ونشاطه، حيث بلغت المؤشرات المدروسة في الأنزيم المُنتَج الحد الأعلى عند إضافة الجلوكوز بتركيز (40 g/L) ويظهر فرق معنوي واضح في قيمة نشاط تخثر الحليب بالمقارنة مع القيم في الأوساط الأخرى. وكان للتراكيز الأخرى من الجلوكوز تأثيراً أقل في إنتاج الأنزيم. كما كان الفطر قادراً على النمو وإنتاج أنزيمات البروتياز في الأوساط الحاوية على اللاكتوز بكافة التراكيز، وقد أعطى أعلى نشاط وعائد أنزيمي في الأوساط ذات التركيز (20 g/L) وكان للتراكيز الأخرى من اللاكتوز تأثيراً أقل في إنتاج الأنزيمات. وانخفضت قيم المؤشرات المدروسة بشكل معنوي واضح في الأوساط ذات التراكيز المتطرفة لكل من الجلوكوز واللاكتوز.

يعود تفوّق الجلوكوز كمصدر للكربون إلى درجة إتاحته المرتفعة وسهولة استقلابه، ما يؤمن المادة اللازمة للنمو الأولي وإنتاج الأنزيمات، وهذا يوافق ما توصل إليه (De lima et al., 2008; Amer *et al.*, 2015) حول تفوّق الجلوكوز على اللاكتوز في تحفيز إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei*. إنَّ التراكيز المنخفضة للسكريات في وسط التخمر قد تكون غير كافية للوصول للكتلة الخلوية المطلوبة وإنتاج الأنزيمات، أما انخفاض إنتاج البروتياز المرافق للتراكيز المفرطة للسكريات فيعود إلى ما يعرف بكبح الأيض الهدمي (Catabolic repression) (Reddy and Abouzied, 1986)، ففي حال غياب الجلوكوز يشارك البروتياز بتزويد الخلية بالأحماض الأمينية والببتيدات لتُشكِّل مصدراً للكربون والطاقة إلى جانب كونها مصدراً للنتروجين ونتيجةً لذلك فقد يحدث تثبيط لتخليق البروتياز في ظروف الطاقة الخلوية المرتفعة وارتفاع تراكيز

الجلوكوز (Chen *et al*., 2004). وهذا يوافق ما توصل إليه (Beyenal *et al*, 1999) حول تثبيط إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* عند ارتفاع تركيز الجلوكوز في وسط التخمر.

جدول (1): تأثير مصدر الكربون في عائد ونشاط البروتياز من *Rhizomucor miehei*.

المصدر الكربوني	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	نشاط تخثر الحليب MCA (SU/mL)	نشاط التخثر النوعي (SU/mg)	النشاط البروتيوليتي PA (PU/mL)	نشاط التخثر/ النشاط البروتيوليتي (MCA/PA)
جلوكوز (10 g/L)	1.20[ab]	49.41[af]	41.18[ad]	0.19[a]	260.05[ac]
جلوكوز (20 g/L)	1.37[a]	82.35[bc]	60.11[bc]	0.30[b]	274.50[ab]
جلوكوز (30 g/L)	1.62[ac]	99.62[c]	61.49[bc]	0.35[c]	284.63[bde]
جلوكوز (40 g/L)	1.90[c]	123.53[d]	65.02[c]	0.41[d]	301.29[e]
جلوكوز (50 g/L)	1.64[ac]	94.30[ce]	57.50[bc]	0.35[c]	269.43[adf]
لاكتوز (10 g/L)	1.34[ab]	66.84[ab]	49.88[ab]	0.25[e]	267.36[adf]
لاكتوز (20 g/L)	1.38[a]	74.53[be]	54.01[bcd]	0.27[be]	276.04[ad]
لاكتوز (30 g/L)	1.20[ab]	42.12[fj]	35.10[a]	0.16[a]	263.25[af]
لاكتوز (40 g/L)	1.20[ab]	39.55[fj]	32.96[a]	0.15[a]	263.67[af]
لاكتوز (50 g/L)	0.90[b]	25.40[j]	28.22[a]	0.1[f]	254.00[cf]

* القيم في العمود الواحد التي تحمل الأحرف نفسها لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية (0.01).

تأثير المصدر النتروجيني: اعتماداً على النتائج السابقة تمَّ اعتماد الجلوكوز كمصدر للكربون حيث أضيف بتركيز (40 g/L) إلى مكونات وسط التخمر، وتمَّ اختبار عدد من المصادر النتروجينية، تضمنت الكازئين، مستخلص الخميرة، والببتون حيث تمَّ استبدالها بالمصدر النتروجيني المستخدم في وسط التخمر القياسي في الجزء السابق وأضيفت كلاً على حدا بتراكيز (10-50 g/L).

يُبيّن الجدول (2) الأثر الإيجابي للمصادر العضوية في تحفيز إنتاج البروتياز ونشاطه إذ ازداد المحتوى والنشاط الأنزيمي بإضافة جميع المصادر عند النسب المثالية للإضافة بما يفوق النشاط

الناتج عن استخدام سلفات الأمونيوم في وسط التخمر القياسي الذي أشار إليه (Seker *et al.*, 1999). كما تتضح قدرة الفطر على استهلاك المصادر النتروجينية المختلفة.

وتظهر أهمية الكازئين في تحفيز إنتاج البروتياز ونشاطه، حيث فاقت قيم مؤشرات المحتوى والنشاط الأنزيمي للمستخلص الأنزيمي المنتج بإضافة الكازئين إلى وسط التخمر القيم الحاصلة عند إضافة المصادر النتروجينية الأخرى بكافة التراكيز. وظهرت الفروق المعنوية واضحة في كافة المؤشرات المدروسة عند إضافة الكازئين بنسب 1% و2%، وقد أعطت إضافة الكازئين بنسبة 1% أعلى قيمة لنسبة نشاط التخثر/ النشاط البروتيوليتي (MCA/PA) حيث بلغت (543.71)، كما تميَّز المستخلص الأنزيمي المنتج بنشاط تخثر (369.72 SU) ونشاط نوعي (171.17 SU/mg).

وتفوَّقت إضافة الببتون على إضافة مستخلص الخميرة إلى وسط التخمر في تحفيز إنتاج الأنزيم ونشاطه، وكانت النسب المثلى للإضافة 1% و 2% لكل من مستخلص الخميرة والببتون على التوالي.

أخذت قيم المؤشرات الأنزيمية بالانخفاض بالتوازي مع الزيادة في نسب إضافة المصادر النتروجينية. وقد أدَّت إضافة مستخلص الخميرة والببتون بنسب 4% و5% إلى حدوث تثبيط كامل لإنتاج البروتياز في وسط التخمر.

أشار العديد من الباحثين إلى تفوّق المصادر العضوية في تحفيز إنتاج البروتياز بالمقارنة مع المصادر غير العضوية (Joo *et al.*, 2003; Sarker *et al.*, 2003)، تميل الأملاح النتروجينية لتغيير قيم الـ pH ويَنتُج عن استقلاب سلفات الأمونيوم أثر حامضي في وسط التخمر (Stanbury *et al.*, 2016)، ما قد يغير من الدرجة المثلى للنمو الفطري. وهذا يوافق ما توصل إليه (Khademi *et al.*, 2013) حول انخفاض إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* بإضافة المصادر النتروجينية غير العضوية.

التنشيط بمادة التفاعل لإنتاج أنزيم تخثر الحليب من *Absidia ramose* أشير إليه من قبل (Sannabhadti and Srinivasan, 1977)، كما أشير إلى زيادة ملحوظة في إنتاج أنزيم تخثر الحليب من الفطريات *Rhizomucor miehei, Rhizomucor pusillus* بإضافة مسحوق الحليب المقشود– وهي مادة تفاعل البروتياز– إلى وسط التخمر الصلب (Preetha and Boopathy, 1994; Thakur et al.,1990). الكازئين هو المكون الأساسي في مسحوق الحليب مما يؤكد دوره في تحفيز إفراز البروتياز وهذا ما أشار إليه (Silveira *et al.*, 2005).

أما سبب انخفاض الإفراز والنشاط الأنزيمي نتيجة زيادة تركيز المصدر النتروجيني وإتاحته فقد يُفسَّر بأن الجينات المُشفِّرة للأنزيمات اللازمة لاستهلاك النتروجين تنظم عادة بآليات استحثاث أو تحفيز متخصصة تخضع لآلية سيطرة رئيسية تعرف بآلية كبح أيض النتروجين (Nitrogen Metabolite Repression) وتبعاً لهذه الآلية فالجينات تعبر بمستويات عالية عند ظروف تحديد النتروجين فقط أما عند النمو بوجود مصادر جاهزة ومفضلة من النتروجين فإنه يؤدي إلى إعطاء إشارة لإيقاف التعبير الجيني للأنزيمات المحللة (Marzluf, 1997) ويمكن بذلك حفظ المصادر النتروجينية الأكثر ارتباطاً حتى استهلاك المصادر المفضلة أو المتاحة (Berger *et al.*, 2008).

أشار (Larcher *et al.*, 1996) إلى انخفاض إنتاج البروتياز من فطر *Scedosporium apiospermum* بإضافة تراكيز عالية من البيبتون وأشار بأنَّ الأحماض الأمينية الناتجة عن حلمهة الببتون سببت ما يسمى بكظم الأنزيم (Enzyme Repression). ويبدو أنَّ هذه الظاهرة منتشرة في الفطريات وخاصة الفطريات الخيطية كما في أجناس *Aspergillus* (Bouchara *et al.*, 1993)، *Rhizopus* (Schindler *et al.*, 1983).

وهذه النتائج تشابه ما توصلَّ إليه كل من (Silveira *et al.*, 2005; Foda *et al.*, 2012; Khademi *et al.*, 2013) .

جدول (2): تأثير النتروجين في عائد ونشاط البروتياز من *Rhizomucor miehei*.

المصدر النتروجيني	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	نشاط تخثر الحليب MCA (SU/mL)	نشاط التخثر النوعي (SU/mg)	النشاط البروتيوليتي PA (PU/mL)	نشاط التخثر/ النشاط البروتيوليتي (MCA/PA)
سلفات الأمونيوم	1.90[ab]	123.53[ai]	65.02[ae]	0.41[a]	301.29[a]
كازئين (%1)	2.16[ab]	369.72[b]	171.17[b]	0.68[b]	543.71[b]
كازئين (%2)	2.13[ab]	343.14[c]	161.10[b]	0.64[b]	536.16[b]
كازئين (%3)	2.11[ab]	307.02[d]	145.51[c]	0.90[c]	341.13[c]
كازئين (%4)	1.90[ab]	162.04[e]	85.28[d]	1.20[d]	135.03[d]

كازئين (5%)	1.82[b]	157.89[e]	86.75[d]	1.40[e]	112.78[e]
مستخلص خميرة (1%)	1.92[ab]	138.20[a]	71.98[ae]	0.30[f]	460.76[f]
مستخلص خميرة (2%)	1.2[c]	65.54[f]	54.62[af]	0.23[g]	284.96[g]
مستخلص خميرة (3%)	0.98[c]	30[g]	35.71[g]	0.20[g]	175[h]
مستخلص خميرة (4%)	0.92[c]	0[h]	0[h]	0.03[h]	0[i]
مستخلص خميرة (5%)	0.92[c]	0[h]	0[h]	0.02[h]	0[i]
ببتون (1%)	2.10[ab]	106.29[i]	53.00[f]	0.28[f]	397.46[j]
ببتون (2%)	2.30[a]	157.16[e]	70.50[e]	0.58[i]	279.59[g]
ببتون (3%)	2.15[ab]	122.54[ai]	59.32[af]	0.46[j]	277.26[g]
ببتون (4%)	0.90[c]	0[h]	0[h]	0.03[h]	0[i]
ببتون (5%)	0.87[c]	0[h]	0[h]	0.03[h]	0[i]

* القيم في العمود الواحد التي تحمل الأحرف نفسها لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية (0.01).

الاستنتاجات والتوصيات:

تأثَّر إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* Rm4 بشدة بنوع وتركيز المصدر الكربوني والنتروجيني، وكان لاختيار وسط التخمر المُكوَّن من الجلوكوز بتركيز 40% w/v والكازئين بتركيز 1% w/v الأثر الأكبر في تحفيز إنتاج البروتياز ونشاطه مقارنةً مع الأوساط الحاوية على المصادر الكربونية والنتروجينية الأخرى. ومن جهة أخرى كان للتراكيز المفرطة لكافة المصادر الكربونية والنتروجينية أثر سلبي في إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* Rm4 حيث أدت إلى تثبيط عملية الإنتاج. ويوصى بدراسة الظروف المثلى لإنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* Rm4 باستخدام تخمرات الحالة السائلة، وتنقية وتوصيف البروتياز المنتج من *Rhizomucor miehei* Rm4 من حيث الحركية والثباتية.

المراجع:

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.

Arima, K. Yu. J., and Iwasaki , S. (1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. *Methods in Enzymology, 19,* 446-460.

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

Beyenal, H., Şeker, Ş., Salih, B., and Tanyolaç, 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.

Bouchara, J. P., Larcher, G., Joubaud, F., Penn, P., Tronchin, G., and Chabasse, D. (1993). Extracellular fibrinogenolytic enzyme of *Aspergillus fumigatus*: substrate-dependent variations in the proteinase synthesis and characterization of the enzyme. *FEMS Immunology and Medical Microbiology, Jun;7(1),*81–91.

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.

De Lima, C. J. B., Cortezi, M., Lovaglio, R. B., Ribeiro, E. J., Contiero, J., & 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.

Foda, M., Moharam, M., Ramadan, M., and El-bendary, M. (2012). over production of milk clotting enzyme from *Rhizomucor miehei* through adjustment of growth under solid state fermentation conditions.*Australian Journal of basic and applied science, 6 (8),* 579-589.

Gupta, R., Beg, Q., and Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, *59*(1), 15-32.

Joo, H. S., Kumar, C. G., Park, G. C., Paik, S. R., and Chang, C. S. (2003). Oxidant and SDS-stable alkaline protease from Bacillus clausii I-52: Production and some properties. *Journal of applied microbiology*, *95*(2), 267-272.

Khademi, F., Abachi, S., Mortazavi, A., Ehsani, M. A., Tabatabaei, M. R., and Malekzadeh, F. A. (2013). Optimization of fungal rennet production by local isolate of *Rhizomucor miehei* under solid substrate fermentation system. *Journal of pharmacy and Biological science,V 5 –I 2*, pp115-121.

Kunitz, M. (1947). Crystalline Soy Bean Trybsin Inhibitor II . General properties. *J. Gen. Physiol, 30*, 291-310.

Larcher, G., Cimon, B., Symoen, F., Tronchin, G., Chabasse, D., and Philippe, J. (1996). A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochem. J, (315),* 119-126.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., and Randall, R. (1951). protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem. 193*, 265-275.

Maria de Lourdes, T. M., and Rai, M. (Eds.). (2013). *Fungal Enzymes*. CRC Press. (pp 263).

Marzluf, G. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolisim in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev, 61(1),* 17-32.

McNeil, B., and Harvey, L. (Eds.). (2008). *Practical fermentation technology*. John Wiley & Sons.(pp 103-104).

Osintsev, A. M., and Qvist, K. B. (2004). Study of the mechanism of the proteolytic stage of enzymatic coagulation of milk casein. *Colloid Journal*, *66*(2), 192-196.

Preetha, S., and R. Boopathy. (1994). Influence of culture conditions on the production of milk clotting enzyme from *Rhizomucor*. *World Journal of Microbiology and Biotechology. 10*, 527-530.

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.

Reddy, C. A., and Abouzied, M. M. (1986). Glucose feedback inhibition of amylase activity in *Aspergillus sp*. and release of this inhibition when cocultured with *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology*, *8*(11), 659-664.

Sannabhadti, S. S., and Srinivasan, R. A. (1977). Milk clotting enzymes from *Absidia ramosa*. Part 1. Factors influencing production. *Ind. J. Dairy Sci, 30,* 331–335.

Sarker, P. K., Talukdar, S. A., Deb, P., Sayem, S. A., and Mohsina, K. (2013). Optimization and partial characterization of culture conditions for the production of alkaline protease from Bacillus licheniformis P003. *SpringerPlus*, *2*(1), 506.

Scott, R., Scott, J. E., Robinson, R. K., and Wilbey, R. A. (1998). *Cheesemaking practice*. Springer Science & Business Media. (p 155).

Schindler, J., Lehmann, R., Pfeiffer, H., and Schmid, R. (1983). Extracellular Acid Protease of *Rhizopus rhizopodiformis*. *Enzyme Technology*. Berlin, Heidelberg; Springer- Verlag. (pp 69-77).

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.

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.

Spreer, E. (2017). *Milk and dairy product technology*. Routledge. (p 258-259).

Stanbury, P. F., Whitaker, A., and Hall, S. J. (2016). *Principles of fermentation technology*. (3Edition). Elsevier.(p 227).

Subramaniyam, R., and Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int J Sci Nat*, *3*(3), 480-486.

Thakur, M. S, karanth, N. G., and Nand, K. (1990). production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology, 32,* pp 409 413.

Tiwari, B. D. (2003). Microbial protein and its application in cheese making. In application of biotechnology in dairy and food prossecing. Karnal, Haryana, India; National Dairy Research Institute , pp 179-180.

Uniacke-Lowe, T., and Fox, P. F. (2017). Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties. In *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 69-113).

Whitehurst, R. J., and Law B. A. (2002). *Enzymes in Food Technology*. Sheffield Academic Press. (92-94).

Effect of Carbon and Nitrogen on Protease Production from *Rhizomucor miehei* Rm4 Using Liquid-State Fermentation

Houthail AlAhmad Aljammas[(1)], Sabah Yazeji[(2)], and Jamal Karak[(3)]

Abstract

The effect of the type and concentration of a number of carbon and nitrogenous sources on the production of protease from the local isolate of *Rhizomucor miehei* Rm4 was studied in a liquid fermentation medium. The amount of the produced enzyme and the enzymatic activity were estimated in the different media. The medium containing glucose with a concentration of 40% w/v gave a higher yield and enzymatic activity than it in other media containing lactose or glucose at other concentrations. The addition of casein at a concentration of 1% w/v as a nitrogen source had the greatest effect in stimulating protease production than in peptone and yeast extract. The performed fermentation process for five days at 37 ° C using glucose as a carbon source at a concentration of 40% w/v and casein as nitrogen source 1% gave enzymatic extract with values of 2.16 mg/ml, 369.72 units/ml, 171.17 SU/mg, 543.71 PU/mg, for protein content, milk clotting activity, specific activity, Proteolytic activity, and (milk clotting activity/ Proteolytic activity) ratio respectively.

Key words: Protease, Carbon, Nitrogen, Milk clotting activity, Proteolytic activity, *Rhizomucor miehei*.

(1) PhD student,

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

(3) Prof. Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, AlFurat University, Syria.