تأثير ترطيب وسط التخمر بالشرش والمولاس على إنتاج الرينين بوساطة فطر *Rhizomucor miehei* باستخدام تخمرات الحالة الصلبة

هذيل عبد الرزاق الأحمد الجماس وحسان الفتحي و وليد الخلف

قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة الفرات، دير الزور، سوريا
البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

استلام 2 مايو 2017م - قبول 27 مارس 2018م

الملخص

تقدم هذه الدراسة البديل الفطري الطبيعي للمنفحة البقرية مكلفة الإنتاج لتغطية احتياجات صناعة الأجبان المتزايدة محليًا وعالميًا، كما تبحث في حركة التفاعلات في أنظمة التخمر بهدف أَمْثَلَة عملية التخمر واستخدام المخلفات الصناعية في الإنتاج الإنزيمي. تم البحث في تأثير ترطيب وسط التخمر بعوامل مختلفة على إنتاج الرينين من فطر *Rhizomucor miehei* في وسط تخمر صلب استخدمت فيه نخالة القمح كمادة أساس، حيث تم ترطيب وسط النمو بمحلول معدني حمضي مغذي، (الشرش، والمولاس) كل واحد على حدة، وأنجز الاستنبات لمدة أربعة أيام بنسبة ترطيب 60% وفي درجة حرارة 37°c . وتم قياس المحتوى البروتيني، نشاط تخثر الحليب (MCA) Milk Clotting Activity، النشاط النوعي، نشاط تحلل البروتين (PA) Proteolytic Activity، نسبة نشاط تخثر الحليب/ نشاط تحلل البروتين (MCA/PA) للمستخلص الإنزيمي الناتج لتقييم جودة الإنزيم. وأظهرت النتائج أن الترطيب بالشرش أعطى مستخلصًا إنزيميًا بقيم (14, 67 PU/mL, 156.6 SU/mg, SU/mL 940, 6 mg/mL) للمحتوى البروتيني، نشاط تخثر الحليب، النشاط النوعي، نشاط تحلل البروتين، ونسبة (MCA /PA) على التوالي مقارنة مع (780, 5 mg/mL, 13.4, 58 PU/mL, 156 SU/mg, SU/mL)، (12.2, 59 PU/mL, 154 SU/mg, 724 SU/mL, 4.7 mg/mL) لكل من المحلول المعدني المغذي والمولاس على التوالي. مما يظهر نجاعة استخدام الشرش في صناعات التخمر.

الكلمات المفتاحية: تخمرات الحالة الصلبة، رينين، صناعة الجبن، فعالية إنزيمية، مخلفات صناعية، نخالة القمح.

المقدمة

يستخدم إنزيم المنفحة (الرينين) في صناعة الجبن وهو إنزيم البروتياز الحامضي، يظهر تأثير البروتياز الحامضي في عملية تخثر الحليب خلال مرحلتين: في المرحلة الأولى أو الإنزيمية يُحلَل الكازئين مائيًا بوساطة الرينين لينتج الباراكازئين الذي يشكل لاحقًا الخثرة في المرحلة الثانية (غير الإنزيمية)، يتم استخلاص الإنزيم المخثر للحليب من المعدة الرابعة للعجول الرضيعة ويدعى المستخلص بالمنفحة Rennet أما ناتج تنقيته بمكوناته النشطة فيدعى بالرينين أو الكيموزين (Osintsev and Qvsit, 2003; Yegin, 2011)، وحسب تصنيف الإنزيمات بوساطة الاتحاد العالمي للكيمياء الحيوية والبيولوجية الجزيئية The International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB, 2013) هو:

Rennin; EC 3.4.23.4; aspartyl proteinase (IUBMB Enzyme Nomenclature)

إن الإنتاج العالمي المتزايد للجبن خلال السنوات الأخيرة بالارتباط مع نقص إنتاج المنفحة البقرية أدى إلى ارتفاع سعر المنفحة التقليدية، هذه الحالة حفزت على البحث عن إنزيمات لتخثر الحليب من مصادر بديلة؛ حيث استعملت الإنزيمات المستخلصة من مصادر حيوانية ونباتية كبدائل، وأثبتت معظمها عدم مناسبتها، بالإضافة إلى المصادر الميكروبية التي لاقت قبولاً واسعًا (Tiwari, 2003).

يعطي العديد من الأحياء الدقيقة إنزيمات البروتياز إلا أنها لا تصلح كبدائل للمنفحة؛ إذ إنها تعطي تحللاً زائدًا للبروتين، تركزت الدراسات على بعض الأنواع من البكتيريا والفطريات، ويعد البروتياز البكتيري غير مناسب بسبب الفعالية العالية المحللة للبروتين، وانحصر الاستخدام مؤخرًا عند ثلاث سلالات فطرية لإنتاج المنفحة الميكروبية هي:

Rhizomucor miehei, Rhizomucor pusillus, and *Endothia parasitica* (Thakur *et al*., 1990; Kazemi-Vaysari, 2002; Silveira *et al*., 2005; Khademi, 2013).

يمتاز بروتياز فطر *Rhizomucor miehei*

بخصائص مشابهة للمنفحة البقرية؛ إذ يقوم بفصل الرابطة نفسها في سلسلة كابا كازئين Phe105 - Meth106 التي يقوم الكيموزين بتفكيكها وهو البديل المفضل للمنفحة البقرية (Tiwari, 2003).

يستخدم في معاملات التقانة الحيوية نوعان من التخمرات: تخمرات الحالة الصلبة Solid-State Fermentation (SSF) وهي تتم على مواد صلبة رطبة بغياب الماء الحر بشرط عدم انخفاض الرطوبة عن حد معين، وتخمرات الحالة السائلة أو المغمورة Submerged Fermentation (SmF) ويتم فيها التخمر في وسط سائل للحصول على نواتج الاستقلاب، وهي مناسبة للأحياء التي تحتاج إلى رطوبة مرتفعة كالبكتيريا، وتستهلك فيها مواد الوسط بسرعة، لذا فهي تحتاج إلى إضافة واستبدال مواد الوسط بشكل مستمر (Subramaniyam and Vimala, 2012)، أجريت الأبحاث سابقًا حول إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* باستخدام التخمرات المغمورة، وهي طريقة مكلفة وتحتاج إلى تجهيزات أكثر تعقيدًا. اتجهت الدراسات مؤخرًا إلى إنتاج البروتياز من هذا الفطر بوساطة تخمرات الحالة الصلبة، وهي طريقة سهلة واقتصادية ومناسبة بشكل خاص لإنتاج الإنزيم الفطري، حيث إن مواد التفاعل رخيصة ومتوفرة ومركزة جدًّا، وأغلب المواد الأولية لا تحتاج إلى تعقيم لانخفاض إمكانية التلوث الميكروبي بسبب انخفاض الرطوبة، وتستهلك فيها المواد ببطء وبشكل تدريجي، لذا يمكن استخدامها لفترة تخمر طويلة، ولا تحتاج المواد المستعملة إلى خلط مستمر لإحداث تجانس، وعمليات التهوية فيها بسيطة، ولا تحتاج إلى تقنية متطورة، وهي أقل احتياجًا للطاقة وتشغل مساحة أقل (الخفاجي، 1990; Subramaniyam and Vimala, 2012).

تستخدم في معاملات التقانة الحيوية مواد خام طبيعية أو مخلفات قابلة للتدوير مثل الليغنين، النخالة، طحين القمح، طحين الأرز، القطن، مستخلص الخميرة، دقيق الصويا، مولاس الشوندر، النشاء والسيللوز كمواد للتفاعل (Khademi *et al*., 2013).

تعد نخالة القمح خيارًا جيدًا للإنتاج الصناعي للإنزيم؛ إذ تحتوي 65 % كربوهيدرات، 16% بروتين، كالسيوم، حديد، مغنيزيوم، فوسفات، بوتاسيوم، صوديوم، زنك، وفيتامينات (B1, B2, B3, E, K)، والليبيدات (United state department of Agriculture National, 2016)، بالإضافة إلى رخص ثمنها، وهي مناسبة بشكل خاص لإنتاج الإنزيم الفطري (Singhania *et al*., 2010).

رغم الاستعمال الواسع لتخمرات الحالة الصلبة لا تتوفر معلومات كافية حول حركة التفاعلات في نظام التخمر؛ لصعوبة قياس عوامل النمو وتحليل النمو الخلوي وتحديد استهلاك مواد التفاعل، بسبب الطبيعة المتنوعة لمواد التفاعل ذات البنية المعقدة غذائيًّا وبنيويًّا، فالعوامل التي تؤدي إلى إنتاجية عالية غير مفهومة تمامًا، لذا فالإكثار والعملية المثلى تبقى إستراتيجية تجريبية (Sato and Sudo, 1999; Krishna, 2005).

تحرر صناعة الأجبان نحو 115 مليون طن سنويًّا من الشرش يصب 47 % منها في الأنهار والمجاري المائية، وبسبب التراكيز العالية من الأحماض العضوية للشرش فإن تراكيز الأكسجين المستهلك حيويًّا Biological Oxygen Demand (BOD) والأكسجين المستهلك كيميائيًّا Chemical Oxygen Demand (COD) تصل إلى 60000–40000) mg/L) و(50000-80000 mg\L) على التوالي (Canli, 2005)، كما تصل تراكيز BOD وCOD للمولاس إلى (42000-51000 mg\L) و-85000) 100000 mg\L) (Chaudhary *et al*., 2013) مما قد يسبب مشاكل بيئية خطيرة.

إن أحد طرق استثمار وتخفيف هذه الفضلات هو استخدامها في الإنتاج الإنزيمي، وتعد أوساط نمو رخيصة الثمن كما تمتاز هذه المواد بقيمة غذائية عالية؛ إذ يحتوي الشرش على 5% كربوهيدرات وخاصة اللاكتوز و 0.76 % بروتينات بالإضافة للأملاح المعدنية (Ca, Fe, Mg, P, K, Na, Zn) والفيتامينات (C, B1, B2, B3, B6, B12, B9, A)، ويحتوي المولاس على 75 % كربوهيدرات كما يحتوي على الأملاح المعدنية (Ca, Mg, Fe, P, K, Na, Zn) بالإضافة للفيتامينات (B1, B2, B3, B6) (USDA, 2016).

ونظرا لأهمية الموضوع في الإنتاج الإنزيمي أجري هذا البحث لبيان تأثير عوامل ترطيب وسط التخمر المختلفة على إنتاج الرينين من فطر *Rhizomucor Miehei* للوصول إلى أكبر عائد

ونشـاط إنزيمـي.

المواد وطرق العمل

مـكان تنفيـذ البحـث: أجريـت الدراسـة في مخابـر قسـم علـوم الأغذيـة بكليـة الزراعـة- جامعـة دمشـق في الفـترة بـين 2016/ 9/ 15 و2016/ 11/ 1.

المواد التجريبية

- **الفطـر المسـتخدم:** اسـتخدمت السـلالة الفطريـة *Rhizomucor Miehei* (NRRL 3420) التـي تـم الحصـول عليهـا مـن مركـز الثـروة الميكروبيـة (Cairo MIRCEN)، كليـة الزراعـة، جامعـة عـين شـمس، القاهـرة. نُشِـطت السـلالة الأصليـة المجفـدة وحُفظـت في وسـط مـن البطاطـا والدكسـتروز والآجـار بشـكل مائل داخـل أنابيب اختبـار عنـد درجـة حـرارة 4°c ، وتـم تجديدهـا كل أسـبوعين.

- **الأوساط الزرعية:**

مسـتخلص البطاطـا والدكسـتروز والآجـار Potato Dextrose Agar

استخدم وسـط PDA الجاهـز من شركـة MERCK- ألمانيـا، لحفـظ وتنشـيط السـلالة الفطرية.

وسط تحضير اللقاح (المزرعة الأم):

لقـح الفطـر المحفـوظ في الأنابيـب المائلـة في أطبـاق بـتري 90 mm تحتـوي عـلى(20 mL PDA) وحضـن عنـد درجـة 37°c لمـدة 4 أيـام، وتـم الحصـول عـلى اللقـاح بخـدش سـطح الآجـار بوجـود 40 mL مـن المـاء المقطـر والمعقـم لنحصـل عـلى معلـق للأبـواغ بتعـداد يقـارب 10^6 بوغـة/ mL تـم عدّهـا بوسـاطة Neubauer chamber (Marienfeed- Germany).

وسط التخمر

اسـتخدمت فيـه نخالـة القمـح كمصـدر رئيـس للكربـون، وتـم تحضـير 100 mL مـن محلـول ملحـي معـدني حمـضي يحـوي(g/L):

$ZnSO_4$. $7H_2O$: 0.07, $MgSO_4$. $7H_2O$: 0.07, $CuSO_4$. $7H_2O$: 0.07, $FeSO_4$: 0.09; 0.2 N HCl.

مـدد 10 mL مـن هـذا المحلـول إلى 1 L ، وتـم أخـذ 60 mL مـن المحلـول الأخـير لترطيـب 100 g مـن نخالـة القمـح الخـام (برطوبـة بدائيـة 10-8 %)، كـما اسـتخدم الـشرش والمـولاس كل واحـد عـلى حـدة لترطيـب نخالـة القمـح لباقـي المعامـلات بنسـبة (V/W 60%)بديـلاً عـن المحلـول المعـدني، وقـد استخدم المـولاس الناتـج عـن صناعـة تكريـر السـكر الخـام (شركـة سـكر حمـص) كـما تـم الحصـول عـلى الـشرش مـن مخلفـات صناعـة الجبـن البيضـاء.

وزع 20 g من النخالة المرطبة في دورق Erlenmeyer 250 mL، سـدت الـدوارق بالقطـن وعقمـت بالأوتـوكلاف 121°c لمـدة 20 min (Thakur *et al*., 1990; Kazemi - Vaysari *et al*., 2002)، وبعـد التبريـد حقنـت الـدوارق تحـت ظـروف معقمـة بمعلـق الأبـواغ بمعـدل 10^6 بوغـة لـكل 1 g نخالـة (Silveira *et al*., 2005). تـم التخمـير لمـدة أربعـة أيـام بنسـبة ترطيـب 60 % في درجـة حـرارة 37°c.

طرائق التحليل

- **استخلاص وتنقية الإنزيم:**

بعـد إتمـام التخمـر أضيفـت 100 mL مـاء مقطـر (4°c) إلى وسـط النمـو ووضعـت الـدوارق على هـزاز دوراني (180 rpm) لمـدة سـاعة واحـدة عنـد درجـة حـرارة 4-10°c ، تـم فصـل الوسـط الصلـب والميسـيليوم عـن المحلـول بالترشـيح باسـتخدام ورق ترشـيح (Whatman paper No1)، ولتصفيـة المحلـول الإنزيمـي عـرض للطـرد المركـزي (6000 rpm) عنـد 4°c لمـدة 20 min واعتـبر الجـزء الطـافي هـو الجـزء الحـاوي عـلى الإنزيـم، حيـث رشـح وحفـظ بحـرارة 8-10 °c (Sumantha *et al*., 2006)

- **تحديد المحتوى البروتيني:**

حـدد المحتـوى البروتيني باسـتخدام طريقـة (Lowry *et al*., 1951) باسـتخدام كاشـف فولـن فينـول.

- **تحديد النشاط الإنزيمي:**

نشـاط تخثـر الحليـب (MCA): تـم تحديـده تبعًـا لطريقـة (Arema and Iwasaki, 1970) وعـبر عنهـا بوحـدة سوكسـليت Soxhlet Unit (SU): وتعـرف بأنهـا كميـة الإنزيـم التـي تخثـر 1 mL مـن محلـول مـادة التفاعـل (10% حليـب مقشـود في 10 mM كلوريـد الكالسـيوم) خـلال 40 min عنـد درجـة حـرارة 35 °c.

نشاط تحلل البروتين (Proteolytic Activity)
تم تحديده بتقدير هضم الكازئين تبعًا لطريقة Kunitz (1947) حيث يضاف 1 mL من الراشح الإنزيمي إلى 1 mL كازئين (1 % في 0.1 M محلول منظم فوسفاتي pH 6.7، Sorensen)، ويحضن عند درجة حرارة 35°c لمدة 20 min، ثم يضاف 3 mL من محلول ثلاثي كلورو حمض الخل 5% (TCA) لإيقاف التفاعل، ويحضر محلول الشاهد بالطريقة نفسها عدا إضافة (TCA) إلى محلول التفاعل قبل إضافة المحلول الإنزيمي، وتترك المحاليل لمدة ساعة عند درجة حرارة 25 °c، ثم تنبذ بسرعة 5000 rpm لمدة 10 min عند درجة حرارة 10 °c، ويتم قياس امتصاص الضوء للمحلول الرائق (Supernatant) عند طول موجة 280 nm باستعمال المطياف الضوئي، ويقدر النشاط الإنزيمي بوحدة بروتياز (PU) وهي الفعالية التي تسبب زيادة بامتصاصية الضوء عند طول موجة 280 nm بمقدار درجة واحدة في الدقيقة تحت ظروف القياس.

النشاط النوعي للإنزيم: وهو عدد وحدات الفعالية الإنزيمية لكل mg بروتين.

– **دراسة تأثير عوامل الترطيب المختلفة لوسط التخمر:**

استخدم الشرش والمولاس والمحلول المعدني المغذي لترطيب وسط التخمر بشكل منفصل، وتم ضبط العوامل البيئية المؤثرة على عملية الإنتاج (الحرارة، نسبة الرطوبة، pH) بقيم تقارب ما جاء في الدراسات المرجعية (Thakur *et al*., 1990; Preetha and Boopathy, 1994; Silveira *et al*., 2005; Foda *et al*., 2012; Khademi *et al*., 2013) ، حيث أنجز الاستنبات في حاضنة عند درجة حرارة 37 °c لمدة أربعة أيام من بدء التلقيح وتم قياس كمية الإنزيم ونشاطه لكل معاملة لاختيار المحلول الأمثل.

– **التصميم والتحليل الإحصائي:**
صممت التجارب بواقع ثلاث مكررات لكل عينة وعبر عنها بمتوسطات، وتم تحليل كافة النتائج اعتمادا على تحليل التباين (ANOVA) واختبار أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 0.01 باستخدام برنامج IBM SPSS Statics 21.

النتائج والمناقشة
يوضح الجدول (1) كلاً من المحتوى الإنزيمي، نشاط تخثر الحليب (MCA)، النشاط النوعي للتخثر، نشاط تحلل البروتين (PA)، ونسبة (MCA/PA) للمستخلص الإنزيمي الناتج عن عملية التخمر بعد الترطيب بالعوامل المختلفة.

جدول (1): تأثير ترطيب وسط التخمر بمحاليل مختلفة على الإنتاج الإنزيمي

محلول الترطيب	المحتوى الإنزيمي (mg/mL)	نشاط تخثر الحليب MCA (SU/mL)	النشاط النوعي (SU/mg)	نشاط تحلل البروتين PA (PU/mL)	نشاط التخثر/ نشاط التحلل (MCA/PA)
محلول معدني مغذي	a b 5.0	a b 780	a 156.0	a 58	a 13.4
الشرش	a 6.0	a 940	a 156.6	b 67	a 14.0
المولاس	b 4.7	b 724	a 154.0	ab 59	a 12.2
LSD 0.01	1.2	180.12	4.6	8.18	1.89

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

كان ترطيب وسط التخمر بالمولاس أقل تأثيرًا على زيادة الإفراز والنشاط الإنزيمي، وظهر تفوق المعاملات الأخرى بشكل معنوي بقيم المحتوى الإنزيمي، والترطيب بالمحلول المعدني المغذي أعطى قيمًا أكبر لباقي المؤشرات عنها عند استخدام المولاس، لكن لم تكن هناك فروق معنوية واضحة بالزيادة.
الفطر *Rhizomucor miehei* غير قادر على تمثيل السكروز، ولإضافة التراكيز العالية من السكروز إلى وسط النمو أثر سلبي على النمو الفطري (Schipper,

(1978، ربما كان نشاط الفطر مركزًا على تحليل النسبة العالية من السكروز في المولاس للحصول على الجلوكوز، فقد حصل Silveira *et al*. (2005) على إنتاج إنزيمي منخفض عند استخدام المولاس والسكروز كوسطين للتخمر السائل لإنتاج الرينين من *Rhizomucor miehei* وأشار إلى محاولة الفطر لتحليل المصدر الكربوني للحصول على الجلوكوز للحث على اصطناع الإنزيم.

أو أن التراكيز العالية من الكربون في الوسط أدت إلى اتجاه العمليات الاستقلابية نحو تكوين الكتلة الخلوية (Seker *et al*. 1999)، بالإضافة إلى أن تكوين الأحماض العضوية بدءًا من الكربوهيدرات يغير من pH الوسط ما يؤثر على إنتاج الإنزيمات.

كما أن وجود العناصر المعدنية المتنوعة في وسط التخمر هو ضروري للإنتاج المثالي للبروتياز حيث وجد Sathya *et al*. (2009) أن إضافة عناصر Mg, Ca, Cu إلى وسط النمو زاد من إنتاج إنزيم تخثر الحليب من *Rhizomucor circinelloides*، وهذا ما أشار إليه Foda *et al*. (2012) حول تفوق نتائج الترطيب بالمحلول المعدني عن الترطيب بالمولاس.

لقد بلغ كلٌّ من المحتوى الإنزيمي، النشاط النوعي، ونسبة (MCA/PA) أعلى قيمة عند الترطيب بالشرش، وظهرت الفروق المعنوية لقيم المحتوى الإنزيمي ونشاط التخثر بين استخدام الشرش والمولاس، ولم تظهر فروقات معنوية بين استخدام الشرش والمحلول المعدني المغذي لجميع المؤشرات لكن كانت هناك زيادة حاصلة في جميع القيم.

لقد أشار Amer *et al*. (2015) إلى نجاعة استخدام الشرش كوسط رئيس للتخمر لإنتاج الرينين من *Rhizomucor miehei*، وفي دراسة أخرى لاحظ Tubesha and Al-Delaimy (2003) تفوق استخدام الشرش لترطيب وسط التخمر عن كل من المحلول المعدني المغذي والماء المقطر لإنتاج الرينين من السلالة J20 *Mucor* .

يحتوي الشرش على اللاكتوز كمصدر للكربون كما يحتوي على العناصر المعدنية الضرورية للاستقلاب، ويحتوي أيضًا على الثيامين بنسبة جيدة، والذي يشكل عنصرًا أساسيًّا لنمو الفطر *Rhizomucor miehei* (Schipper, 1978).

أظهرت هذه الدراسة أن أكبر قيمة للمحتوى البروتيني، نشاط التخثر، النشاط النوعي، ونسبة (MCA/PA) تم الحصول عليها عند ترطيب وسط التخمر بالشرش حيث بلغت 6 mg/mL، 940 SU/mL، 156.6 SU/mg، 14 على التوالي، مما يظهر إمكانية الاستفادة من الشرش الناتج عن صناعة الجبن في صناعات التخمر الذي يعد وسطًا غذائيًّا غنيًّا ومنخفض التكلفة؛ حيث أثرت عملية ترطيب وسط النمو بالشرش إيجابًا على إنتاج الإنزيمات ونشاطها، مما يزيد من الإنتاجية ويقلل من التكلفة بالإضافة إلى خفض التلوث والحفاظ على البيئة.

إن نشاط تخثر الحليب المرتفع للإنزيم الناتج (MCA) والقيمة المنخفضة لنشاط تحلل البروتين (PA) يظهر أن الإنزيمات المنتجة ملائمة لصناعة الجبن ويمكن اعتبارها بديلاً مناسبًا للمنفحة البقرية، ويمكن أن يكون الإنتاج التجاري للإنزيمات المستخلصة من فطر *Rhizomucor miehei* مجديًا نظرًا للكلفة المنخفضة والفعالية المرتفعة.

واعتمادًا على النتائج التي تم الحصول عليها نوصي باستخدام الشرش لدعم وسط التخمر لإنتاج الرينين من فطر *Rhizomucor miehei* وفي صناعات التخمر الأخرى، ونوصي بتمكين هذه الصناعة لدعم احتياجات صناعة الجبن المتزايدة محليًّا وعالميًّا.

وينبغي إجراء مزيد من الدراسات حول جدوى استخدام الأنواع المختلفة من المخلفات الزراعية والصناعية. ونوصي بإجراء دراسة حول طريقة الاستخلاص والتنقية الأنسب للإنزيم الناتج، كما ينبغي إجراء دراسات كيميوحيوية تتضمن دراسة بنية وتركيب الإنزيم الناتج عن فطر *Rhizomucor miehei*.

المراجع

الخفاجي، زهرة. 1990. التقنية الحيوية. بدون رقم الطبعة، معهد الهندسة الوراثية والتقانة الحيوية للدراسات العليا، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، العراق.

Amer, A., Hashem, M., Amer, M., and Goma, A. 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.

Preetha, S., and R. Boopathy. 1994. Influence of culture conditions on the production of milk clotting enzyme from rhizomucor. World Journal of Microbiology & Biotechology. 10: 527-530.

Sato, K., and Sudo, S. 1999. Small-scale solid-state fermentation. *In*: Demain, A. L., and Davies, J. E. (Eds.). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. (2. Ed). ASM Press; Washington DC. (pp. 61-79).

Sathya, R., Pradeep, B. V., Angayarkanni , J., and Palaniswamy , M. 2009. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. Biotechnol Bioprocess Eng. 14: 788-794.

Seker, S., Beyenal, H., and Taniolac, A. 1999. Modeling milk cotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*. Journal of Food Science. 64: 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. 48 (6): 931-937.

Singhania, R. R., Pate, A., and Pandey, A. 2010. The industrial production of enzymes. *In*: Soetaert, W. and Vandamme E. J. (Eds.). Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success. (pp 217-226).; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany.

Subramaniyam, R., and Vimala, R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. Society for Science Nature. 3(3): 480 -486.

Sumantha, A., Larroche, C., and Pandey, A. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. Food Technol. Biotechnol. 44(2): 211-220.

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: 409-413.

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

Canli, Ö. 2005. Physicochemical treatment of cheese whey effluent.Master thesis - Graduate School of Natural and Applied Sciences of Dokuz Eylül University- Izmir-Turkey. (p 1).

Chaudhary ,A. ,Sharma, A. , and Singh, B. 2013. Study of physio-chemical characteristics and biological treatment of molasses–based distillery effluent. International Journal of Bioassays. 2 (03): 612-615.

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.

IUBMB Enzyme Nomenclature. 2013. IUBMB Data base. Retrieved on 15- 10-2016 from: http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/.

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.

Khademi, F., Abachi, S., and Malekzadeh, A. 2013. Semi-purification and kinetic study of micro fungal rennet biosynthesized by local isolate of *Rhizomucor nainitalensis* using solid-state fermentation system: Concentration methods and determinant factors in clotting activity. European Jornal of Experimental Biology. 3(2): 167-174.

Krishna, C. 2005. Solid-state fermentation systems-an overview. Crit Rev Biotechnol. 25: 1-30.

Kunitz, M. 1947. Crystalline soy bean trybsin inhibitor II .General properties. J.Gen. Physiol. 30: 291-310 .

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

Osintsev, A., and Qvsit, K. 2003. Study the mechanism of proteolytic of enzymatic coagulation of milk casein. Colloid Journal. 66 (2): 192-196.

United States Department of Agriculture. 2016. National Nutrient Database for standard Reference ,Release 28. Retrieved on 20- 11-2016 from: https://ndb.nal.usda.gov/ndb/.

Yegin, S. 2011. cloning and expression of the aspartic proteinas from *Mucor mucedo*: structural characterization and technological properties in comparison with the native enzyme. Doctorate thesis, School of Engineering and Science- Ege University-Izmir, Turkey. (pp 37-38).

Tiwari, B. D. 2003. Microbial protein and its application in cheese making. In Proceedings of: application of biotechnology in dairy and food prossecing. Karnal, Haryana, India; National Dairy Research Institute, 4-24 November, 2003, pp 179-180.

Tubesha, Z. A., and Al-Delaimy, K. S. 2003. Rennin like milk coagulant enzyme produced by local isolate of *Mucor*. International Journal of Dairy Technology. 56 (4): 237–241.

Effect of Fermentation Medium Moistening with Whey and Molasses on Rennin Production by Fungi *Rhizomucor miehei* Using Solid-State Fermentation

Houthail AlAhmad Aljammas, Hassan Al fathi, Walid Alkhalaf.

Food Science Department, Agriculture Faculty, AlFurat University, Deirazzour, Syria.
Based on a part of M.Sc. thesis of the first author

Received 2 May 2017 - Accepted 27 March 2018

ABSTRACT

This paper introduces the natural fungal substitute of the calf rennet that is highly cost production to fulfill the requirements of increasing cheese production locally and internationally, and investigates in the interactions movement in the fermentation systems with the aim of optimization of fermentation process and the utilization of industrial waste material in the production of enzymes.

Investigations have been carried out on the effect of fermentation medium moistening with different agents on rennin production from fungi *Rhizomucor miehei* in solid fermentation medium, wheat bran was used as a substrate, the fermentation medium was moisturized with acidic mineral solution, whey, and molasses separately, cultivation was carried out with 60% moisture content at 37 °C. The protein content, milk clotting activity (MCA), specific activity, protelytic activity (PA), and (MCA/PA) ratio of the extracted enzyme were calculated to evaluate the quality of the enzyme. results showed that moistening with whey gave extracted enzyme with values (6 mg/mL, 940 SU/mL, 156.6 SU/mg, 67 PU/mL, 14) for the protein content, milk clotting activity, specific activity, proteolytic activity, and (MCA/PA) ratio respectively, comparing with (5 mg/mL, 780 SU/mL, 156 SU/mg, 58 PU/mL, 13.4), and (4.7 mg/mL, 724 SU/mL, 154 SU/mg, 59 PU/mL, 12.2) for mineral solution and molasses, respectively, which shows the efficacy of using whey in fermentation processes.

Key Words: Cheese manufacture, Enzyme activity, Industrial residue, Rennin, Solid-State Fermentation, Wheat bran.