وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة دمشق
كلية الهندسة الزراعية
قسم علوم الأغذية

إنتاج البروتياز الفطري بالطرائق الحيوية واستخدامه في صناعة الأجبان

The Production of Fungal Protease by Biomethods and Using It in the Manufacture of Cheese

إعداد
م. هُذيل عبد الرزاق الاحمد الجماس
بإشراف
أ. د. صباح يازجي أ. د. عبد الحكيم عزيزية

الملخص

جُمِعت 45 عينة من التربة المحلية، حُصِل منها على ست عزلات فطرية شُخِّصت ضمن النوع *Rhizomocur miehei* (Cooney et Emerson) Schipper. انتُخِبت العزلة الأكفأ في إنتاج البروتياز ورُمِّزت بـ Rm4. حُدِّدت الظروف المثلى لإنتاج البروتياز من العزلة Rm4 باستخدام منهجية الاستجابة السَّطحيَّة بعد الغربلة الأوَّليّة لمكوِّنات وسط التخمُّر. وقد تَفوُّق البروتياز المُنتَج باستخدام نظام التخمُّر الصّلب على الأنزيم المُنتَج باستخدام نظام التخمُّر السائل، من حيث المردود والفعاليّة الأنزيمية. أُجري التطفير لتحسين إنتاج البروتياز بالمعاملة بإيثيل سلفونات الميثان، والأشعّة فوق البنفسجيَّة، والأمواج الميكرويّة وفق جرعات مختلفة. وقد أظهرت الطفرة المُحدثة بالتَّعريض للأمواج الميكرويّة تفوّقها على باقي الطفرات الناتجة. كما تقاربت الخواصّ الحركيَّة لكلٍ من الأنزيم الطبيعي والمُطفَّر المُنقَّيين. وتَميَّز المُخثِّر الفطري بنشاط تخثُّر نوعيّ مرتفع، ونشاط نوعيّ حال للبروتين منخفض نسبيّاً، ونسبة مرتفعة لنشاط التخثُّرالنشاط الحالّ للبروتين، بالمقارنة مع المُحضَّر التجاري للمنفحة. وقد أظهر الجبن المُنتَج باستخدام المُخثِّر الفطري تقارباً كبيراً مع الجبن المُنتَج باستخدام المنفحة التِّجاريَّة، من حيث المردود الناتج، والخواصّ الحسِّيَّة.

القسم النظري

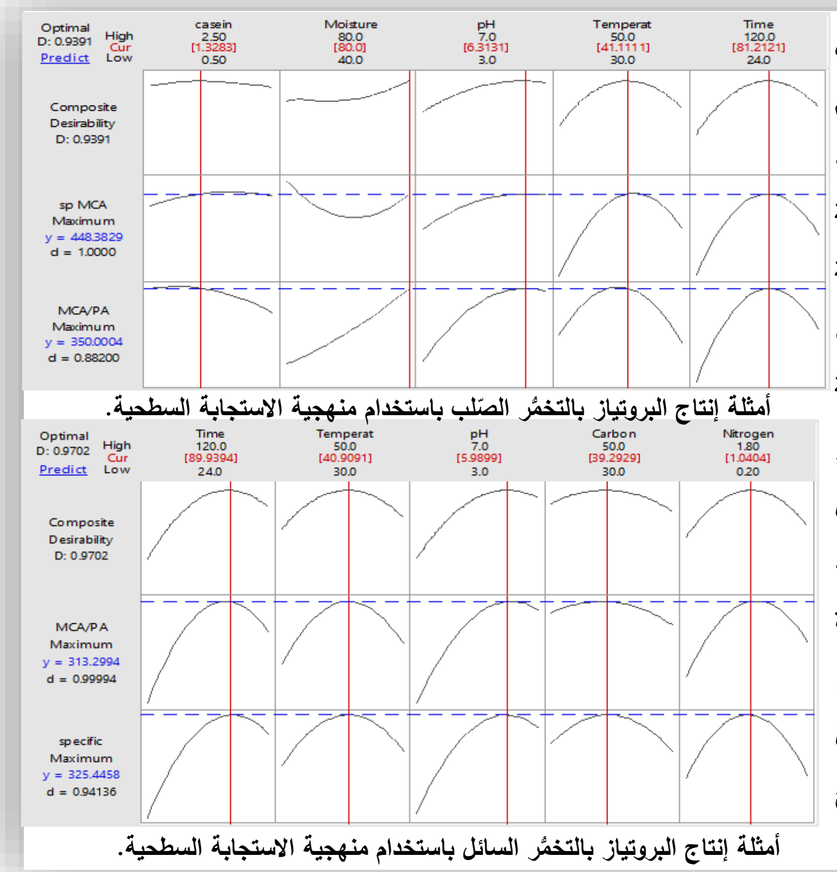
يُعتبر أنزيم البروتياز أحد أهم الأنزيمات الصناعية، ويشكل حوالي 60% من إجمالي المبيعات العالمية للأنزيمات. وتُعَد الصناعات الغذائية أهم التطبيقات لأنزيمات البروتياز إلى جانب صناعة المنظفات، إذ يستخدم البروتياز في صناعة الخبز، معاملة منتجات وتكييف بروتينات فول الصويا، وتطرية اللحوم، وفي معاملات تخليق الأسبرتام (Rao *et al.*, 1998).

تُمثِّل صناعة الأجبان التطبيق الرئيس للبروتياز في صناعات الألبان، وتتمثَّل الوظيفة الأساسية للبروتياز في البدء بعملية تخثر الحليب، من خلال الفصل السريع وعالي لتخصص للبروتينات الرئيسة في الحليب (الكازئين) (Spreer, 2017). تُعتبر منفحة العجول الشكل الأكثر استخداماً لأنزيمات تخثُّر الحليب، ويتم استخلاصها من المعدة الرابعة للعجول الرضيعة، ويُشكِّل الكيموزين المكون الأساسي للمنفحة.

أدى الإنتاج العالمي المتزايد للأجبان خلال السنوات الأخيرة بالارتباط مع انخفاض أعداد العجول المتاحة للذبح نتيجة الرغبة في الحصول على اللحم 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). استُخدِمَت المُخثِّرات الحيوانية الأخرى كبديل أقل تكلفة بالإضافة إلى المُخثِّرات النباتية، كما استخدمت المُخثِّرات الميكروبية والتي لاقت انتشاراً واسعاً. وبالرغم من إظهار العديد من الأنزيمات القدرة على تخثير الحليب فإن أغلبها لا يصلح لأن يكون بديلاً لمنفحة العجول بسبب الفعالية المرتفعة لتحلُّل البروتين (النشاط البروتيوليتي) (Law, 2010).

يُعتبر بروتياز فطر *Rhizomucor miehei* البديل المفضل للمنفحة، إذ يُبدي فعالية مرتفعة لتخثر الحليب ونشاط حال للبروتين منخفض نسبياً، 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 المر (Scott, 1998).

النتائج والمناقشة



أمثلة إنتاج البروتياز بالتخمُّر الصّلب باستخدام منهجية الاستجابة السطحية.

أمثلة إنتاج البروتياز بالتخمُّر السائل باستخدام منهجية الاستجابة السطحية.

تمثَّلت الظروف المثلى للإنتاج باستخدام التخمُّر السَّائل في اختيار الجلوكوز والكازئين كمصدرين للكربون والنتروجين بالتراكيز 39.09 g/L، و1.02% على التَّوالي، وضَبط الـ pH الابتدائي عند 5.99، والتحضين عند درجة حرارة 40.91 ℃، لمُدَّة 89.94 ساعة. كما تمثَّلت الظروف المُثلى للإنتاج باستخدام التخمُّر الصّلب في اختيار نخالة القمح كركيزة بمحتوى رطوبي 80% ومُدعَّمة بالكازئين بنسبة 1.33%، وضَبط الـ pH الابتدائي عند 6.31، والتحضين عند درجة حرارة 41.11 ℃، لمُدَّة 81.21 ساعة. وقد أدت المعاملة بالأمواج الميكرويّة لمُدَّة 150 sec إلى الحصول على طفرة متفوقة على باقي الطفرات الناتجة وفق جميع المؤشِّرات، إذ أظهر البروتياز المُنتَج تحسُّناً بمقدار 3.68، 1.98، 2.18 ضِعفاً في كلٍ من نشاط تخثُّر الحليب الكُلِّيّ، ونشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ للبروتين، على التَّوالي بالمقارنة مع أنزيم العزلة الأصل. كما أظهرت هذه الطفرة ثباتاً في قدرتها على إنتاج البروتياز لمُدَّة 8 أجيال، وقد رُمِّزت بـ MW150. وقد أدَّت خطوات التنقية إلى ارتفاع الفعاليّة النَّوعيّة لأنزيم العزلة الأصل Rm4 بمقدار 8.5 أضعاف، وبحصيلة أنزيمية 4.9%. كما ازدادت الفعاليّة النَّوعيّة لأنزيم العزلة MW150 بمقدار 5.19 أضعاف، وبحصيلة أنزيمية 4.01%. وباستخدام تقنية الرحلان الكهربائي قُدِّرَ الوزن الجزيئي للبروتياز المُنقَّى المُنتَج من كلٍ من العزلتين Rm4 و MW150 بحوالي 39.77 kDa، و40.62 kDa، على التَّوالي. تقاربت الخواصّ الحركيَّة لكلٍ من الأنزيم الطبيعي والمُطفَّر المُنقَّيين، حيث تحقَّقَ أقصى نشاط لتخثُّر الحليب عند درجة حرارة 57.5 C؛ و pH 5، وتركيز 9 g/L من كلوريد الكالسيوم. كما تحقَّقَت أعلى قيم للنشاط الحالّ للبروتين عند درجة حرارة 57.5 ˚C، و pH 4. كانت الأنزيمات مستقرَّة في المجال الحراري 40-50 °C لمُدَّة 48 hrs، كما استقرَّت نسبياً عند الدَّرجات 60 °C و70 °C لمُدَّة 105 min و10 min على التَّوالي، وثُبِّطَت عند التَعرُّض للدرجتين السابقتين لفترات أطول. وكان الأنزيم مُستقِّراً اتجاه التغيُّر في قيم الـ pH ضمن المجال 3-7 pH. وتمثَّل أثر كلوريد الصوديوم في تحفيز نشاط تخثُّر الحليب وتثبيط النشاط الحالّ للبروتين. بلغت النسبة المثلى لإضافة الأنزيم إلى الحليب 6000 SU/mL. وقد أظهر الجبن المُنتَج باستخدام المُخثِّر الفطري تقارباً كبيراً مع الجبن المُنتَج باستخدام المنفحة التِّجاريَّة، من حيث المردود الناتج، والخواصّ الحسِّيَّة.

المراجع

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. (91-94).

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.

Scott, R., Scott, J. E., Robinson, R. K., and Wilbey, R. A. (1998). *Cheesemaking practice* (3rd ed.). New York: Springer Science & Business Media. (pp 154- 157).

Spreer, E. (2017). *Milk and dairy product technology* (A. Mixa, Trans.). USA: Taylor and Francis. (Original work published 1995). (p.p 259, 263).

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).