الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة دمشق
كلية الهندسة الزراعية
قسم علوم الأغذيـة

إنتاج البروتياز الفطري بالطرائق الحيوية واستخدامه في صناعة الأجبان

أطروحة مقدمة ضمن متطلبات الحصول على درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية (علوم الأغذية)

إعداد

هُذيل الاحمد الجماس

بإشراف

أ. د. صباح يازجي
مشرفاً رئيساً

أ. د. عبد الحكيم عزيزية
مشرفاً مشاركاً

2023 م- 1444 هـ

الملخص

جُمِعت 45 عينة من التربة المحلية، حُصِل منها على ست عزلات فطرية شُخِّصت ضمن النوع *Rhizmocur 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 لمكوّنات وسط التخمُّر. وقد تمثَّلت الظروف المثلى للإنتاج باستخدام تخمُّر الحالة السَّائلة 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 تخمُّر الحالة الصّلبة 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 بلغت قيم نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ للبروتين للمستخلص الأنزيمي المُنتَج بالتخمُّر السائل تحت الظروف المثلى 303.87 SU/mg، و314.30 على التَّوالي، بينما بلغت في المستخلص الأنزيمي المُنتَج بالتخمُّر الصّلب 441.90 SU/mg، و388.66 على التَّوالي.

أُجري التطفير لتحسين إنتاج البروتياز بالمعاملة بإيثيل سلفونات الميثان، والأشعّة فوق البنفسجيَّة، والأمواج الميكرويّة وفق جرعات مختلفة. وقد أظهرت الطفرة المُحدثة بالتَّعريض للأمواج الميكرويّة (2450 MHz) لمُدَّة 150 sec تفوّقها 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 الكُلّيّ، 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.

أُجريت التنقية الجزئيَّة لبروتياز العزلتين الأصل والمُطفَّرة بدءاً من الترسيب بسلفات الأمونيوم، ثُمَّ باستخدام عمود الترشيح الهالمي Sephadex G-100. وقد أدَّت خطوات التنقية إلى ارتفاع الفعاليّة النَّوعيّة لأنزيم العزلة 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 (SDS-PAGE) قُدِّرَ الوزن الجزيئي للبروتياز المُنقَّى المُنتَج من كلٍ من العزلتين Rm4 وMW150 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 ℃، و pH 5، وتركيز 9 g/L من كلوريد الكالسيوم. كما تحقَّقَت أعلى قيم للنشاط الحالّ للبروتين عند درجة حرارة 57.5 ℃، و pH 4. كانت الأنزيمات مستقرَّة في المجال الحراري 40-50 ℃ لمُدَّة 48 hrs، كما استقرَّت نسبياً عند الدَّرجات 60 ℃ و70 ℃ 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 pH 3-7. وتمثَّل أثر كلوريد الصوديوم في تحفيز نشاط تخثُّر الحليب وتثبيط النشاط الحالّ للبروتين. وبلغت قيمة ثابت ميكاليس K_m والسرعة القصوى V_{max} لبروتياز العزلة Rm4 اتجاه الكازئين 19.47 mg/mL، و2.57 µg/min على التَّوالي بناءً على حساب النشاط التحللي، كما بلغت هذه القيم في بروتياز العزلة المُطفَّرة 26.29 mg/mL، و2.08 µg/min لكلٍ من K_m، وV_{max} على التَّوالي. وسُجِّلَت أعلى فعالية تحلُّلية لبروتياز Rm4 وMW150 عند التراكيز 4% و2% على التوالي للكازئين. كما قُدِّرَت قيم K_m وV_{max} اتجاه حليب الفرز مُعاد التَّكوين بناءً على حساب نشاط تخثُّر الحليب، إذ بلغت 0.201 g/mL، و0.0030 g/sec على التَّوالي لبروتياز العزلة Rm4، و0.152 g/mL، و0.0034 g/sec على التَّوالي لبروتياز العزلة MW150، وسُجِّلَت أعلى فعالية للتخثر لبروتياز العزلتين Rm4 وMW150 عند تركيز 10%، و15% على التَّوالي للحليب الفرز. وقد بلغت قيم V_{max} و K_m اتجاه الحليب كامل الدَّسم مُعاد التَّكوين 0.0080 g/mL، و0.001 g/sec على التَّوالي لبروتياز العزلة Rm4، بينما بلغت 0.207 g/mL و0.048 g/sec على التَّوالي لبروتياز العزلة MW150. وسُجِّلَت أعلى فعالية للتخثر لبروتياز العزلتين Rm4 وMW150 عند التراكيز 4% و3.36% على التَّوالي للحليب كامل الدَّسم. استُخدِمَ بروتياز العزلة Rm4 المُنقَّى لصناعة الجبن الأبيض وفقاً للطريقة التقليدية، بعد تحديد النسبة المثلى لإضافة الأنزيم إلى الحليب والتي بلغت 6000 SU/mL. وقد أظهر الجبن المُنتَج باستخدام المُخثِّر الفطري تقارباً كبيراً مع الجبن المُنتَج باستخدام المنفحة التِّجاريَّة، من حيث المردود الناتج، والخواصّ الحسِّيَّة.

الكلمات المفتاحية: بروتياز، تَخمُّر، تطفير، تنقية، حركيَّة، كربون، نتروجين، نشاط تخثُّر الحليب، نشاط حال للبروتين، *Rhizomucor miehei*.

Summary

Forty-five samples were collected from the local soil, of which six fungal isolates were classified as *Rhizomucor miehei* (Cooney et Emerson) Schipper. The most efficient protease-producing isolate was selected and coded as Rm4. After the preliminary screening of the fermentation medium components, the optimum conditions for protease production from Rm4 isolate were determined by using the response surface methodology.

The optimal conditions for protease production through liquid-state fermentation were demonstrated in the selection of glucose and casein as carbon and nitrogen sources at concentrations of 39.09 g/L and 1.02%, respectively, adjustment of the initial pH at 5.99, and incubation for 89.94 hr at 40.91℃. The optimal conditions for protease production through solid-state fermentation were demonstrated in the selection of wheatbran as substrate with a moisture content of 80% and supplemented with 1.33% casein, adjustment of the initial pH at 6.31, and incubation for 81.21 hr at 41.11℃. Specific clotting activity, and milk-clotting activity/ proteolytic activity values of the enzymatic extract produced through liquid fermentation under the optimized conditions were 303.87 SU/mg, and 314.30, respectively, whereas they were 441.90 SU/mg, and 388.66, respectively for the enzymatic extract produced through solid fermentation.

Mutagenesis with different doses of ethyl methanesulfonate, ultraviolet, and microwaves, was performed to improve the protease production. The mutant induced by microwaves irradiation (2450MHz) for 150 sec showed its superiority among others according to all indicators, as its protease presented 3.68, 1.98, 2.18 folds improvement in total milk-clotting activity, specific clotting activity, and milk-clotting activity/ proteolytic activity ratio, respectively than those in the original isolate enzyme. The mutant was stable for 8 generations. It was coded as MW150.

The partial purification of proteases from the original and mutated isolates was conducted by precipitation with ammonium sulphate followed by gel filtration using Sephadex G-100. The purification steps resulted in higher specific activity for Rm4 protease with 8.5 fold and a recovery of 4.9%. Specific activity of MW150 protease was also increased by 5.19 fold with a recovery of 4.01%. Using electrophoresis (SDS-PAGE) technique, the molecular weights of the purified proteases produced by Rm4 and MW150 isolates were estimated at 39.77 kDa, and 40.62 kDa, respectively.

The kinetic properties of the wild-type and mutated enzymes were similar, where the maximum milk-clotting activity was achieved at 57.5 °C, pH 5, and 9 g/L of calcium chloride, whereas maximum proteolytic activity was achieved at 57.5 °C, and pH 4. Both enzymes were stable in the temperature range of 40-50 °C for 48 hrs. At 60 °C and 70 °C enzymes were releatively stable for 105 min and 10 min, respectively,

whereas they were inhibited when exposed to the aforementioned temperature for longer periods. Both enzymes were stable against pH changes between 3 and 7. The effect of sodium chloride by stimulating milk-clotting activity and inhibiting proteolytic activity. Based on the determination of proteolytic activity, the Michaelis-Menten constant (Km) and maximum velocity (Vmax) values exhibited by Rm4 protease with casein as a substrate were 19.47 mg/mL and 2.57 µg/min, respectively. For MW150 protease, Km and Vmax were 26.29 mg/mL and 2.08 µg/min, respectively. Maximum proteolytic activity of Rm4 and MW150 proteases was achieved using 4% and 2% casein, respectively. Based on the determination of milk-clotting activity, Km and Vmax were determined using reconstituted skimmed milk as a substrate, where their values reached 0.201 g/mL and 0.0030 g/sec, and 0.152 g/mL and 0.0034 g/sec, for Rm4 and MW150 proteases, respectively. Maximum milk-clotting activity of Rm4 and MW150 proteases were achieved using 10% and 15% reconstituted skimmed milk, respectively. For reconstituted whole milk, Km and Vmax values were 0.0080 g/mL and 0.001 g/sec, respectively for Rm4 protease, and 0.207 g/mL and 0.048 g/sec, respectively for MW150 protease. Maximum milk-clotting activity of Rm4 and MW150 proteases were achieved using 4% and 3.36% reconstituted whole milk, respectively.

The purified protease produced by Rm4 isolate was used in the production of white cheese according to the traditional method after the optimal enzyme-to-milk ratio was determined (6000 SU/L). Cheese made by using fungal coagulant was quite similar to that made with commercial rennet, in terms of yield and sensory properties.

Keywords: Carbon, Fermentation, Kinetic, Milk-clotting activity, Mutagenesis, Nitrogen, Purification, Protease, Proteolytic activity, *Rhizomucor miehei*.

Syrian Arab Republic
Ministry of Higher Education and Scientific Research
Damascus University
Faculty of Agriculture
Food Science Department

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

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctorate in Agriculture Engineering (Food Science)

Prepared by

Houthail Alahmad Aljammas

Supervised by

Prof. Sabah Yazji
Food Science Department
Agriculture faculty
Damascus University
Main Supervisor

Prof. Abdulhakim Azizieh
Food Science Department
Agriculture Faculty
Damascus University
Associate Supervisor

2023 AD-1444 AH