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

إنتاج البروتياز الفطري بالطرائق الحيوية واستخدامه في صناعة الأجبان

أطروحة مقدمة لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية (علوم الأغذية)

إعداد

هُذيل عبد الرزاق الاحمد الجماس

إشراف

أ. د. صباح يازجي
قسم علوم الأغذية
كلية الهندسة الزراعية- جامعة دمشق
مشرفاً رئيساً

أ. د. عبد الحكيم عزيزية
قسم علوم الأغذية
كلية الهندسة الزراعية- جامعة دمشق
مشرفاً مشاركاً

1444 هـ- 2023 م

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

إنتاج البروتياز الفطري بالطرائق الحيوية واستخدامه في صناعة الأجبان

أطروحة مقدمة لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية (علوم الأغذية)

إعداد

هُذيل عبد الرزاق الاحمد الجماس

إشراف

أ. د. صباح يازجي
قسم علوم الأغذية
كلية الهندسة الزراعية- جامعة دمشق
مشرفاً رئيساً

أ. د. عبد الحكيم عزيزية
قسم علوم الأغذية
كلية الهندسة الزراعية- جامعة دمشق
مشرفاً مشاركاً

1444 هـ- 2023 م

نوقشت هذه الأطروحة الموسومة بعنوان "إنتاج البروتياز الفطري بالطرائق الحيوية واستخدامه في صناعة الأجبان" يوم الاثنين الموافق 2023/5/8 في جلسة علنية، وأجيزت من قبل لجنة التحكيم.

أعضاء لجنة التحكيم	التوقيع
الأستاذ الدكتور محمد محمد	.....
الأستاذ الدكتور عبد الوهاب مرعي	.....
الأستاذ الدكتور أحمد هدال	.....
الأستاذ الدكتور صباح يازجي	.....
الأستاذ الدكتور نزار عيسى	.....

تصريح

أُصرِّح بأنَّ البحث الموصوف في هذه الأطروحة بعنوان "**إنتاج البروتياز الفطري بالطرائق الحيوية واستخدامه في صناعة الأجبان**" لم يسبق أن قُدِّم للحصول على شهادة أخرى في هذه الجامعة أو في أيِّ جامعة أخرى أو أيِّ معهد تعليمي، ولا يوجد أيّ جزء من هذه الأطروحة تمَّ أخذه بالكامل من عمل آخر. وأنَّ كافة الأعمال والنتائج المذكورة هي نتيجة جهودي الشخصية وبتوجيه من المشرف والمشرف المشارك، وأنَّ أيَّة معلومات أو نتائج أخرى ذُكِرت قد نُسِبت إلى مصادرها ومؤلِّفيها في النَّصّ وفي قائمة المراجع.

المرشح

هُذيل عبد الرزاق الاحمد الجماس

Declaration

I hereby declare that the research described in this thesis titled "**The Production of Fungal Protease by Biomethods and Using It in the Manufacture of Cheese**" has not previously been submitted for another degree at this university or at any other university or educational institute. No part of this thesis has been taken entirely from any other work. The data presented are the results of my own work under the guidance of my supervisor and co-supervisor. Any other information or results mentioned are cited in the text and reference list.

Candidate

Houthail Alahmad Aljammas

شهادة

نشهد بأنَّ العمل الموصوف في هذه الأطروحة بعنوان "**إنتاج البروتياز الفطري بالطرائق الحيوية واستخدامه في صناعة الأجبان**" نتيجة بحث علمي قام به المرشح هُذيل عبد الرزاق الاحمد الجماس تحت إشراف الأستاذة الدكتورة صباح يازجي الأستاذ في قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة- جامعة دمشق، والأستاذ الدكتور عبد الحكيم عزيزية (مشرفاً مشاركاً) الأستاذ في قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة- جامعة دمشق، وأيَّة مصادر أخرى بُحِثت في هذا العمل موثَّقة في النَّصّ وفي قائمة المراجع.

المشرف الرئيس

أ. د. صباح يازجي

المشرف المشارك

أ. د. عبد الحكيم عزيزية

Certification

We hereby certify that the work described in this thesis titled "**The Production of Fungal Protease by Biomethods and Using It in the Manufacture of Cheese**" is the result of scientific research conducted by the candidate **Houthail Alahmad Aljammas** under the supervision of **Prof. Sabah Yazji**, a professor at the Department of Food Science, Faculty of Agricultural Engineering, Damascus University, and **Prof. Abdulhakim Azizieh** (Co-Supervisor), a professor at the Department of Food Science, Faculty of Agricultural Engineering, Damascus University. Any other sources mentioned in this work are cited in the text and reference list.

Main Supervisor

Prof. Sabah Yazji

Co-Supervisor

Prof. Abdulhakim Azizieh

إهداء

Dedication

أودُّ أن أهــدي شــيئاً متواضــعاً يــدلُّ علــى محبتــي وتقــديري لكــم، ولــم أجــد فيمــا أملك ماهو أغلى مِمّا اكتسبت بطول البحث، وقاسيت في الإنجاز.

أُقدِّم هذا العمل الَّذي أتممته بفضل الله، ثُمَّ بدعمكم.

إلى روح والدي ووالدتي العزيزين رحمهما الله...

إلى عائلتي، سندي وملجئي...

إلى أصدقائي...

إلى أصحاب رحلوا لكنَّهم باقون في قلبي...

إلى كلِّ من ساعدني في إتمام هذا العمل...

كلمة شكر

Acknowledgments

أتوجَّه بالشُّكر لأعضاء لجنة التحكيم المؤلَّفة من السَّادة: الأستاذ الدكتور محمد محمد، والأستاذ الدكتور عبد الوهاب مرعي، والأستاذ الدكتور أحمد هدّال، والأستاذ الدكتور صباح يازجي، والأستاذ الدكتور نزار عيسى، لتفضُّلهم في مراجعة الأطروحة والارتقاء بها نحو الأفضل.

أشكر الأستاذة الدكتورة صباح يازجي، والأستاذ الدكتور عبد الحكيم عزيزية لتفضُّلهما بالإشراف على هذه الأطروحة، وما أسدوا من الإرشاد، والدَّعم العلمي والمعنوي.

أشكر الكادر الإداري والتدريسي في كلِّيَّة الزراعة بجامعة دمشق متمثِّلاً بالسيد عميد كلية الزراعة الأستاذ الدكتور أحمد هدّال، ونائب العميد للشؤون العلمية د. عفراء سلوم.

كما أشكر الكادر الإداري والبحثي في الهيئة العامّة للتقانة الحيويّة لما قدَّموه من دعم علمي للبحث، متمثِّلاً بالسيد مدير الهيئة الأستاذ الدكتور نزار عيسى.

أشكر كلّ من ساهم في إتمام هذا البحث.

فهرس المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
المُلخَّص باللُّغة العربية	ف
1- المُقدِّمة.	1
1-1- تمهيد.	1
1-2- مسوِّغات البحث.	2
1-3- مشكلة البحث.	3
1-4- أهداف البحث.	3
2- الدراسة المرجعيّة.	4
2-1- الأنزيمات.	4
2-1-1- أنزيمات البروتياز.	6
2-1-2- التطبيقات الصناعيَّة للبروتياز.	8
2-1-2-1- استخدام البروتياز في صناعة الأجبان.	9
2-1-2-2- أنزيمات تخثُّر الحليب.	12
2-1-2-2-1- المنفحة والمُخثِّرات الحيوانيَّة.	12
2-1-2-2-2- المُخثِّرات النباتيَّة.	14
2-1-2-2-3- المُخثِّرات الميكروبية.	15
2-1-3- حركيَّة الأنزيم وثباتيّته.	20
2-2- الفطريات.	23
2-2-1- الجنس *Rhizomucor*.	25
2-2-1-1- فطر *Rhizomucor miehei*	26
2-3- التخمُّرات.	29
2-3-1- تخمُّرات الحالة الصّلبة.	30
2-3-2- تخمُّرات الحالة السَّائلة.	32
2-3-3- العوامل المؤثِّرة في التُّخمُّرات.	33
2-3-3-1- تركيب وسط التَّخمير.	33
2-3-3-1-1- ركائز التَّخمير السائل.	35
2-3-3-1-2- الركائز الصّلبة.	36

2-3-3-1-3- المحتوى الرطوبي للركازة الصّلبة.	40
2-3-3-2- الرقم الهيدروجيني (pH).	41
2-3-3-3- درجة الحرارة.	42
2-3-3-4- نظام التهوية والتحريك.	43
2-3-3-5- زمن التَّخمُّر وحركيَّة النموّ في المزارع الميكروبية.	44
2-3-3-6- نوع اللَّقاح وحجمه.	47
2-4- المعاملات اللّاحقة.	49
2-5- تحسين الإنتاج الحيوي للأنواع الميكروبية.	52
2-5-1- الطفرات.	53
2-5-2- العوامل المُطفِّرة.	55
2-5-2-1- المُطفِّرات الفيزيائيَّة.	55
2-5-2-1-1- الأشعّة فوق البنفسجيَّة.	56
2-5-2-1-2- الأمواج الميكرويَّة.	57
2-5-2-2- المُطفِّرات الكيميائيَّة.	59
2-5-2-2-1- إيثيل سلفونات الميثان.	60
3- مواد وطرائق البحث.	62
3-1- مكان تنفيذ البحث وزمانه.	62
3-2- مواد البحث.	62
3-2-1- صبغة اللاكتوفينول أزرق القطن.	63
3-2-2- ركائز التخمير الصّلبة.	63
3-2-3- أوساط الزرع.	63
3-2-4- الحليب.	64
3-2-5- المنفحة التِّجاريَّة.	64
3-4- طرائق البحث.	65
3-4-1- اعتيان التربة.	65
3-4-2- عزل الفطر وتشخيصه.	67
3-4-3- الكشف عن العزلات المُنتِجة للأفلاتوكسين.	67
3-4-4- تحضير مُعلَّق الأبواغ.	67
3-4-5- غربلة العزلات الفطرية.	68

3-4-6- استخلاص الأنزيم من وسط التخمير.	68
3-4-7- تحديد المحتوى البروتيني.	68
3-4-8- تحديد النشاط الأنزيمي.	69
3-4-9- أمثلة التخمير السائل.	71
3-4-10- أمثلة التخمير الصّلب.	74
3-4-11- معاملات التطفير.	76
3-4-12- التنقية الجزئيَّة للأنزيم.	77
3-4-13- توصيف البروتياز المُنقَّى جُزئياً.	78
3-4-13-1- تقدير الوزن الجزيئي باستخدام الرحلان الكهربائي.	78
3-4-13-2- دراسة بعض الخواص الحركيَّة للأنزيم وثباتيّته.	80
3-4-14- التطبيق العملي للأنزيم والمقارنة بالمنفحة التِّجاريَّة.	82
4- النتائج والمناقشة.	83
4-1- عزل الفطر وتشخيصه، وغربلة العزلات.	83
4-1-1- عزل الفطر وتشخيصه.	83
4-1-2- اختبار قدرة العزلات الفطرية على إنتاج البروتياز.	87
4-1-3- الكشف عن العزلات المُنتِجة للأفلاتوكسين.	88
4-1-4- اختبار الفعاليّة الأنزيمية وغربلة العزلات.	88
4-2- أمثلة التخمير السائل.	89
4-2-1- الغربلة الأوَّليّة للركائز.	89
4-2-1-1- اختيار مصدر الكربون.	89
4-2-1-2- اختيار المصدر النتروجيني.	91
4-2-2- أمثلة ظروف التخمير السائل باستخدام منهجية الاستجابة السطحية.	95
4-3- أمثلة التخمير الصّلب.	110
4-3-1- دراسة تركيب وسط التخمير الصّلب.	110
4-3-1-1- غربلة الركائز.	110
4-3-1-2- غربلة المصادر النتروجينية.	113
4-3-2- أمثلة ظروف التخمير الصّلب باستخدام منهجية الاستجابة السطحية.	115
4-4- التنقية الجزئيَّة.	127
4-5- معاملات التطفير.	129

4-5-1- التطفير باستخدام الأشعّة فوق البنفسجيَّة.	129
4-5-2- التطفير باستخدام الأمواج الميكرويَّة.	133
4-5-3- التطفير باستخدام إيثيل سلفونات الميثان.	134
4-5-4- الثَّبات الوراثي للطفرات.	137
4-5-5- التنقية الجزئية لبروتياز العزلة المُطفَّرة *R. miehei* MW150	138
4-6- توصيف البروتياز المُنتَج من العزلتين الطبيعيَّة والمُطفَّرة.	139
4-6-1- تقدير الوزن الجزيئي.	139
4-6-2- دراسة بعض الخواصّ الحركيَّة للأنزيم.	141
4-6-2-1- تأثير درجة الحرارة في فعالية البروتياز.	141
4-6-2-2- الثَّبات الحراري للبروتياز اتجاه درجة الحرارة.	142
4-6-2-3- تأثير كلوريد الكالسيوم في فعالية الأنزيم.	143
4-6-2-4- تأثير الـ pH في فعالية الأنزيم وثباتيّته.	144
4-6-2-5- تأثير كلوريد الصوديوم في فعالية الأنزيم.	145
4-6-2-6- تأثير تركيز الركيزة في فعالية البروتياز، وتحديد بعض العوامل الحركيَّة.	147
4-6-2-6-1- تأثير تركيز الكازئين.	147
4-6-2-6-2- تأثير تركيز حليب الفرز.	151
4-6-2-6-3- تأثير تركيز الحليب كامل الدَّسم.	155
4-7- التطبيق العملي للأنزيم، والمقارنة بالمنفحة التِّجاريَّة.	158
5- الاستنتاجات والمقترحات والتوصيات.	161
5-1- الاستنتاجات.	161
5-2- المقترحات والتوصيات.	162
6- المراجع.	164
المُلخَّص باللُّغة الإنكليزيَّة.	I

فهرس الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
1	المواد المستخدمة في البحث.	62
2	مواقع جمع عينات التربة المستخدمة في عزل الفطريات.	66
3	التصميم التجريبي للمتغيّرات المُستقلّة ومستوياتها المستخدمة في أمثلة التخمير السائل.	72
4	المعاملات التجريبيَّة للتصميم الإحصائي الخاصّ بالتخمير السائل.	73
5	التصميم التجريبي للمتغيرات المُستقلّة ومستوياتها المستخدمة في أمثلة التخمير الصّلب.	74
6	المعاملات التجريبيَّة للتصميم الإحصائي الخاصّ بالتخمير الصّلب.	75
7	مكوِّنات هالم الفصل وهالم الرَّصّ والأحجام المستخدمة.	79
8	قدرة العزلات الفطرية على إنتاج البروتياز اعتماداً على قطر الهالة المتشكِّلة.	87
9	المحتوى والنشاط الأنزيمي لأنزيمات البروتياز المُنتَجة بوساطة العزلات المختلفة.	89
10	تأثير مصدر الكربون في إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei*.	91
11	تأثير النتروجين في إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* بالتخمير السائل.	94
12	النتائج التجريبيَّة للتصميم الإحصائي الخاصّ بالتخمير السَّائل.	96
13	تحليل التباين لمعادلة الانحدار لنشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير السائل.	100
14	تأثير العوامل المدروسة في نشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير السائل.	101
15	تحليل التباين لمعادلة الانحدار لنسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير السائل.	102
16	تأثير المتغيِّرات المدروسة في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير السائل.	103

17	تحليل التباين لمعادلة الانحدار المُختزَلة لنشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير السائل.	104
18	تأثير المتغيِّرات في نشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ وفق المعادلة المُختزَلة لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير السائل.	105
19	تحليل التباين لمعادلة الانحدار المُختزَلة لنسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير السائل.	106
20	تأثير المتغيِّرات في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير السائل وفق المعادلة المُختزَلة.	106
21	تأثير تركيب وسط التخمير الصّلب في إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei*.	112
22	تأثير النتروجين في إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* بالتخمير الصّلب.	114
23	النتائج التجريبيَّة للتصميم الإحصائي الخاصّ بالتخمير الصّلب.	116
24	تحليل التباين لمعادلة الانحدار لنشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير الصّلب.	117
25	تأثير العوامل المدروسة في نشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير الصّلب.	118
26	تحليل التباين لمعادلة الانحدار لنسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير الصّلب.	119
27	تأثير المتغيِّرات المدروسة في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير الصّلب.	120
28	تحليل التباين لمعادلة الانحدار المُختزَلة لنشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير الصّلب.	123
29	تأثير المتغيِّرات في نشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ وفق المعادلة المُختزَلة لبروتياز *Rhizomucor miehei* المُنتَج بالتخمير الصّلب.	124
30	مراحل التنقية للبروتياز المُنتَج من *Rhizomucor miehei*.	128
31	إنتاج البروتياز بوساطة العزلات المعاملة بالأشعّة فوق البنفسجيَّة بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة.	132

32	إنتاج البروتياز بوساطة العزلات المعاملة بالأمواج الميكرويَّة بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة.	134
33	إنتاج البروتياز بوساطة العزلات المعاملة بإيثيل سلفونات الميثان بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة.	136
34	ثباتيَّة الطفرات المُغربَلة في إنتاج البروتياز.	137
35	مراحل التنقية للبروتياز المُنتج من *Rhizomucor miehei* MW150.	138
36	الفعاليّة الأنزيمية المتبقِّية (%) لبروتياز *Rhizomucor miehei* تحت تأثير المعاملة الحراريَّة.	143
37	المؤشِّرات الأنزيمية للمنفحة التِّجاريَّة ومُحضَّرات بروتياز *R. miehei*.	158
38	تأثير نسب إضافة بروتياز *R. miehei* في مردود وخواص الجبن المُصنَّع.	159
39	مقارنة المردود والخواص الحسّيَّة للجبن المُصنَّع باستخدام كلٍ من المنفحة التِّجاريَّة وبروتياز *R.miehei*.	160

فهرس الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1	رسم مجهري للفطر *R. miehei*	28
2	صورة مجهرية للفطر *R. miehei*	28
3	المنحني القياسي للألبومين.	69
4	المنحني القياسي للتيروزين.	70
5	البروتينات القياسيَّة المستخدمة (BlueElf prestained protien).	80
6	صور مجهرية (10x*40 x) توضِّح مورفولوجيا فطر *Rhizomucor miehei*	85
7	مراحل تطوّر مستعمرات *Rhizomucor miehei*.	86
8	زوال لون بيئة آجار الحليب نتيجة تحلل الكازئين بفعل إفراز البروتياز في وسط النموّ.	87
9	أمثلة إنتاج البروتياز متعدِّدة الاستجابة لتخمير الحالة السَّائلة.	109
10	أمثلة إنتاج البروتياز متعدِّدة الاستجابة لتخمير الحالة الصّلبة.	127
11	الامتصاصية الضَّوئيَّة والفعاليّة الأنزيمية لأجزاء العينة الناتجة عن ترشيح بروتياز Rm4 *Rhizomucor miehei* باستخدام عمود Sephadex-G100.	129
12	الامتصاصية الضَّوئيَّة والفعاليّة الأنزيمية لأجزاء العينة الناتجة عن ترشيح بروتياز MW150 *Rhizomucor miehei* باستخدام عمود Sephadex-G100.	139
13	الرحلان الكهربائي باستخدام SDS-PAGE لعينات البروتين الناتجة عن مراحل التنقية.	140
14	تحديد الوزن الجزيئي للبروتياز من العزلتين Rm4 وMW150 اعتماداً على المنحني القياسي للوغاريتم الأوزان الجزيئيّة للبروتينات الدَّالَّة مقابل حركتها النسبية بعد الرحلان الكهربائي على هالم SDS-PAGE.	141
15	تأثير درجة الحرارة في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei*.	142
16	تأثير كلوريد الكالسيوم في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei*.	144
17	تأثير الـ pH في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei*.	145
18	تأثير كلوريد الصوديوم في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei*.	147
19	تأثير تركيز الركازة (الكازئين) في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei* Rm4.	148

20	تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (الكازئين) وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* Rm4، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر –بيرك.	149
21	تأثير تركيز الركازة (الكازئين) في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei* MW150.	150
22	تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (الكازئين) وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* MW150، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر –بيرك.	151
23	تأثير تركيز الركازة (حليب الفرز) في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei* Rm4.	152
24	تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (حليب الفرز) وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* Rm4، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر –بيرك.	153
25	تأثير تركيز الركازة (حليب الفرز) في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei* MW150.	154
26	تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (حليب الفرز) وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* MW150، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر –بيرك.	154
27	تأثير تركيز الركازة (الحليب كامل الدَّسم) في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei* Rm4.	155
28	تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (الحليب كامل الدَّسم) وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* Rm4، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر –بيرك.	156
29	تأثير تركيز الركازة (الحليب كامل الدَّسم) في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei* MW150.	157
30	تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (الحليب كامل الدَّسم) وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* MW150، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر –بيرك.	157

قائمة الاختصارات

الاختصار	المعنى
PDA	آجار ديكستروز البطاطا
MCA	نشاط تخثُّر الحليب
PA	النشاط الحالّ للبروتين
MCA/PA	نسبة نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ للبروتين
spMCA	نشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ
SU	وحدة سوكسليت (واحدة نشاط التخثُّر)
PU	وحدة بروتياز (واحدة النشاط الحالّ للبروتين)
EMS	إيثيل سلفونات الميثان
$Rm_{1,2,3...}$	رموز عزلات الفطر *Rhizomucor miehei*
$UV_{(n1,n2)}$	رموز العزلات الفطرية المُطفَّرة باستخدام الأشعّة فوق البنفسجيَّة تبعاً للبعد عن مصدر الإشعاع (n1) ومُدَّة التشعيع (n2).
$EMS_{(n1,n2)}$	رموز العزلات الفطرية المُطفَّرة باستخدام إيثيل سلفونات الميثان تبعاً لتركيز المُطفِّر (n1) ومُدَّة المعاملة بالمُطفِّر (n2).
MW_n	رموز العزلات الفطرية المُطفَّرة باستخدام الأمواج الميكرويّة تبعاً لمُدَّة التعريض (n).
K_m	ثابت ميكاليس
V_{max}	السرعة القصوى للتفاعل الأنزيمي

المُلخَّص

جُمِعت 45 عينة من التربة المحلية، حُصِل منها على ست عزلات فطرية شُخِّصت ضمن النوع *Rhizomucor 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 التخمير. وقد تمثَّلت الظروف المثلى للإنتاج بالتخمير بالحالة السَّائلة في اختيار الجلوكوز والكازئين كمصدرين للكربون والنتروجين بالتراكيز g/L 39.09، و g/L 10.24 على التَّوالي، وضَبط الـ pH الابتدائي عند 5.99، والتحضين عند درجة حرارة ℃ 40.9، لمُدَّة 89.94 ساعة. كما تمثَّلت الظروف المُثلى للإنتاج بالتخمير بالحالة الصّلبة في اختيار نخالة القمح كركازة بمحتوى رطوبي 80% ومُدعَّمة بالكازئين بنسبة 1.33%، وضَبط الـ pH الابتدائي عند 6.31، والتحضين عند درجة حرارة ℃ 41.1، لمُدَّة 81.21 ساعة. وقد بلغت قيم نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ للبروتين للمستخلص الأنزيمي المُنتَج بالتخمير السائل تحت الظروف المثلى SU/mg 303.87، و314.30 على التَّوالي، بينما بلغت في المستخلص الأنزيمي المُنتَج بالتخمير الصّلب SU/mg 441.90، 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 sec 150 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 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.

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، وبمردود 4.9%. كما ازدادت الفعاليّة النَّوعيّة لأنزيم العزلة MW150 بمقدار 5.19 أضعاف، وبمردود 4.01%. وباستخدام تقنية الرحلان الكهربائي (SDS-PAGE) قُدِّرَ الوزن الجزيئي للبروتياز المُنقَّى المُنتَج من كلٍ من العزلتين Rm4 و MW150 بحوالي kDa 39.77 ، و kDa 40.62، على التَّوالي.

تقاربت الخواصّ الحركيَّة لكلٍ من الأنزيم الطبيعي والمُطفَّر المُنقَّيين، إذ تحقَّقَ أقصى نشاط لتخثُّر الحليب عند درجة حرارة ℃ 57.5، و5 pH، وتركيز g/L 9 من كلوريد الكالسيوم. كما تحقَّقَت أعلى قيم للنشاط الحالّ للبروتين عند درجة حرارة ℃ 57.5، و 4 pH. وكانت الأنزيمات مستقرَّة في المجال الحراري °C 50–40 لمُدَّة hrs 48، كما استقرَّت نسبياً عند الدَّرجات °C 60 و°C 70 لمُدَّة min 105 و min 10 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 mg/mL 19.46، و mg/min 0.0026 على التَّوالي بناءً على حساب النشاط التحلُّلي، كما بلغت قيم K_m وV_{max} في بروتياز العزلة المُطفَّرة mg/mL 26.29، و mg/min 0.0021 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 g/mL 0.201، و g/sec 0.0030 على التَّوالي لبروتياز العزلة Rm4، و g/mL 0.152، و 0.0034 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} وK_m اتجاه الحليب كامل الدَّسم مُعاد التَّكوين g/mL 0.0080، و g/sec 0.001 على التَّوالي لبروتياز العزلة Rm4، بينما بلغت g/mL 0.207 و g/sec 0.048 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، الَّتي بلغت SU/mL 6000. وقد أظهر الجبن المُنتَج باستخدام المُخثِّر الفطري تقارباً كبيراً مع الجبن المُنتَج باستخدام المنفحة التِّجاريَّة، من حيث المردود الناتج، والخواصّ الحسِّيَّة.

الكلمات المفتاحية: أجبان، بروتياز، تطفير، تنقية، حركيَّة، طرائق حيويّة، فعالية أنزيمية، *Rhizomucor miehei*.

1- المُقدِّمة Introduction:

1-1- تمهيد Preamble:

يُعدّ البروتياز أحد أهم الأنزيمات الصناعيَّة ويُشكِّل حوالي 60% من إجمالي المبيع العالمي للأنزيمات نظراً لتطبيقاته الواسعة في صناعة المُنظِّفات، والجلديات، والصناعات الدوائية، بالإضافة إلى الصناعات الغذائيَّة كصناعات الألبان والخبز وتطرية اللحوم. وتُمثِّل صناعة الأجبان التطبيق الرئيس للبروتياز في صناعات الألبان. وتتمثَّل الوظيفة الأساسيَّة للبروتياز في صناعة الأجبان في البدء بعملية تخثُّر الحليب، من خلال الحلمهة السريعة وعالية التخصُّص للبروتينات الرئيسة في الحليب (الكازئين).

تُعدّ منفحة العجول الشكل الأكثر استخداماً لأنزيمات تخثُّر الحليب، ويتمّ استخلاصها من المعدة الرابعة للعجول الرضيعة. ويُشكِّل الكيموزين المُكوِّن الأساسي للمنفحة، ويظهر تأثيره في عملية تخثُّر الحليب من خلال مرحلتين، في المرحلة الأولى أو الأنزيمية يقوم الكيموزين بحلمهة كازئين كابا، وهو يُشكِّل طبقة حامية لمُذيَّلة الكازئين. ويفصل الرابطة 105 فينيل آلانين–106 ميثونين في سلسلة كازئين كابا، ما يؤدِّي إلى انفصالها، وبالتالي زوال التأثير الحامي، ويسمح بحدوث المرحلة الثانية أو مرحلة التخثُّر لتتجمّع الكازئينات غير المستقرَّة وتُشكِّل الخثرة.

أدَّى الإنتاج العالمي المتزايد للأجبان بالارتباط مع نقص إنتاج المنفحة نتيجة عدم الرغبة في ذبح العجول قبل الفطام إلى ارتفاع سعر المنفحة التقليدية، ما حفَّز البحث عن أنزيمات لتخثُّر الحليب من مصادر بديلة. يُبدي العديد من الأنزيمات القدرة على تخثير الحليب إلا أنَّها لا تصلح في معظمها كبدائل بسبب الفعاليّة المرتفعة لتحلُّل البروتين. وقد تمَّ البحث في إمكانيّة استخدام العديد من المصادر الحيوانيَّة والنباتيَّة كبدائل للمنفحة، الَّتي أثبتت في معظمها عدم مناسبتها لصناعة الأجبان، بالإضافة إلى المصادر الميكروبية، الَّتي لاقت قبولاً واسعاً.

يُبدي البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* فعالية مرتفعة لتخثُّر الحليب ونشاط حالّ للبروتين منخفض نسبيّاً، وتخصُّص دقيق في فصل الروابط الببتيدية المماثلة في كازئين كابا (Phe105-Meth106)، الَّتي يقوم أنزيم المنفحة بتفكيكها، كما يُبدي فعالية مُثلى واستقرار عند قيم

الـ pH ودرجات الحرارة المستخدمة في معاملات تصنيع الأجبان، واحتياجات كالسيوم مماثلة. بالإضافة إلى الجودة العالية للجبن المُنتَج، والاحتمال الضئيل لظهور المذاق المُرّ.

تُنتَج الأنزيمات الصناعيَّة بشكل تقليدي بالتخمير بالحالة السَّائلة، الَّذي يتيح سهولة التعامل مع الظروف البيئيّة، ويمتاز بخلو المُنتَج من المُلّوثات وسهولة تنقيته. بالمقابل يمتاز التخمير بالحالة الصّلبة بانخفاض التكلفة وعدم الحاجة للتقنيات المتطوِّرة، ومناسبته بشكلٍ خاصّ لنموّ الفطريات.

تُنتِج بعض الأحياء الدقيقة مواداً ذات أهمِّيَّة كبيرة كالأنزيمات، لكن غالباً ما تكون بكمِّيَّات قليلة لا تُلائم الإنتاج التِّجاري. ويؤدِّي الاختيار السليم لظروف الإنتاج لأي عملية تصنيع حيوي إلى إنتاج مواد ذات مواصفات جيدة وبعائد مرتفع نوعاً ما، لكن من دون الوصول إلى الإنتاج الفائق. ويُشكِّل التطفير مصدراً للتغيرات الوراثية الَّتي قد تنعكس على القدرة الإنتاجية للأنواع الميكروبية.

يتأثَّر مُعدَّل حدوث التفاعل المُحَفَّز أنزيمياً بالعديد من العوامل كزمن التفاعل، والتركيز الأوَّلي للأنزيم والركازة، وقيم الـ pH، ودرجة حرارة التفاعل، والتنشيط بفعل العوامل المُتَمِّمة، ووجود العوامل المُثبِّطة. وتُوَفِّر دراسة حركيَّة الأنزيم المعلومات الخاصّة بمُعدَّل تنشيط وتثبيط الأنزيمات ومُعدَّل حدوث التفاعل الأنزيمي.

1-2- مسوّغات البحث The Rationale of the Study:

تزداد الحاجة للبحث عن بدائل للمنفحة لتغطية احتياجات صناعة الأجبان المتزايدة، ويَبرُز دور بروتياز فطر *Rhizomucor miehei* كبديل مناسب لتميُّزه بخواصّ مماثلة للمنفحة. ويتطلَّب تحقيق الجدوى الاقتصادية للإنتاج الحيوي للبروتياز أمثلة ظروف التخمير، واختبار تطبيق معاملات جديدة في برامج التحسين الوراثي لزيادة العائد والنشاط الأنزيمي. وتأتي أهمِّيَّة هذا البحث في توفير البديل الطبيعي للمنفحة التقليدية مُكلفة الإنتاج، وانتخاب العزلات الفطرية ذات الإنتاج المرتفع للبروتياز. كما أنَّ أمثلة ظروف الإنتاج تُوفِّر الأساس النظري للإنتاج المعملي، ما قد يفتح المجال للتوسُّع في عملية الإنتاج وإدخال هذه الصناعة في المستقبل القريب. وتظهر أهمِّيَّة دراسة حركيَّة الأنزيم في صناعة الأجبان من خلال اختيار نوع المُختِّر المناسب، والتحكُّم بنشاطه خلال مراحل التصنيع المختلفة.

1-3- مشكلة البحث The Research Problem:

1- عدم وجود دراسات محلِّيَّة حول إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* ، وعدم توفُّر عزلات محلِّيَّة من الفطر نفسه.

2- لم تتضمَّن الدراسة الإحصائية للأبحاث السابقة حول أمثلة إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei*، الجمع ما بين نهج تغيير معامل بعد الآخر، ومنهجية الاستجابة السطحية. كما لم يسبق استخدام تقنية الأمثلة متعدِّدة الاستجابة في هذا المجال.

3- لم يسبِق استخدام الأمواج الميكرويّة وإيثيل سلفونات الميثان في برامج التطفير المورثي لتحسين إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei*.

4- لم تُحدِّد أيّ دراسة سابقة الثوابت الحركية للبروتياز اتجاه الحليب كامل الدسم، والحليب الفرز، بناءً على حساب نشاط تخثُّر الحليب (بناءً على تركيز الركازة المتفاعلة).

5- تبايُن نتائج الدراسات السابقة حول التركيز الأمثل لكلوريد الكالسيوم المقابل لأعلى فعالية للتخثُّر لبروتياز *Rhizomucor miehei*.

6- تبايُن نتائج الدراسات السابقة حول تأثير كلوريد الصوديوم في نشاط البروتياز.

1-4- أهداف البحث Research Objectives:

1- عزل فطر *Rhizomucor miehei* وتشخيصه، وغربلة العزلات المُنتِجة للبروتياز.

2- دراسة الظروف المثلى لإنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* بالتخمير الصّلب والسّائل، وتحديد التخمير الأنسب لعملية الإنتاج.

3- دراسة تأثير المُطفِّرات الفيزيائيَّة والكيميائيَّة في إنتاج الفطر *Rhizomucor miehei* للبروتياز، وانتخاب الطفرات ذات الإنتاج المرتفع.

4- تنقية البروتياز المُنتَج من العزلات الطبيعيَّة والمُطفَّرة، وتوصيفه.

5- استخدام البروتياز المُنقَّى في صناعة الجبن الأبيض، بالمقارنة مع المنفحة التِّجاريَّة.

2- الدراسة المرجعية Literature review:

2-1- الأنزيمات:

تقوم الأنزيمات بدور الوسيط أو المُحفِّز لمعظم التفاعلات الكيميائيَّة الحيويَّة الَّتي تحدث في الأنظمة الحية، وتُمَثِّل أنظمة العمليات الكيميائيَّة الحيويَّة في الخلايا. إذ تشارك الأنزيمات في عمليات الإصلاح والتضاعف والتعبير عن المعلومات الواردة في الحمض النَّوويّ للخلية (Bugg, 2012, 2)، وتُشكِّل عنصراً أساسياً في نقل الإشارة وتنظيم الخلية (Hunter, 1995, 225–236)، وتوليد الحركة وتقلُّص العضلات (Berg, 2001, 780,797)، كما تلعب دوراً هاماً في عملية الهضم كحلمهة البروتينات والبولي سكاريدات (Williams, 2004, 49)، ويمكن لعدَّة أنزيمات العمل معاً وفق ترتيب معيَّن، ما يؤدِّي إلى إنشاء مسارات استقلابية تُحدِّد الأنزيمات الخطوات الَّتي تحدث ضمنها، ولا يمكن لهذه المسارات أن تتقدّم من دون الأنزيمات من خلال نفس الخطوات وبسرعة كافية لتلبية احتياجات الخلية (Van Oort, 2010, 4).

وتتكوَّن الأنزيمات من اتحاد مئة إلى عدّة آلاف من الحموض الأمينية ضمن سلسلة ببتيدية واحدة أو أكثر لتُشكِّل ما يُعرَف بالبنية الأوّليّة للأنزيم، وتنتج البنية الثانويّة ثلاثيّة الأبعاد من ارتباط المجموعات الأميدية المتقاربة للحموض الأمينية بروابط هيدروجينية، وتُحدَّد البنية الثالثيّة ثلاثيّة الأبعاد بارتباط بقايا الحموض الأمينية المتباعدة ضمن البنية الأوليّة، بينما تنتج البنية الرابعيّة لبعض الأنزيمات من ارتباط اثنين أو أكثر من تحت الوحدات الأنزيمية، لتنتظم الأنزيمات وفق بنية مضغوطة كُرويّة يتراوح حجمها الجزيئي من 5 kDa إلى 5000 kDa، إذ يفوق معظم الأنزيمات في الحجم الركائز الَّتي تعمل عليها، وبالتالي يشارك جزء صغير فقط من البنية الثالثيّة للأنزيم بشكل مباشر في النشاط التحفيزي يدعى بالمركز الفعّال، وغالباً ما يُشكِّل 10–20% من الحجم الإجمالي للأنزيم (Bugg, 2012, 8,19; Jain, 2004, 350; Illanes, 2008, 4-5).

وتمتاز الأنزيمات عن العوامل المساعدة الأخرى بالدرجة العالية من التَّخصُّص اتجاه المادة المتفاعلة ونوع التفاعل. إذ يختصّ كل أنزيم بركازة واحدة، وقد يختصّ الأنزيم بنوع مُعيَّن من الروابط الكيميائيَّة أو بمجموعة وظيفية مُعيَّنة. ويعمل الأنزيم عن طريق تخفيض الطاقة اللازمة

لحدوث أو استمرار التفاعل وفق عدّة آليات تشمل تخفيض طاقة التنشيط عن طريق الارتباط وبالتالي تثبيت الحالة الانتقالية لجزيئات الركازة/المُنتَج، أو عن طريق خفض طاقة الحالة الانتقالية بعكس انتشار الشحنات اتجاه الحالة الانتقاليّة، توفير مسار بديل كالتفاعل المؤقَّت مع الركازة وتشكيل مركب مؤقَّت (أنزيم/ركازة)، وتقليل العشوائية عن طريق الجمع بين المواد المتفاعلة. وكما هو الحال مع جميع المُحفِّزات، لا تُستَهلك الأنزيمات في التفاعلات الَّتي تحفِّزها، كما أنها لا تُغيِّر من توازن هذه التفاعلات (Van Oort, 2010, 1,4-6).

تُسمّى الأنزيمات عادةً تبعاً لنوع الركازة، أو لنوع التفاعل الَّذي تحفِّزُه، أو لكليهما متبوعاً باللاحقة "*ase*"، فيما عدا بعض التسميات القديمة كالببسين، والتربسين (Jain, 2004, 338).

ويُسمّى الأنزيم وفق توصيات لجنة الاتحاد الدولي للكيمياء الحيويَّة والبيولوجيا الجزيئية (IUBMB) لتسمية الأنزيمات عام 1961 تبعاً لكلٍ من الركازة المستهدَفة ونوع التفاعل المُحفَّز. وتُقسم الأنزيمات وفق هذا التصنيف إلى ست مجموعات تشمل: أنزيمات الأكسدة والإرجاع (EC 1 Oxidoreductases) الَّتي تُحفِّز التفاعلات المتضمِّنة لنقل الألكترونات أو ذرات الأكسجين أو الهيدروجين، أنزيمات النقل (EC 2 transferases) وتختصّ بنقل المجموعات الوظيفية من مركب إلى آخر، أنزيمات التحلُّل المائي (EC 3 Hydrolases) وتُحفِّز تفكُّك الروابط ضمن الركائز بوجود الماء، أنزيمات الحذف (EC 4 Lyases)، الَّتي تعمل على إزالة الروابط المختلفة دون الحلمهة أو الأكسدة، أنزيمات التماكب (EC 5 Isomerases)، الَّتي تُحفِّز التماكب عبر تغيير توزيع أو بنية الجزيء، أنزيمات الربط (EC 6 Ligases) وتعمل على ربط جزيئين مختلفين عبر الروابط التساهمية (Cornish-Bowden, 2014, 82-83; Illanes, 2008, 16-18). كما أُضيفت مؤخَّراً المجموعة الناقلة للأيونات والجزيئات عبر الأغشية، أو فصلها داخل الأغشية (EC 7 Translocases) (Tipton, 2018, para. 1, 2). ويُعطى الأنزيم وفق هذه التسمية أربعة أرقام يدلّ الأوَّل على المجموعة الرئيسة (Class) الَّتي يتبع لها الأنزيم، ويدلّ الثاني على تحت المجموعة (Sub-Class)، ويدلّ الثالث على تحت–تحت المجموعة (Sub-Sub-Class)، ويُشير الرقم الأخير إلى متسلسل اسم الأنزيم، كما يدلّ الحرفان (EC; Enzyme commission) على اعتماد الرقم وفقاً لنظام التسمية (Cornish-Bowden, 2014, 82-84).

استُخدِمت الأنزيمات منذ آلاف السنين في العديد من التطبيقات الغذائيَّة التقليدية كصناعة الخبز والأجبان واللبن الرّائب والكيفر والخل والمشروبات المُخمَّرة بالإضافة للورق والنسيج. وقد تمَّ الحصول على هذه المُنتَجات بمساعدة مواد بادئة تحتوي على الأنزيمات منذ حوالي 6000 عام قبل الميلاد في الحضارات المصرية والسومرية والصينية (Schäfer, 2007, 3). وتُشتَق الأنزيمات من مصادر طبيعيّة كالأنسجة النباتيَّة والحيوانيَّة، وتعتمد معظم عمليات الإنتاج الصناعي على المصادر الميكروبية. ويمكن أن يُعزى النجاح الصِّناعي للأنزيمات إلى الخصائص المُميَّزة بالمقارنة مع المواد الكيميائيَّة فالجمع بين الوظيفة التحفيزية والنَّوعيّة والقدرة على العمل تحت ظروف معتدلة يجعل الأنزيمات المُحفِّز المفضَّل في عددٍ كبيرٍ من التطبيقات (Van Oort, 2010, 11).

ويزداد الطلب على الأنزيمات سنوياً وقد بلغت قيمة سوق المبيعات العالمية للأنزيمات في عام 2019 حوالي 8636.8 مليون دولار، ومن المتوقَّع أن تصل إلى 14507.6 مليون دولار في عام 2027 بمُعدَّل نموّ سنوي يبلغ 6.5% من عام 2020 إلى عام 2027 (Manjrekar *et al*., 2021, para. 1). وتستخدم التطبيقات الصناعيَّة الرئيسية حوالي 80% من الأنزيمات المُنتَجة صناعياً بنسبة 30% لصناعة المُنظِّفات، و12% لصناعة النسيج، و12% لصناعة النشاء، و11% لصناعة الخَبز، و9% للوقود الحيوي، و8% للعلف الحيواني (Van Oort, 2010, 12). ويَنتُج عن تطبيق الأنزيمات في عمليات التصنيع انخفاض كبير في التكاليف نتيجةً للاستهلاك المحدود للطاقة، وتوفير المياه، والاستخدام الأمثل للمواد الخام، وكثيراً ما تحل عوضاً عن المواد الكيميائيَّة السَّامَّة. ويُمثِّل إنتاج الأنزيمات خير مثال على ما يُعرَف بالتكنولوجيا الحيويَّة البيضاء ذات التأثيرات المؤاتية في كلٍ من البيئة والاقتصاد (Berka and Cherry, 2006, 477f).

2-1-1- أنزيمات البروتياز:

أنزيمات البروتياز (Proteases) هي أنزيمات تحلُّلية تعمل على تحفيز حلمهة الروابط الببتيدية في جزيء البروتين، إذ يعمل الأنزيم المُحلِّل للبروتين (Proteolytic enzyme) على إطلاق حمض أميني أو ببتيد من الببتيد الأكبر أو البروتين (Rawlings *et al*., 2011).

تحتاج معظم الأحياء للأنزيمات المُحلِّلَة للبروتين (البروتيوليتية) لأداء وظائفها الخلويَّة، وبالرّغم من أنَّ بعض الفيروسات لا تُرَمِّز هذه الأنزيمات في مجموعها الجيني، إلا أنَّها تستخدم أنزيمات عوائلها لأداء المعاملات الخاصّة بها. ويقاوم عدد قليل جداً من البروتينات عملية التحلُّل البروتيني. ويرتبط التحلُّل الزائد للبروتين بالعديد من الحالات المرضية كبعض حالات الورم والتهاب المفاصل وضمور العضلات ومرض الزهايمر (Rawlings, 2013, 1f; Mantle and Preedy, 2002, 33).

وتُعدّ عملية التحلُّل البروتيني ضرورية لإتمام العديد من العمليات الحيويَّة، كالانقسام الخلوي، وإزالة ميثونين البدء من البروتينات الستوبلازمية حديثة التخليق، وإزالة ببتيدات الإشارة من البروتينات المستهدفة لمسار الإفراز الخلوي، وإزالة إشارات الاستهداف من البروتينات الَّتي تستهدف عُضيّات مُعيَّنة كالميتوكوندريا أو الكلوروبلاست، وإزالة الطليعة الببتيدية من الأنزيمات والهرمونات والمستقبلات الَّتي يتمّ توليفها كسلائف ليتمّ تنشيطها، وتحرير البروتينات الفردية والببتيدات من البولي بروتينات، وتحرير الببتيدات النشطة بيولوجياً من سلائف البروتين، وإطلاق البروتين من سطح الخلية، وإيقاف الإشارات الَّتي تبدأها الببتيدات والبروتينات بتفكيكها أو تفكيك البروتينات المرتبطة، وهدم البروتينات المُمرضة أو السّامّة المُفرَزة من الطفيليات أو العوامل المُمرضة، وغزو العائل وتعطيل بروتيناته المضادّة، والحصول على الحموض الأمينية من بروتينات الغذاء، وإعادة استخدام البروتينات من قبل نفس الكائن بعد الترجمة، وتنظيم تخثُّر الدَّم (Rawlings, 2013, 1, Mótyán *et al*., 2013, 925; Mantle and Preedy, 2002, 33).

وتَتبع أنزيمات البروتياز للمجموعة الأنزيمية الثالثة المُحلمِهة (EC 3 Hydrolases) وإلى تحت المجموعة الرابعة المحلمهة للروابط الببتيدية تحت اسم الببتيديزات (EC 3.4 peptidases) (Webb, 1992, 371)، ولا تخضع أنزيمات البروتياز بسهولة لنظام تصنيف الأنزيمات نظراً للتنوع الواسع في البُنية والعمل، وتُصنَّف أنزيمات البروتياز بناءً على ثلاثة معايير: نوع التفاعل المُحفَّز، والطبيعة الكيميائيَّة للموقع الحفّاز، والبنية وتطور المنشأ (Barrett, 1994, 1).

وتُقسَم الببتيديزات اعتماداً على طبيعة التَّخصُّص إلى مجموعتين رئيستين تشمل الببتيديزات الداخلية (Endopeptidases)، والببتيديزات الخارجية (Exopeptidases). تعمل الإكسوببتيداز على فصل الروابط الطرفية للبروتين، بينما تعمل الإندوببتيداز على فصل الروابط الببتيدية الداخلية

في الركازة وتُعرَف بأنزيمات البروتيناز (Proteinases). وتُقسَم الإكسوببتيداز وفقاً لنوع الرابطة الطرفية الَّتي تقوم بفصلها، إذ تفصل aminopeptidases الروابط الطرفية للآزوت، بينما تفصل carboxypeptidases الروابط الطرفية للكربون (Barrett *et al*., 2004, 1).

وغالباً ما يُوصف التحلُّل المائي بوساطة الببتيديزات بأنَّه تفاعل حمض_أساس، وفي بعض الببتيديزات يؤدِّي الهجوم المحب للنواة (nucleophilic attack) على الرابطة الببتيدية للركازة إلى تشكيل مركب مؤقَّت يسمى "أسيل الوسيط" سرعان ما يتفكَّك ليعطي بروتون إلى البَقيَّة (residue) في الببتيداز، الَّتي تُعرَف بالقاعدة الأساسيَّة، ما يسمح لجُزيء الماء بتحليل الرابطة الببتيدية (Rawlings, 2013, 5). وتختلف طبيعة الهجوم النيوكليوفيلي بحسب النمط التَّحفيزي للببتيديزات، فقد يكون الجزء النيوكليوفيلي هو السلسلة الجانبية لحمض أميني (نيوكليوفيلات بروتينية)، أو قد يكون النيوكليوفيل هو جزيئة ماء نشطة (نيوكليوفيلات مائية) (Rawlings, 2013, 6).

ويمكن أن يكون النيوكليوفيل البروتيني هو زمرة هيدروكسيل للسيرين أو الثريونين، أو زمرة الثيول للسيستئين، وتُعرف هذه الأنماط التحفيزية بنمط السيرين، أو الثريونين، أو السيستيئين. ويمكن أن يُنَشَّط النيوكليوفيل المائي بفعل السلسلة الجانبية للحموض الأمينية كالأسبرتات أو الجلوتامات، أو بفعل الأيونات المعدنية المرتبطة بالسلاسل الجانبية للحموض الأمينية. وتُعرَف هذه الأنماط بأسباراتيل– ببتيداز، جلوتاميل– ببتيداز، وميتاللو ببتيداز. بالإضافة إلى فئة سابعة للنمط التحفيزي غير المعروف. ويمكن للأنزيمات البروتيوليتية الَّتي لا تَتبع للببتيديزات أن تستخدم حمض الأسباراجين كنيوكليوفيل (Rawlings *et al*., 2011, 38321).

وعادةً تكون قيم الـ pH المثلى لأنزيمات الثريونين ببتيداز والببتيداز الفلزي محايدة، بينما يكون الـ pH المثالي لأنزيمات اسباراتيك الببتيداز، وببتيداز حمض الجلوتاميك، وسيستئين الببتيداز بقيم حامضية، وتكون قيم الـ pH المثلى لأنزيمات سيرين الببتيداز قاعدية إلى محايدة (Rawlings, 2013, 6).

2-1-2- التطبيقات الصناعيَّة للبروتياز:

يُعدّ البروتياز (الببتيداز) من أهم الأنزيمات الصناعيَّة ويُشكِّل حوالي 60% من إجمالي المبيعات العالمية للأنزيمات بالمقارنة مع نسب مبيعات تقارب 18% للأميلاز، و10% للأنزيمات الأخرى

المُحلِّلة للكربوهيدرات، و3% لليباز، و10% للأنزيمات الدوائية والمخبرية. ويُعدّ البروتياز أحد المكوِّنات القياسيَّة لجميع أنواع المُنظِّفات بدءاً من المُنظِّفات المنزلية إلى المواد المستخدمة لتنظيف العدسات اللاصقة والأسنان الصناعيَّة. كما يُستخدم البروتياز القاعدي في معالجة الجلود وتحسين جودتها كإزالة الشعر والصوف والتحليل الانتقائي للبروتينات غير الليفية كالألبومين والجلوبيولين (Rao *et al*., 1998, 598f, 606). كما يُستخدم البروتياز بنجاح في العديد من الحالات العلاجية، إذ يُستخدم بروتياز *Aspergillus oryzae* كعامل هضمي مساعد في علاج أعراض نقص الأنزيمات المُحلِّلة (Yang *et al*., 2017, 60-66)، كما يستخدم الكولاجيناز من *Clostridium* في علاج الحروق والجروح (Pham *et al*., 2019, 9-15)، ويُستخدم الأسبارجيناز من *E. coli* للتخلُّص من الأسباراجين والجلوتامين في مجرى الدَّم لمقاومة خلايا سرطان الدَّم غير القادرة على تصنيع هذه الحموض (Maggi *et al*., 2017, 1-16). وتُستخدم ميزة الفصل الانتقائي للبروتياز للروابط الببتيدية في المجالات البحثية كاصطناع الببتيدات والأجسام المضادة، وتحديد تسلسل الحموض الأمينية في البروتينات (Mótyán *et al*., 2013, 923-942).

وتُعدّ الصناعات الغذائيَّة أهم التطبيقات لأنزيمات البروتياز إلى جانب صناعة المُنظِّفات، إذ يُستخدم البروتياز في صناعة الخبز لتحسين خواص الشبكة الجلوتينية ومدودية العجين، ما يؤدِّي إلى سهولة المعاملة بالآلات، وتخفيض وقت المزج، وزيادة حجم الرغيف. كما يُستخدم في معاملة منتجات وتكييف بروتينات فول الصويا، ما يسمح بتحسين الخواصّ الوظيفية للبروتين، وتخفيض المرارة، وإعطاء منتجات مُحلمَهة بدرجة عالية من الذَّوبان لتُستخدم في المشروبات المُدعَّمة بالبروتين. كما يُستخدم البروتياز أيضاً في تطرية اللحوم، وفي معاملات اصطناع الأسبرتام (Rao *et al*., 1998, 607).

2-1-2-1- استخدام البروتياز في صناعة الأجبان:

يزداد الإنتاج العالمي للأجبان سنوياً، إذ بلغ مُعدَّل نموّ الإنتاج خلال السنوات الأخيرة حوالي 1.78% سنوياً، وبلغ الإنتاج العالمي للأجبان عام 2021 حوالي 22.08 مليون طن (Shahbandeh, 2022, para. 1)، ووصل إجمالي المبيع العالمي للأجبان حوالي 123.87 مليار دولار، ومن المتوقَّع وصول قيمة التداول إلى 161.23 مليار دولار في عام 2028 (Fortune Business Insight, 2022, para. 1). إذ تُشكِّل الأجبان عنصراً أساسياً في النظام الغذائي

للإنسان، وتَبرُز الأهمِّيَّة الغذائيَّة للأجبان من خلال محتواها العالي من البروتينات، والحموض الأمينية، والدهون، والحموض الدهنية، والكالسيوم، والعناصر المعدنية الأخرى كالفسفور، والزنك، والمغنيزيوم، والحديد، والفيتامينات A، وD، وB2، وB12 (United State Department of Agriculture National (USDA), 2019a; Walther *et al*., 2010, 38).

ويُمكن تعريف صناعة الأجبان بأنَّها إزالة الرطوبة من الخثرة المُحتصل عليها أنزيمياً أو بالتعادل الكهربائي، ما يضمن تركيز مكوِّنات الحليب وإطالة فترة الحفظ، إذ يزداد المحتوى من الدهون والكازئين 6–12 ضعفاً، وتتأثَّر عملية التركيز هذه بالعديد من العوامل كالـ pH، والحرارة، والزمن (El Soda, 1997, 219). وبالرّغم من استهلاك بعض أصناف الجبن طازجة يمكن تمييز مرحلتين رئيستين لإنتاج الجبن وهي التصنيع والإنضاج. وتتمثَّل الخطوات الأساسيَّة الشائعة للتصنيع في معظم أصناف الجبن في التحميض، فالتخثُّر، ثُمَّ فصل المصل عن الخثرة عن طريق التقطيع أو الطبخ أو التقليب أو الضغط أو التمليح، ومن ثُمَّ التشكيل (القولبة والضغط)، فالتمليح (Fox, 1993, 8f). ويكتسب الجبن الناتج القوام والنكهة المُميَّزة خلال مرحلة الإنضاج نتيجةً لسلسلة مُعقَّدة من التفاعلات الكيمياحيوية، إذ يتحلَّل البروتين بفعل البلازمين وبروتيناز الحليب، والمُخثِّر المتبقّي، وأنظمة البروتياز للبادئات والميكروفلورا غير البادئة. كما يتحلَّل الدهن بشكل رئيس بفعل أنزيمات الليباز والأستيراز للأحياء الدقيقة البادئة وغير البادئة، بالإضافة إلى الأثر المحدود لليباز الحليب. ويتحلَّل السترات واللاكتوز بشكل رئيس بفعل أنزيمات المزارع البادئة ومكيروفلورا الجبن (El Soda, 1997, 219). وتتأثَّر خواصّ الجبن بالعديد من العوامل كتركيب ومنشأ الحليب، ونوع المُخثِّر، والمزارع البادئة، والمواد المضافة، ومعاملة الحليب والخثرة الناتجة وإنضاجها (Green and Grandison, 1993, 118-133). وينتُج عن اختلاف هذه العوامل مدى واسع من منتجات الأجبان، تُقدَّر بحوالي 2000 صنف ذات صفات مختلفة من حيث التركيب والقوام والنكهة (Zheng *et al*., 2021, 2).

تُعدّ صناعة الأجبان التطبيق الرئيس للبروتياز في صناعات الألبان (Rao *et al*., 1998, 607)، وتتمثَّل الوظيفة الأساسيَّة للبروتياز في البدء بعملية تخثُّر الحليب، من خلال الفصل السريع وعالي التَّخصُّص للبروتينات الرئيسة في الحليب (الكازئين) (Visser, 1993, 330). حيث يُشكِّل الكازئين حوالي 80% من البروتينات في حليب الأبقار، وفق أربعة أنواع رئيسة (αs1, αs2, β,

(κ. وتُشكِّل جزيئات الكازئين المختلفة (94%) وفوسفات الكالسيوم الغروية (6%) معقداً غروياً أو ما يُسمَّى بالمُذيَّلة (Micelle) (Fox and McSweeney, 1997, 3)، تتوزَّع فيه الكازئينات بشكل غير متساوي ويتوضَّع كازئين كابا بشكل رئيس في محيط مُذيَّلات الكازئينات ويعمل على استقرارها في الحليب بالحالة الغروية. ويعود الأثر الغروي لكازئين كابا إلى التنافر الناتج عن الجزء المحب للماء والمشحون سلبياً (الجليكوماكروببتيد أو بشكل أكثر دقة Caseinomacropeptide (CMP)) (Visser, 1993, 330).

تُشكِّل عملية تخثُّر الحليب الخطوة الأساسيَّة الأولى في صناعات الأجبان التقليدية، وتتم عن طريق التفاعل الحمضي أو الأنزيمي أو بجمع كلٍ من الطريقتين (Eugster, 2017, 586). وتحدث عملية التخثُّر الأنزيمي خلال مرحلتين، يقوم أنزيم تخثُّر الحليب في المرحلة الأولى (الأنزيمية) بفصم سلسلة كازئين كابا (K-Casein) المتوضِّعة في محيط جسيمات الميسل بشكلها السليم، ويختصّ الكيموزين بفصل الروابط 105 فينيل آلانين– 106 ميثونين في كازئين كابا (Visser, 1993, 330)، وتبدأ أنزيمات تخثُّر الحليب الأخرى عملية التخثُّر بفصل كازئين كابا عند هذه الرابطة أو بالقرب منها (Fox and McSweeney, 1997, 4). وينفصل كازئين كابا إلى البارا كابا كازئين (Para-K-Casein; 1-105) الَّذي يبقى ضمن الخثرة، والكازئينوماكروببتيد (106-169) الَّذي يُفقَد في المصل وينتُج عن إزالة هذا الجزء حالة عدم استقرار للميسيل وزوال التأثير الغروي (Visser, 1993, 330). وبعد حلمهة حوالي 85% من كازئين كابا تبدأ الكازئينات بالتجمُّع خلال المرحلة الثانية (مرحلة التخثُّر) عند درجة حرارة مناسبة ودرجة pH مثالية، إذ تتشكَّل روابط هيدروفوبيكية ما بين الباراكازئين والكازئينات الأخرى الحسَّاسة للكالسيوم، وترتبط لاحقاً بأيونات الكالسيوم الذائبة لتُشكِّل شبكة ثلاثيّة الأبعاد، ويُحبَس الماء داخل هذه الشبكة (Visser, 1993, 330; Fox and McSweeney, 1997, 13; Spreer, 1995/2017, 259). ويلي عملية التَّجبُّن عملية انكماش للخثرة وطرد الشرش من الخثرة (Syneresis) (Eugster, 2017, 586; Spreer, 1995/2017, 263).

يجب أن يقوم الأنزيم المُخثِّر من الناحية المثالية بفصل الرابطة Phe105-Met106 في كازئين كابا خلال عملية تخثُّر الحليب، وبفصل لاحق للكازئينات حصراً بعد الفصل التام للمصل. وبهذه الحالة يمكن استرداد الكازئين للحدّ الأقصى وزيادة مردود الأجبان. أمّا المستوى المرتفع لتحلُّل

البروتينات غير المُحدَّد (النشاط البروتيوليتي)، فيمكن أن يؤدِّي إلى تكوين خثرة ذات بنية ضعيفة وفقد كبير للبروتينات والدهن في المصل وانخفاض مردود الجبن. يُبدي الكيموزين نشاط بروتيوليتي منخفض ويظهر تأثيره بشكلٍ خاصّ في كازئين كابا خلال مرحلة التخثُّر، بينما يظهر نشاط بروتيوليتي عام مرتفع في المُخثِّرات الأخرى في كلٍ من كازئين كابا، وبارا كابا كازئين. وتختلف الأنزيمات بنسبة نشاط تخثُّر الحليب (Milk-Clotting Activity) إلى النشاط البروتيوليتي (Proteolytic Activity)، وبالتالي اختلاف مقدار تحلل الكازئين بالاعتماد على زمن تماس الخثرة مع المصل وpH الخثرة عند تصريف المصل، إذ تُفقَد نواتج تحليل الكازئين مع المصل خلال تصريفه. فالأنزيمات ذات القيمة المرتفعة لـ MCA/PA هي الأنزيمات المناسبة لصناعة الأجبان (Horne and Lucey, 2017, 121; Fox *et al*., 2017, 315).

2-1-2-2- أنزيمات تَخثُّر الحليب:

2-1-2-2-1- المنفحة والمُخثِّرات الحيوانيَّة:

تُعدّ منفحة العجول الشكل الأكثر استخداماً لأنزيمات تخثر الحليب، ويُشكِّل الكيموزين المكوِّن الأساسي للمنفحة، كما تحتوي على البيبسين (Pepsin A, Pepsin B) والجاستريسين (Pepsin c). وتختلف نسب المكوِّنات بحسب عمر العجول، والتغذية، وطريقة الاستخلاص (Foltmann, 1993, 37, 62-63; Abd-El Salam and Benkerroum, 2006, 174).

ويؤدِّي المحتوى العالي للكيموزين في منفحة العجول والتخصُّص الدقيق للأنزيم إلى حلمهة الجزء الأكبر من كازئين كابا دون الكازئينات الأخرى، ما يُحقِّق أقصى عائد للخثرة، وعدم ظهور الببتيدات ذات الطعم المُرّ، كما أنَّ تحليله اللّاحق للخثرة خلال مرحلة الإنضاج يسير ببطء، ما يضمن عدم تدهور الخثرة، وإعطاء الخواصّ الحسّيَّة والريولوجية التقليدية المرغوبة (Visser, 1993, 330; Fox and McSweeney, 1997, 7; Law, 2010, 89).

يعود استخدام أنزيمات المنفحة في صناعة الأجبان إلى حوالي 5500 سنة قبل الميلاد (Szecsi and Harboe, 2013, 37)، وقد حُضِّر أول مستخلص تجاري للمنفحة وبِيع عام 1874 في الدانمرك من قبل شركة Chr. Hansen (Law, 2002, 91-92). ويُعتقد بأنَّه أول مستحضر أنزيمي تجاري (Law, 2010, 88). وتُعرَّف المنفحة (Rennet) بأنَّها المستخلص التجاري الناتج عن

المعدة الرابعة (abomasa) للعجول أو الحملان أو الجديان الرضيعة الحاوي على أنزيم الرينين بحالته النشطة والمعروف بالكيموزين (EC 3.4.23.4). ويُسمَّى المُنتَج الناتج عن الحيوانات البالغة السابقة الذِّكر بمنفحة الماشية (Bovin rennet) (Food and Drug Administration, 2022, para. 1).

أُجريت المحاولات الأولى لعزل الكيموزين عام 1840 من قبل العالم الفرنسي Jean-Baptiste Deschamps، إذ اتُّخِذَت التسمية الفرنسية Chymosine ابتداءً من الكلمة الإغريقية Khymos وتعني العصارة. كما استُخدِمت تسميات أخرى مثل Chymase و Pexin، واقترح Lea و Dickinson اسم Rennin المُشتق من تسمية المنفحة (Rennet) (Szecsi and Harboe, 2013, 37-38)، الأمر الَّذي اختلط مع تسمية أنزيم الرينين المُفرز من الكلى (EC 3.4.23.15) renin، وبالتالي اقترح Foltmann العودة إلى التسمية الأصلية باللُّغة الإنجليزية (Chymosin)، الَّتي اعتمدها لاحقاً الاتحاد العالمي للكيمياء الحيويَّة والبيولوجية الجزيئية (Webb, 1992, 404).

سُجِلَّ انخفاض عام في تعداد الأبقار خلال فترة الخمسينيّات من القرن العشرين، وبالتالي العجول المتاحة للذّبح نتيجة انخفاض أعداد الولادات والرَّغبة في الحصول على اللحم، ما أدّى إلى انخفاض العرض على المنفحة وغلاء سعرها. كما ازداد إنتاج الأجبان في بداية السِّتِّينيّات بشكل ملحوظ، ما قاد إلى استنفاذ مصادر المنفحة التقليدية المتوفّرة. حَفزَّت هذه الحالة البحث عن مصادر بديلة لتغطية الاحتياجات المتزايدة من المنفحة لصناعات الأجبان (Andre´n, 2011, 576; Quaglia and Gennaro, 2003, 2133-2134; Uniacke-Lowe and Fox, 2017, 92) .

يُعدّ الببسين المستخلص من معدة الخنزير (Procine Pepsin) من أوائل بدائل المنفحة المستخدمة حيث استُخدِم بشكل مفرد أو ممزوجاً بنسب مُكافِئة من منفحة العجل، ويُؤخذ عليه أنَّ نشاطه المُختَّر للحليب مشروط بقيم الـ pH ويتعرَّض للتثبيط عند درجات الحرارة والـ pH المُستخدَمة في صناعة الأجبان. كما استُخدم ببسين الدواجن، الَّذي يُظهر نشاطاً بروتيوليتياً مرتفعاً غير مناسب لمعظم أنواع الأجبان، وقد أضحى كلٌّ من النَّوعين نادر الاستخدام (Andre´n, 2011, 576).

تُشابِه منفحة الجديان والحملان ومنفحة الماشية أنزيمياً منفحة العجول وتختلف بنسب المكوِّنات، إذ تحتوي منفحة العجول والجديان والحملان على الكيموزين بنسبة 88–94% والببسين بنسبة 6–12%، بينما تحتوي منفحة الماشية (بعد الفطام) نسبة منخفضة للكيموزين 10–20% ويرتفع محتوى الببيسين إلى 80–90%، بإهمال نسبة الجاستريسين (Foltmann, 1993, 44; Abd-El Salam and Benkerroum, 2006, 174; Law, 2002, 92-93). وقد تحتوي بعض أنواع المنفحة على الليباز كما في معجون المنفحة، إذ تُصنع من المعد المنقوعة والمجفَّفة لاحقاً للعجول والحملان والجديان المذبوحة بعد عملية الرضاعة مباشرة، وتُستخدم في صناعة الجبنة الإيطالية التقليدية (Harboe *et al*., 2010, 100). وتُعدّ منفحة الجديان والحملان ومنفحة الماشية لهذه الأنواع غير مناسبة لتخثير حليب الأبقار، وهي أكثر مناسبة لتخثير حليب نفس الحيوان. وتُشكِّل منفحة الأبقار بديلاً تقليدياً شائعاً منخفض التكلفة، إلّا أنَّ المحتوى المرتفع للببسين يعطي المنفحة نشاط بروتيوليتي عام مرتفع وحساسيّة عالية اتجاه الـ pH (Harboe *et al*., 2010, 100). ونظراً للمصادر العديدة والمتنوعة لأنزيمات تخثُّر الحليب فقد نصَّت التعاريف الرسمية للاتحاد الدولي للألبان International Dairy Federation (IDF) على أن تقتصر تسمية المنفحة على المواد المُحضَّرة من معد المجترات. أمّا أنزيمات التخثر الأخرى، خاصّةً الميكروبية، فتُسمَّى مُخثِّرات (Coagulants) (Law, 2010, 89; Andre´n, 2011, 576). وتعود جميع أنواع البروتياز في المنفحة الحيوانيَّة والمخثرات الفطرية الأخرى إلى مجموعة اسباراتيك البروتيازات (اسباراتيك الببتيديزات) (EC 3.4.23)، وقد سُميَّت سابقاً بالبروتيازات الحامضية (Foltmann, 1993, 37).

2-1-2-2-2- المُخثِّرات النباتيَّة:

استُخدِمَت المُخثِّرات النباتيَّة إلى جانب الأنزيمات التقليدية ذات المنشأ الحيواني منذ القدم، ومن أكثر البروتيازات النباتيَّة شائعة الاستخدام في الصناعات الغذائيَّة، خاصّة في صناعة الأجبان البابايين من نبات البابايا *Carica papaya*، والبرومالين من الأناناس *Ananas comosus*، والفيسين المعزول من المادة اللبنية لأنواع مختلفة من أشجار التين *Ficus racemosa, Ficus carica sylvestris*، وتعود هذه المُخثِّرات إلى مجموعة سيستيئين بروتياز. كما يُستَخدم الكاردوسين والسيبروسين المستخلصة من أزهار الخرشوف الشوكي *Cynara cardunculus*، والسيناراز من الخرشوف السكوليمي *Cynara scolymus* وتعود إلى مجموعة أسبارتات بروتياز.

بالإضافة إلى الكوكوميزين من البطيخ الأصفر *Cucumis melo* والليتوسين من الخس *Lactuca sativa* وتعود إلى مجموعة سيرين بروتياز. وتُستَخدم المُخثِّرات النباتيَّة لإنتاج الأجبان التقليدية بشكل رئيس في منطقة البحر الأبيض المتوسط، غرب أفريقيا، وبلدان جنوب أوروبا (Shah and Paray, 2014, 6-9). وتُبدي المُخثِّرات النباتيَّة نشاطاً بروتيوليتياً مرتفعاً اتجاه جميع الكازئينات بالمقارنة مع المنفحة الحيوانيَّة، ما ينتج انخفاض مردود الأجبان، وقواماً طرياً، وطعماً مُرّاً (De Renobales *et al*., 2013, 110).

2-1-2-2-3- المُخثِّرات الميكروبية:

عملت صناعات التخمير على تغطية النقص في المنفحة بإيجاد بدائل بالاعتماد على الأحياء الدقيقة، وقد أعطت الأنزيمات الميكروبية نتائج مُرضية في العديد من أنواع الأجبان ولاقت قبولاً واسعاً في معظم البلدان. وقد اختُبِر المئات من الأنواع البكتيرية والفطرية لإنتاج البروتياز، وأشارت التقارير الأولى إلى إظهار العديد من الأنواع البكتيرية القدرة على إفراز الأنزيم المُخثِّر للحليب، ومن أهمها:

Serratia marcescen, Streptococcus Liquefaciens, Streptomyces sp., Bacillus mesentericus, B. cereus, B. subtilis, B. brevis, B. fusiformis, B. polymyxa (Arima *et al*., 1967, 540-545; Sardinas, 1972, 50f).

وبرغم القدرة على تخثير الحليب لم يكن لاستخدام المُخثِّرات البكتيرية نتائج مجدية في صناعة العديد من أنواع الأجبان، إذ يُبدي البروتياز البكتيري نشاطاً بروتيوليتياً مرتفعاً غير نوعيّ للكازئينات α و β، وما يترتَّب عليه من خسارة في الدهن والنتروجين في المصل وانخفاض الجودة ومردود الخثرة وظهور الببتيدات ذات الطعم المُرّ خاصّة في الجبن المنضج. وهذا ما حال دون التوسُّع في الإنتاج التجاريّ، رغم النتائج العرضية الإيجابية الَّتي ذُكرت في أدبيات البحث العلمي من وقتٍ لآخر (Sternberg, 1976, 148ff).

أبلغت التقارير عن أعداد كبيرة من الفطريات المُنتِجة لأنزيم تخثُّر الحليب، ومن أبرزها

Ascochyta visa, Aspergillus candidus, Aspergillus flavus, Aspergillus oryzae, Aspergillus parasiticus, Basidiobolus ranarum, Byssochlamys fulva, Colletotrichum atramentarium, Conidiobolus brefeldianus, Conidiobolus villosus, Coriolus consors, Coriolus hirsutus, Endothia parasitica, Entomophthora apiculata, Entomophthora coronate, Fomitopsis annosa, Fomitopsis pinicola, Fomitopsis rosea, lrpex lacteus,

Mucor miehei, Mucor pusillus, Mucor rouxii, Rhizopus sp. (Arima *et al*., 1967, 540-545; Sardinas, 1972, 56f).

وكما هو الحال في البكتيريا، كان لمعظم المُخثِّرات الفطرية أثر بروتيوليتي مرتفع جداً، وقد خضعت بعض الأنواع للتقييم المُكثَّف نظراً لنتائجها الواعدة. وقد أثبتت ثلاثة أنواع فطرية (*Endothia parasitica, Mucor miehei, M . pusillus*) أنَّها مناسبة بشكلٍ كافٍ للتسويق على نطاقٍ واسع (Sardinas, 1972, 59-65; Iwasaki *et al*., 1967, 546-551).

حقَّقَ عدد قليل من المصادر الميكروبية الشروط الملائمة للاستخدام كبدائل للمنفحة ووصل إلى عتبة الإنتاج التِّجاريّ رغم استمرار البحث والإبلاغ عن مصادر جديدة من حينٍ إلى آخر، إذ تتوفَّر تحت مسمَّيات تجارية مثل Hannilase، وRennilase، وFormase، وMarzyme، وMiki، وModilase المُنتَجة من *Mucor miehei*، وNoury، وMeito، وEmporase المُنتَجة من *Mucor pusillus* (Lindt)، وSuparen، وSure Curd من *Endothia parastica*، وMikrozyme من *Bacillus subtilis* (Scott, 1998, 154-155). بالإضافة إلى مُنتَجات الكيموزين المُهجَّن أو "الكيموزين المُنتَج بالتخمير"، الَّتي تلقى رواجاً واسعاً، والمُنتَجة بإدخال الجين الخاصّ بالكيموزين ضمن المُعيل المناسب مثل *Kluyveromyces lactis*، و*Escherichia coli*، و*Aspergillus niger*. (Scott, 1998, 155, 157; Law, 2010, 91; Harboe *et al*., 2010, 100f).

الأنزيم endothiapepsin (EC 3.4.23.22) من فطر *Cryphonectria* or *Endothia parasitica* هو أحد أنزيمات الاسباراتيك بروتياز، يتميَّز بـ pH مثالي ونقطة تعادل كهربائي (pI) تُقارب 5.5 وتبدو هذه القيمة حامضية للتخثير الطبيعي للحليب. نُسِبَ نشاط تخثر الحليب للأنزيم بدايةً إلى التأثير في نفس الرابطة (Phe105- Met106) الَّتي يقوم الكيموزين بتفكيكها، ليتَّضح تأثيره لاحقاً بفصله للرابطة Ser104-Phe105 (Cooper, 2013, 147). يُبدي أنزيم Endothiapepsin نشاط بروتيوليتي أعلى منه في الكيموزين وأنزيم Mucorpepsin، ويميل لإنتاج الطعم المُرّ في الأجبان ذات المحتوى الرطوبي العالي. وقد تُظهِر المستخلصات غير المنقاة تماماً بالإضافة إلى الأسباراتيك بروتياز بعض أنزيمات البروتياز والليباز الأخرى. وعلى الرّغم من استخدام أنزيم Endothiapepsin إلى حدٍ ما، يُعدّ أنزيم Mucorpepsin الأكثر استخداماً في صناعة الأجبان (Scott, 1998, 157).

الأنزيم Mucorpepsin (EC 3.4.23.23)، هو أحد أنزيمات اسباراتيك بروتيناز الميكروبية والمُنتَج بوساطة الفطريات الزيجية *Mucor miehei* ، و*Mucor pusillus* والمُعاد تصنيفها إلى الجنس *Rhizomucor* ، وعليه ارتبط بتسميات عديدة مثل pepsin (rennin) *Mucor pusillus*، و *Mucor miehei* pepsin (rennin)، و aspartic proteinases of *M. pusillus* and *M. miehei*. ويتقارب النوعان الفطريان بشكل كبير من الناحية التصنيفية، كما أنَّ تراكيبهما الأنزيمية متشابهة للغاية، وقد اعتُمدت التسمية Mucorpepsin من قبل الاتحاد الدولي للكيمياء الحيويَّة والميكروبيولوجيا الجزيئية (IUBMB)، ويتمّ التعامل مع الأنزيمين من كلا النَّوعين بشكل مختلف (Beppu and Nishiyama, 2013, 154).

يُخلَّق العديد من الأنزيمات البروتيوليتيّة بصورة سليفة (precursors) غير مُفعَّلة أو مولِّد أنزيمي (Zymogen) لمنع تحلُّل البروتينات غير المرغوبة، ولتمكين التَّنظيم المكاني والزماني للنشاط البروتيوليتي. ويتم تفعيل المولِّد الأنزيمي بشكلٍ عامّ عن طريق التحلُّل المحدود لجزء التفعيل المُثبِّط أو إزالته، والشكل الأكثر شيوعاً لجزء التفعيل هو الامتداد الطرفي الآزوتي في الأنزيم التَّامّ، أو الجزء الإشعاري (prosegment)، الَّذي يحول دون وصول الركائز إلى المركز الفعّال (Khan and James, 1998, 815). ويتركَّب Mucorpepsin كمولِّد أنزيمي، ويقوم الجين المُرمِّز في كلٍ من فطر *R. miehei* و*R. pusillus*، بترميز سليفة مكوَّنة من تسلسل إشارة لاثنين وعشرين حمضاً أمينياً لتكوين ببتيداً إشعارياً مكوناً من 47 حمضاً أمينياً وأنزيماً تاماً مكوناً من 361 حمضاً أمينياً في *R. miehei*. ولوحِظ وجود موقعين N للارتباط بالجليكوزيل (N-linked glycosylation; Asn79 and Asn188) في تسلسل الحموض الأمينية لبروتياز *R. miehei* (Beppu and Nishiyama, 2013, 155)، قُدِّرَ الوزن الجزيئي لأنزيم Mucorpepsin لفطر *R. miehei* بحوالي 41800 Da بالاعتماد على تحليل الحموض الأمينية، و42000 Da باستخدام الرحلان الكهربائي (SDS-Page) (Schomburg *et al*., 2002, 109).

تبلغ قيمة درجة الحموضة المثلى لأنزيم Mucorpepsin حوالي pH 4، على الرّغم من اعتماد القيمة الدقيقة على نوع الركازة (Beppu and Nishiyama, 2013, 155). إذ تبلغ القيم المثالية pH 3.8 للهيموغلوبين، و pH 4 للسلسلة B للأنسولين، و pH 5.6 للكازئين (Schomburg *et al*., 2002,

(108. ويُقاس النشاط البروتيوليتي للأنزيم باستخدام الكازئين، أو الهيموغلوبين المُخرَّب حمضياً كركائز (Beppu and Nishiyama, 2013, 155).

يُبدي أنزيم Mucorpepsin نشاطاً مُخثِّراً مرتفعاً، ونشاطاً بروتيوليتياً منخفضاً نسبيّاً، ما يُمكِّن من استخدامه كمُخثِّر للحليب. ويعمل الأنزيم بشكل تفضيلي على فصل الرابطة Phe105-Met106 في كازئين كابا ليُسبِّب تخثُّر الحليب. ويمكن أن يُحدَّد النشاط المخثر للحليب بالاعتماد على الزمن اللازم لتخثير محلول 10% من مسحوق الحليب المقشود (Arima *et al*., 1967, 541-542). ويتمّ التعبير عن النشاط النَّوعيّ للأنزيم بنشاط تخثُّر الحليب لكل وحدة بروتين بعد قياس الامتصاصية عند طول موجة 280nm. وتُماثِل الخواصّ الأنزيمية لأنزيم Mucorpepsin تلك الَّتي في الكيموزين (Beppu and Nishiyama, 2013, 155). ويُثبَّط أنزيم Mucorpepsin بفعل المُثبِّطات العامة لأنزيمات اسباراتيك بروتيناز مثل diazoacetyl-DL norleucine methyl ester (DAN)، و1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane (EPNP)، والبيبستاتين (Beppu and Nishiyama, 2013, 155).

يُعدّ أنزيم Mucorpepsin لفطر *R. pusillus* من أوائل المُخثِّرات الميكروبية المستخدمة. ويمتاز بنشاط مرتفع لتخثُّر الحليب بما يفوق منفحة العجول بثلاث مرات، ويقل زمن التخثُّر بزيادة تراكيز أيونات الكالسيوم. كما أنَّ فعاليته غير مُقيَّدة اتجاه الـ pH، كما في المُخثِّرات الأخرى. ويقوم الأنزيم بفصل الروابط الببتيدية عند البواقي الأمينية الأروماتية، لكن ليس بالتخصُّص نفسه الَّذي يظهره بروتياز فطر *R. miehei* . كما أنَّه يبدي نشاطاً بروتيوليتياً مرتفعاً يفوق منفحة العجول وبروتياز فطر *R. miehei*، ما يؤدِّي إلى إنتاج خثرة قاسية وفقد الخثرة للدسم في المصل (0.4–0.5% دسم في المصل) ومردود للأجبان الناتجة أقل منه في المُخثِّرات الأخرى. كما يميل لإنتاج الطعم المُرّ بشكل أكبر في الأجبان المنضجة، لذا يستخدم للأجبان ذات فترة الإنضاج القصيرة. وقد يُستخدم ممزوجاً مع ببسين الخنزير لصناعة بعض أنواع الأجبان. ويستمر نشاطه في المصل، ما يعيب المصل عند الاستخدام اللاحق. ويتمّ تطوير وسائل تنقية جديدة لإزالة المواد والنظم الأنزيمية غير اللازمة في المُخثِّر لتنقية جميع المستخلصات الميكروبية وإعطاء نتائج أجدى لتخثُّر الحليب ونشاط بروتيوليتي أقل (Scott, 1998, 156).

يعمل البروتياز من فطر *R. miehei* على تحليل الكازئين بسرعة كبيرة في المجال pH 5.5-7 كما يعمل على استهداف كازئينات α وβ في هذا المجال. ويفوق النشاط البروتيوليتي لبروتياز *R. miehei* النشاط البروتيوليتي للكيموزين لكن ينخفض احتمال حدوث الطعم المُرّ في الخثرة عند استخدام هذا الأنزيم. ويُظهِر الأنزيم نشاطاً مُخثِّراً مرتفعاً بالنسبة إلى النشاط البروتيوليتي (نسبة MCA/PA مرتفعة). كما يُظهر الأنزيم استقراراً حرارياً مرتفعاً مقارنة مع المُخثِّرات الأخرى، والأنزيم سريع الاستجابة في المجال الحراري ℃ 45-37، وتبلغ درجة الحرارة المثلى ℃ 42 ويتخرَّب عند الدرجة ℃ 70. وتُخفِّض إضافة كلوريد الكالسيوم من الوقت اللَّازم لإحداث الأنزيم للتخثُّر إلى حدٍ كبير، بينما تؤدِّي إضافة كلوريد الصوديوم في بعض طرائق التحضير إلى إبطاء عملية التخثُّر، ويُستخدم الأنزيم بنجاح للعديد من أنواع الأجبان (Scott, 1998, 155). وقد أشار Preetha وBoopathy (1997، 575f) إلى وصول نشاط تخثُّر الحليب لبروتياز *R. miehei* إلى أعلى قيمة عند تركيز 0.4 M لكلوريد الكالسيوم، وانخفاض النشاط عند التراكيز الأعلى. كما أشار الباحثان إلى انخفاض نشاط التخثُّر وازدياد النشاط الحالّ للبروتين عند إضافة كلوريد الصوديوم ضمن المجال 0.5-0.1 M. وأشار Foda وزملاؤه (2012، 586f) إلى تحقُّق أعلى نشاط لتخثُّر الحليب لبروتياز *R. miehei* عند وجود كلوريد الكالسيوم بتركيز 0.05 M، وظهور تأثير مُثبِّط عند التراكيز الأعلى. كما أشار الباحثون إلى انخفاض نشاط التخثُّر عند إضافة كلوريد الصوديوم بتراكيز تزيد عن 3%.

ويُعدّ البروتياز من فطر *R. miehei* من أفضل أنواع المُخثِّرات الميكروبية وأكثرها انتشاراً، وتتوافر منتجاته التِّجاريَّة وفق ثلاثة أنواع: النوع الطبيعي غير المُعدَّل (Type L)، والنَّوعين (TL, XL) المُعدَّلة بوساطة الأكسدة الكيميائيَّة لسلسلة الميثونين الجانبية لتخفيض الاستقرار الحراري مما يُمكِّن من التخلُّص من الأثر البروتيوليتي للأنزيم في المصل للاستخدام اللاحق للمصل. كما أنَّها ذات نشاط بروتيوليتي أقل من الأنزيم الأصلي، رغم الاستخدام الواسع للأنزيم الأصلي لمختلف أنواع الأجبان (Law, 2002, 94).

يعتمد اختيار نوع المُخثِّر لعملية تصنيع الأجبان على العديد من الاعتبارات، كاستيفاء المتطلّبات القانونية المتعلِّقة بالنقاء والسَّلامة، والمتطلّبات الأخرى للمُستهلِك (كأن يكون منتجاً عضوياً، أو نباتياً، أو حلالاً..)، والتكلفة الاقتصادية مع الأخذ بالحسبان مردود الأجبان وجودتها، والنسبة

المرتفعة لنشاط تخثُّر الحليب إلى النشاط البروتيوليتي (MCA/PA; C/P) الَّتي تنعكس على القوام والنكهة، وقوّة المُخثِّر (قدرة جرعة معينة على تكوين خثرة مستقرَّة لمقدار من الحليب خلال زمن معين) وترتبط عموماً بالنسبة C/P، استقرار المُخثِّر عند قيم الـ pH ودرجات الحرارة المستخدمة في تصنيع الأجبان والاستقرار اتجاه التَّغيُّرات الممكنة خلال معاملات التصنيع، تطوير نكهة وقوام الأجبان الطبيعيَّة، والتَّثبيط خلال سترة الشرش، بالإضافة إلى إمكانيّة التخزين وسهولة الاستخدام (Harboe *et al.*, 2010, 124-125). وعلى الرّغم من التاريخ القديم للمنفحة والمخثرات فإنَّ العديد من الجوانب المتعلقة بأنزيمات تَخثُّر الحليب، ولا سيما وظائفها، لا تزال غير مفهومة تماماً. وسيزداد الفهم التفصيلي لعملية صناعة اللأجبان تدريجياً، ومن المتوقَّع استمرار تطوير أنزيمات جديدة لتخثُّر الحليب (Harboe *et al.*, 2010, 125).

2-1-3- حركيَّة الأنزيم وثباتيّته:

تُوَفِّر دراسة حركيَّة الأنزيم المعلومات الخاصّة بمُعدَّل تنشيط وتثبيط الأنزيمات ومُعدَّل حدوث التفاعل. ويتأثَّر مُعدَّل حدوث التفاعل المُحَفَّز أنزيمياً بالعديد من العوامل كزمن التفاعل، والتركيز الأوَّلي للأنزيم والركازة، وقيم الـ pH، ودرجة حرارة التفاعل، والتنشيط بفعل العوامل المُتَمِّمة، والتَّنظيم التفارغي (allosteric regulation)، ووجود العوامل المُثبِّطة (Van Oort, 2010, 8-11; Dutta *et al*., 2005, 127).

ويعتمد مُعدَّل التفاعل الكيمياحيوي على تركيز الأنزيم وتركيز الركازة عند درجة حرارة، ودرجة pH معيَّنة. ويتناسب المُعدَّل الأوّلي للتفاعل طرداً مع تركيز الأنزيم عند بقاء تركيز الركازة فائضاً. وباختلاف تركيز الركازة وبقاء تركيز الأنزيم ثابتاً فإنَّ مُعدَّل التفاعل يعتمد خَطِّيّاً على تركيز الركازة بدايةً (first-order kinetics). وفي النهاية ومع وصول سرعة التفاعل إلى قيمة محدودة (V_{max}) فإنَّ التفاعل يتبع للرُّتبة الصفرية أي لا يتبع لتركيز المواد المتفاعلة (zero-order kinetics). وتُعبِّر السرعة القصوى (V_{max}) عن مُعدَّل التفاعل عند الإشباع الكامل للأنزيم بالركازة، ما يُشير إلى الإشغال المستمر لجميع مواقع الرّبط الأنزيمية. ويعرَّف ثابت Michaelis (K_m) بأنَّه تركيز الركازة المُقابل لنصف السرعة القصوى، ويتناسب عكساً مع ألفة الأنزيم للرُّكازة (Roberts and Gibb, 2013, 25)، وتُشير قيم K_m المنخفضة إلى حاجته المنخفضة من الركازة ليصبح مُشبَعاً، في حين تُشير قيم K_m المرتفعة إلى المتطلّبات المرتفعة من الركازة للوصول إلى

أقصى سرعة للتفاعل. والجدير بالذّكر بأنَّ الأنزيم المُحفِّز لنفس التفاعل والمشتق من مصادر مختلفة يمكن أن يمتاز بقيم K_m شديدة الاختلاف، وقد يبدي الأنزيم ذاته قيم Km مختلفة لكل ركازة (Robinson, 2015, 13). فقد أظهر Wang وزملاؤه (2021، 8) اختلاف فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei* المؤشَّب في *Aspergillus niger* اتجاه الركائز المختلفة، إذ بلغت الفعاليّة أقصاها اتجاه الكازئين، وانخفضت اتجاه الهيموغلوبين، فالميوغلوبين، فالألبومين البقري، ثُمَّ حليب الفرز. وبلغت قيم K_m وV_{max} اتجاه هذه الركائز 3.16 mg/mL و3583 µmol/min/mg للكازئين، و5.88 mg/mL و4572 µmol/min/mg للهيموغلوبين، و5.43 mg/mL و 3623 µmol/min/mg للميوغلوبين، و1.56 mg/mL و1732 µmol/min/mg للألبومين البقري، بناءً على تقدير كمِّيّة التيروزين المُتشكِّلة. وقد أظهر Da Silva وزملاؤه (2016، 1065) الألفة العالية لبروتياز *Rhizomucor miehei* اتجاه سلسلة k-casein ، إذ بلغت قيمة ثابت ميكاليس "0.036".

يمكن أن تؤثِّر درجة الـ pH في الصفات الأيونية للمجاميع في كلٍ من الأنزيم والركازة ما يؤثِّر في مُعدَّل ارتباط الركازة بالمركز الفعَّال في الأنزيم، وغالباً ما تكون هذه التأثيرات غير قابلة للعكس، خاصّةً عند القيم الحمضية أو القلوية الأكثر تطرُّفاً، إذ تؤدِّي هذه القيم إلى تخريب البروتين وعدم استعادة الحالة الطبيعيَّة للأنزيم عند استعادة القيم الطبيعيَّة لـ pH وبالتالي فقدان الفعاليّة الأنزيمية. والجدير بالذّكر أنَّ القيم المثلى للأنزيم، قد لا تتطابق مع القيم الطبيعيَّة المحيطة داخل الخلايا، ما يشير إلى التأثير المهيمن لـ pH الداخلي في الأنزيم (Robinson, 2015, 16). وقد أظهر Preetha وBoopathy (1997، 573) في دراسة حركيَّة اختلاف قيم الـ pH المثلى لكلٍ من نشاط تخثُّر الحليب، والنشاط البروتيوليتي لبروتياز *Rhiomucor miehei*، إذ بلغت هذه القيم 5.6 و4.1 على التَّوالي.

يُعدّ تأثير درجة الحرارة في فعالية الأنزيم تأثيراً معقداً، إذ يظهر هذا التأثير في اتجاهين متعاكسين في كلٍ من حركيَّة وثباتيّة الأنزيم، فبارتفاع درجة الحرارة يزداد مُعدَّل الحركة الجزيئية وبالتالي مُعدَّل التفاعل، بينما يحدث تعطيل تدريجي للأنزيم بفعل تشوُّه الطبيعة البروتينية اعتماداً على مُدَّة التعرُّض للحرارة (Robinson, 2015, 16f). وقد أشار Preetha وBoopathy (1997، 575) إلى فقد بروتياز *Rhiomucor miehei* لحوالي 50% من نشاطه البروتيوليتي عند تعرُّضه

لدرجة الحرارة 45℃ لمُدَّة 30 دقيقة، وتثبيط كامل لهذا النشاط عند التعرُّض لدرجة الحرارة 65℃ لمُدَّة 30 دقيقة، وثباتيّة أكبر لنشاط تخثُّر الحليب اتجاه الارتفاع في درجات الحرارة. وأوضح Ataci وزملاؤه (2009، 1756) تأثير درجتي الحرارة والـ pH في نشاط تخثُّر الحليب للبروتياز المُنتَج من *Rhiomucor miehei*، حيث أظهرت دراستهم تغيير قيم الـ pH المعتدلة لنشاط البروتياز وثباتيته الحراريَّة، إذ لم يظهر نشاط تخثُّر الحليب عند درجة pH 7 ودرجتي الحرارة 55℃ و60℃، بينما ظهر النشاط الأنزيمي عند قيم pH 5 و 6 عند درجتي الحرارة ذاتها. كما ازداد الثَّبات الحراري للبروتياز بانخفاض قيم الـ pH، وتحقَّقَ أفضل نشاط أنزيمي وأقصى ثبات حراري عند درجة pH 5. ولم يظهر أي نشاط للبروتياز عند درجة الحرارة 70℃ عند جميع قيم الـ pH. وقد ظهر النشاط الأنزيمي عند pH 6 عند درجتي الحرارة 55℃ و60℃. وكان لدرجة الـ pH 5 أفضل تأثير في ظهور نشاط تخثُّر الحليب لغاية درجة الحرارة 65℃، كما تحقَّقَت أعلى قيم لنشاط التخثُّر عند درجة الحرارة 45 °C وقيم pH ضمن المجال 5–7. وأشار Da Silva وزملاؤه (2016، 1059) إلى تحقُّق أعلى قيمة للنشاط الحالّ للبروتين لبروتياز *Rhiomucor miehei* عند pH 5.5 ودرجة الحرارة 55℃، وأشاروا إلى استقرار الأنزيم ضمن مجال pH 3-5، ودرجات حرارة تصل حتى 45℃ لمُدَّة 60 دقيقة.

تُخفِّض المُثبِّطات من سرعة التفاعل المُحفَّز أنزيمياً بشكل مباشر أو غير مباشر عن طريق التأثير في الخصائص التحفيزية للمركز الفعّال.

قد تعمل المُثبِّطات الانعكاسية بشكل تنافسي عن طريق الارتباط بالمركز الفعّال للأنزيم بفضل التشابه الهيكلي التام مع الركازة الطبيعيَّة للأنزيم، وتتمثَّل السمة الرئيسة للمثبطات الانعكاسية التنافسية في إمكانيّة إزاحتها من المركز الفعّال عند استخدام تراكيز مرتفعة من الركازة، وبالتالي استعادة النشاط الأنزيمي. وتزيد المُثبِّطات الانعكاسية التنافسية من قيمة K_m عن طريق زيادة تركيز الركازة اللازم لإشباع الأنزيم، إلا أنَّها لا تُغيِّر من قيمة V_{max}.

وقد تعمل المُثبِّطات الانعكاسية بشكل غير تنافسي عن طريق الارتباط بمركز مُتميِّز عن المركز الفعّال للأنزيم، ما يمنع التفاعل اللّاحق رغم عدم ارتباطها بالموقع الخاصّ بالركازة، ولا يمكن التغلُّب على هذا التَّثبيط بزيادة تركيز الركازة. تعمل هذه المُثبِّطات على تقليل تركيز الأنزيم النشط في وسط التفاعل وبالتالي تخفيض V_{max}، إلا أنَّها لا تُغيِّر من قيمة K_m. في حين ترتبط

المُثبِّطات اللاانعكاسية كمركبات الفوسفور العضوي بالأنزيم بشكل دائم وغالباً ما تكون ذات طبيعة سُمِّيَّة (Roberts and Gibb, 2013, 28-32). وقد أشار Preetha و Boopathy (1997، 575) إلى التأثير السَّلبيّ لكلوريد الصوديوم في نشاط تخثُّر الحليب لبروتياز *Rhiomucor miehei*، وتأثيره المُحفِّز للنشاط البروتيوليتي، وبالتالي انخفاض نسبة MCA/PA. كما أشار Da Silva وزملاؤه (2016، 1064–1063) إلى انخفاض كبير في النشاط التحلُّلي لبروتياز *Rhiomucor miehei* تحت تأثير كبريتات لوريل الصوديوم، والألمنيوم، وكلوريد النحاسيك، وأشاروا إلى التَّثبيط الأكبر البروتياز بفعل البيبستاتين "A".

2-2- الفطريات:

الفطريات هي أحياء حقيقية النواة تخلو من الكلوروفيل ما جعلها غير ذاتيّة التَّغذية وتتراوح تغذيتها من الرُّميَّة إلى الطفيلية، مُمتصَّة للغذاء، تحتوي على الكيتين في جدرانها الخلويَّة. وغالباً ما تكون الفطريات متعدِّدة الخلايا وتتكوَّن أجسامها من خيوط متجانسة الأقطار تقريباً حاوية على الأنوية يطلق عليها الهيفات، الَّتي تُمثِّل وحدة تركيب الأجسام الفطرية (Thallus)، مُنتِجة للأبواغ، فيما عدا الخمائر الَّتي غالباً ما تكون وحيدة الخلية وتتكاثر بالتبرعم. وتتوزَّع الفطريات على بيئات مختلفة تُشكِّل فيها التربة البيئة الرئيسة للفطريات وتأتي البيئة المائيّة بالدرجة الثانية (Carlile, 2001, 1, 3, 12, 14).

وتبرُز الأهمِّيَّة الاقتصادية للفطريات من خلال التأثيرات الإيجابيّة والسَّلبيّة في الأنشطة البشريّة، فرغم دورها في تلف المواد الغذائيَّة وأمراض النباتات والحيوانات، يظهر التأثير الإيجابي للفطريات من خلال استخدامها في صناعات المعجنّات والتخمير والأدوية والصناعات البيوتكنولوجيّة، بالإضافة إلى استخدامها كغذاء. ويعود ذلك إلى وفرة وتنوُّع الفطريات والأدوار الحيويَّة الَّتي تلعبها في النظم البيئيّة الطبيعيَّة والمتغيِّرة وذات الصلة بالأنشطة البشريّة (Mueller and Bills, 2004, 1). وتُشَكِّل الأنواع الفطرية المقبولة تصنيفياً (120,000 نوع) حوالي 3–8% من العدد الإجمالي للفطريات، الَّذي قد يقارب 2.2–3.8 مليون نوع كما قدَّره Hawksworth و Lücking (2017، 1).

ومن المعروف أنَّ الكائنات الحية الَّتي دُرِسَت بشكل تقليدي على أنَّها فطريات تتوزَّع ضمن ثلاث مجموعات منفصلة تشمل: الفطريات البيضية (Oomycetes)، والفطريات الهالمية (Slime moulds)، والفطريات الحقيقية (Eumycota). وقد أُتبِعَت الفطريات البيضية إلى مملكة الطلائعيات الصبغية (Chromista)، في حين أُتبِعَت الفطريات الهالمية إلى مملكة الأوَّليّات (Protozoa)، وسُمِّيت هذه المجموعات بالكائنات شبيهة الفطريات. وتضمّ مملكة الفطريات (Kingdom Fungi) حصراً الفطريات الحقيقية (Carlile, 2001, 12).

وتُقسَم مملكة الفطريات إلى أربعة مجاميع رئيسية وهي شعبة الفطريات الزيجية (Zygomycota)، وشعبة الفطريات الكيتريدية (Chytridiomycota)، وشعبة الفطريات الأسكية (Ascomycota)، وشعبة الفطريات البازيدية (Basidiomycota). وتُتبَع أفراد الفطريات الناقصة (Deuteromycetes) وفق هذا التصنيف للشعبتين الأخيرتين عند اكتشاف الطور الجنسي الناقص (Carlile, 2001, 12-15; Blackwell and Spatafora, 2004, 9).

واعتماداً على النشوء والتَّطوُّر الجزيئي والتقسيم المورفولوجي عرض Hibbett وزملاؤه (2007، 509–547) إعادة التَّقسيم إلى تحت مملكة (Dikarya) تضمّ الفطريات الأسكيّة والبازيديّة، وسبعة شعب (Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Glomeromycota, Ascomycota, Basidiomycota)، ولا تُقبَل الفطريات الزيجية كشعبة رسمية وفق هذا التَّصنيف وتبقى كمجموعة قابضة لإعادة النظر في حل الارتباط للمجموعات الَّتي ضُمَّت تقليدياً إليها.

وتتكوَّن شعبة الفطريات الزيجية من صفّ الفطريات الشعرية Trichomycetes، وصفّ الفطريات الزيجية Zygomycetes، ويظهر الطور الجنسي في كلٍ من الصَّفّين عبر اندماج جاميطيتان لتكوين لاقحة تعطي بدورها بوغة ساكنة. ويتضمَّن صفّ الفطريات الزيجية حوالي حوالي 900 نوع. وتُعدّ رتبة Mucorales أكثر مجموعات الفطريات الزيجية عدداً من الأجناس، وتتميَّز بالوفرة والانتشار الواسع، معظم أفرادها رميّ التغذية، ويظهر فيها تكوين للأبواغ السبورانجية وحيدة أو متعدِّدة النَوى لتكوين الهيفات لنفس النمط التزاوجي (+ أو −). كما قد يظهر بعض الأنواع تكوين للأبواغ الكلاميدية كنمط آخر للأبواغ اللاجنسية. ويُعدّ جنس Mucor أكثر الأنواع بين الموكوريات وينتشر في التربة وبقايا الخشب المتحلِّلة (Carlile, 2001, 38-43).

2-2-1- الجنس *Rhizomucor*:

يضُم الجنس *Rhizomucor* الفطريات الشبيهة بالجنس *Mucor*، ويتمثَّل التشابه في الأكياس البوغية (nonapophysate sporangia) وحاملات الأكياس البوغية المتفرِّعة (branching sporangiophores)، ويظهر الاختلاف الواضح من خلال تكوين أشباه الجذور (rhizoids) والهيفات المدَّادة (stolons). وتتميَّز عن الجنس *Rhizopus* بغياب الانتفاخ في نهاية الحامل الجرثومي (apophysis)، ووجود التفرُّعات الحاملة للأكياس البوغية. كما تتميَّز عن الجنس *Absidia* بغياب نسيج الأبوفيسيس ووجود الأكياس البوغية الكُرويّة (Papp *et al*., 2011, 783).

اعتمد Schipper (1978، 53) ضم الجنس *Rhizomucor* ثلاثة أنواع فطرية محبة للحرارة *R. miehei*، و*R. pusillus* ، و*R. tauricus* ، إذ صُنِّفت هذه الأنواع سابقاً ضمن الجنس *Mucor*.

عُزِلَ النَّوع *R. tauricus* مَرّة واحدة فقط، حيث شكَّك Vágvölgyi وزملاؤه (1999، 1318) في صِحّة هذا النَّوع، واقترحوا عَدّ هذه العزلة كطفرة لسلالة من النَّوع *R. pusillus* . تمَّ وصف نوعين مُحبَّين للحرارة *R. nainitalensis*، و*R. pakistanicus* سابقاً، ويتمّ اعتبارهما الآن كاسمين بديلين للنَّوعين *R. miehei*، و*R. pusillus* على التَّوالي. كما تمَّ وصف نوعين آخرين كأفراد جديدة للجنس *Rhizomucor* وهي *Rhizomucor endophyticus*، و*Rhizomucor variabilis*، وفق صنفين (*R. variabilis var. regularior* & *R. variabilis var. variabilis*)، وهو عامل مسبب للزيجوميسيس الجلدي عند الإنسان.

أظهر تحليل الجينات الارتباط الوثيق للنَّوعين *R. miehei*، و*R. pusillus* ، وأُثبِتَت صلة النَّوع *R. variabilis* بأنواع تتبع للجنس *Mucor*. كما تم اعتبار النَّوع *R. endophyticus* كاسم بديل للنَّوع *Mucor genevensis*. وتشير جميع التقارير إلى احتواء الجنس *Rhizomucor* لنوعين فقط وهي *R. miehei*، و*R. pusillus* . وينتشر النَّوعان في أوربا، وشمال أمريكا، وآسيا، وإفريقيا. ويُعدّ كلا النَّوعين من العوامل المسبِّبة لالتهاب الضرع والإجهاض الفطري في الأبقار. ونادراً ما يسبب *R. pusillus* الأمراض المرتبطة للإنسان، وقد يُسبِّب العدوى الانتهازية في المرضى الذين يعانون من ضعف في جهاز المناعة. بينما لم تُسجَّل أي حالة مرضية للإنسان مرتبطة بالنَّوع *R. miehei*.

ويمكن عزل النَّوعين بسهولة من التربة والكمبوست والمواد العضويَّة المتحلِّلة. ويمكن تمييزهما بسهولة عن الجنس *R. variabilis* من خلال درجة الحرارة القصوى للنموّ، وفرة أشباه الجذور (rhizoids)، ووجود أو غياب الأبواغ الكلاميدية. ويبدي النَّوعان تشابهاً كبيراً لكن تُبدي مستعمرات *R. miehei* لوناً أكثر قتامة منها في النَّوع *R. pusillus*. ويُبدي *R. miehei* تفرعات أقل لحوامل الأكياس البوغية، وأكياس بوغية وأبواغ زيجية أصغر حجماً. كما أنَّ *R. miehei* متشابه الثالوس (homothallic)، إذ يتمّ التزاوج على ميسيليوم الفطر الواحد نفسه في حين *R. pusillus* متباينة الثالوس (heterothallic) (Papp *et al*., 2011, 784).

2-2-1-1- فطر ***Rhizomucor miehei*** **(Cooney et Emerson) Schipper**:

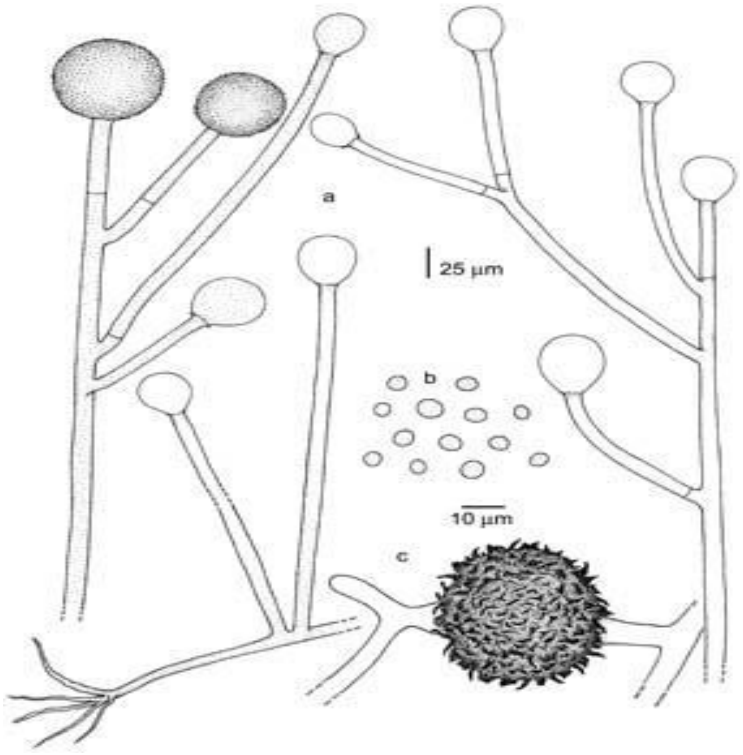
قدّمَ Cooney وEmerson (1964، 1-188) الوصف التصنيفي الأوَّل للفطريات المُحبَّة للحرارة المرتفعة بتعريفها على أنَّها الفطريات القادرة على تحقيق أقصى نموّ عند درجة الحرارة 50 °C أو عند درجات أعلى، وغير قادرة على النموّ عند درجات تَقِل عن 20 °C. وقد أُدرِج الفطر *Mucor miehei* ضمن هذا التصنيف تحت الجنس *Mucor*. وقدَّمَ Cooney وEmerson (1964، 27) وصفاً لمستعمرات هذا الفطر النّامية على بيئة PDA عند درجة حرارة 45℃ حيث تبدو بلون أبيض بدايةً ثم رمادي شاحب إلى رمادي، بارتفاع 2-3 mm في العزلات الجديدة، وتتشكَّل أشباه الجذور والهيفات المَدّادة أحياناً. حاملات الأكياس البوغية بعرض (9.5-11 µm)، بُنِّيّة شاحبة، بتفرعات كاذبة المحور (sympodial branching)، وغالباً ما توجد حواجز أعلى نقطة التفرُّع. الأكياس البوغية بقطر (60-) 55-13 µm، كُرويَّة رماديِّة مع نتوءات قصيرة (echinulations). العُوَيمِدات (columellae) شبه كُرويَّة، مُسطَّحة، أُسطوانيّة إلى كُمَّثرية 11-33 µm بالعرض، تصل إلى (45-)35 µm في الطول، تتّخذ شكل المِظلَّة عندما تضعف في بعض الأحيان. الأبواغ السبورانجية بقطر 3-5 µm صغيرة كُرويَّة إلى شبه كُرويَّة، بيضويّة زجاجية ناعمة الجدران. الأبواغ الزيجية بقطر 30-50 µm (-18.5)، كُرويَّة ومضغوطة نوعاً ما بين المُعلِّقات، بُنِّيّة مُحمَرَّة إلى بُنِّيّة داكنة، وجدران ثؤلوليّة (verrucose). المُعلِّقات (suspensors) متساوية أو تقريباً كذلك، أعرض من الهيفات بقليل. متشابه الثالوس. المدى الحراري 25-57°C.

وتبدو مستعمرات النَّوع *R. miehei* النامية على بيئة beerwort agar وعند درجة الحرارة 36 ℃ كما وصفها Schipper (1978، 59) ممتدّة بلون زيتوني إلى رمادي، تتكوَّن حاملات الأكياس

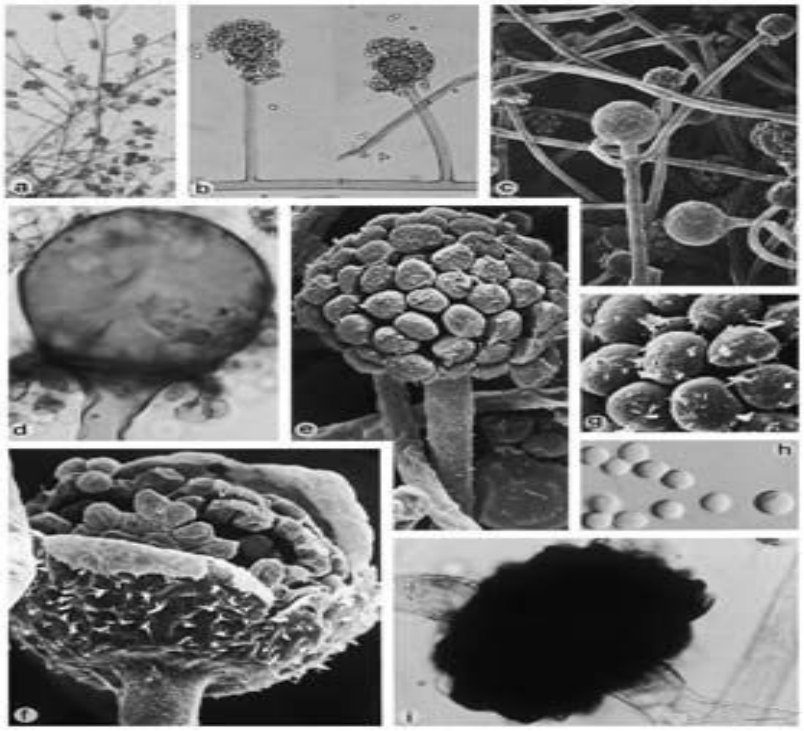
البوغية على هيفات مدّادة مع أشباه جذور ضعيفة النموّ. بارتفاع يصل إلى 1mm، وقطر 7 ìm، تفرُّعات بُنِّيَة كاذبة المحور، الأكياس البوغية كُرويَّة إلى شبه كُرويَّة تصل إلى 60 ìm في القطر، وأغشية موزَّعة. العويمدات بيضويّة إلى كُمَّثرية نوعاً ما، تصل إلى 25 x 28 ìm مع بعض النتوءات. أبواغ سبورانجية شفّافة ناعمة الجدران شبه كُرويَّة إلى إهليلجيّة بقطر 3-4 ìm. والأبواغ الزيجية (متشابهة الثالوس) كُرويَّة مضغوطة إلى حدٍ ما (50 ìm) بلون بُنِّيّ مُحمَرّ بدايةً ثُمَّ بُنِّيّ مُسوَدّ، بمُعلِّقين متساويين. الفطر غير مُستقلِب للسكروز، مشروط بالثيامين.

ويحدث النموّ لمستعمرات *R. miehei* النامية لمُدَّة 4 أيام ضمن المدى الحراري 24-55℃، أمَّا عند الدَّرجات 21 °C، و57 °C فإنَّ النموّ لا يُذكر. يحدث تطور سبورانجي ضمن المجال 24-50℃ على الرّغم من ضعفه عند الدرجة 50 ℃ كما هو بطئ أيضاً في المجال 24-27℃. ويحدث إنتاج للأبواغ الزيجية ضمن المجال 27-40℃ على الرّغم من ضعفه عند 27℃، ويتكوَّن القليل من الأبواغ الزيجية عند 24℃ بعد 6 أيام من النموّ.

وتبدو المستعمرات النّامية للفطر في ضوء الشمس أقل ضُعفاً بسبب تكوُّن عدد أقل من الأبواغ الزيجية. ولا يقوم الفطر بتمثيل السكروز، إذ لم يكن لإضافة السكروز بالتراكيز 20–40% إلى بيئة beerwort agar أيّ أثر ملحوظ في النموّ والتطور السبورانجي، بينما كان لإضافة السكروز بالتركيز 40% أثر في غياب الأبواغ الزيجية. أمَّا في بيئة تشابك آجار (Czapek agar) المحتوية 30 g سكروز\L، فكانت المستعمرات أقل كثافة بشكل ملحوظ عمّا هو عليه في بيئة beerwor agar. ويعتمد الفطر في نموِّه على الثيامين إذ يؤدّي غياب الثيامين في بيئة SMA (Synthetic Mucor agar) إلى تَوسُّع ضئيل للمستعمرات وعدم تشكُّل الأبواغ الزيجية (Schipper, 1978, 59). وقد عُرِفَ الفطر *R. miehei* بإنتاجه المرتفع لأنزيمات الليباز إلى جانب البروتياز (Takó *et al.*, 2015, 355). وتُبيِّن الأشكال 1، و2 حاملات الأكياس البوغية، العويمدات، الأكياس البوغية، والأبواغ السبورانجية والزيجية للفطر *R. miehei*.



الشكل 1: رسم مجهري يوضح (a) حاملات الأكياس البوغية، (b) الأبواغ السبورانجية، (c) الأبواغ الزيجية للفطر *R.miehei* (De Hoog, 2000, 95)



الشكل 2: صورة مجهرية توضّح (a-c) حاملات الأكياس البوغية، (d) عويمد، (e,f) كيس بوغي ناضج، (g,h) أبواغ سبورانجية، (i) بوغة زيجية للفطر *R. miehei*. (De Hoog, 2000, 96)

2-3- التخمُّرات:

يُشير مصطلح التخمُّر وفق التعريف الأساسي في الكيمياء الحيويَّة إلى التفاعلات الحيويَّة اللاهوائية، لكن اتَّسَعَ هذا المفهوم ضمن المعنى الصناعي الأوسع ليشمل جميع التفاعلات الحيويَّة سواء كانت تتم بوجود الأوكسجين أو غيابه. ويوفِّر تطبيق تقنية التخمير مدى واسع من المُنتَجات ذات الأهمِّيَّة التطبيقية الواسعة (Katoh *et al*., 2015, 191).

عُرِفَ التخمُّر أو التخمير منذ العصور القديمة وقبل أن يتمّ فهم المبادئ العلمية الأساسيَّة، كصناعة الخبز والخل والخمور واللبن الرّائب والأجبان. وبدأ الفهم العلمي لميكروبيولوجيا التخمُّر في منتصف القرن التاسع عشر باكتشاف لويس باستور للتخمُّر ليُأسِّس للمفهوم الأوَّلي للأنزيمات (El-Mansi *et al*., 2006, 1-3). وقد اقترح Willy Kühne لاحقاً عام 1876 التسمية "Enzyme"، الَّتي تعني بالإغريقية "داخل الخميرة" (In Yeast) (Bowden *et al*., 2003, 43). وكانت الخطوة الثانية عام 1877 بظهور أولى النظريات في التخمُّر وافتراض Moritz Traube تحفيز التفاعلات الكيميائيَّة بفعل بروتينات خاصّة ووَصفْ العمليات الكيميائيَّة الحاصلة خلال التخمُّر. وفي عام 1897 استطاع Eduard Buchner الحصول على مستخلَص خلوي من الخميرة قادر على تخمير السكر، ليتبيَّن أنَّ التَّخمُّرات هي مجموعة من التفاعلات الخلويَّة المختلفة يُحفَّز كل منها بوساطة أنزيمات مختلفة.

وقد تتابعت خطوات تطوّر التقانة الحيويَّة بدءاً من تكييف تخمُّر الخمائر لتحويل السكر إلى جليسرول بدلاً من الكحول، ثُمَّ ازدهار معاملات تخمير الأسيتون- البوتانول، واكتشاف البنسلين في أواخر عشرينيّات القرن العشرين، واكتشاف خصائصه المضادّة للبكتيريا في أوائل الأربعينيّات بالتزامن مع ظهور المفاعلات الحيويَّة ذات التحريك الميكانيكي والتحسين الوراثي للسلالات المُنتِجة للأنسولين. وتمثَّلت الخطوات التالية لتطوّر التقانة الحيويَّة في تنظيم التعبير الجيني للحموض الأمينية، وصعود وهبوط إنتاج بروتين وحيد الخلية في الفترة الأخيرة من السِّتِّينيّات. وتُعدّ التقانة الحيويَّة الحديثة نتيجة للابتكارات في التنسيل الجزيئي (Molecular Cloning) وإفراط التعبير الجيني (Over Expression) (El-Mansi *et al*., 2006, 3-8).

2-3-1- تخمُّرات الحالة الصّلبة:

تُعَرَّف تخمُّرات الحالة (المواد) الصّلبة (Solid-state (substrate) fermentations) بشكلٍ عامّ بأنَّها نموّ الكائنات الحية الدقيقة على مواد صلبة رطبة بغياب أو الغياب الجزئي للماء الحُرّ (Pandey *et al*., 2008, 3).

وتُقَدِّم تخمُّرات الحالة الصّلبة العديد من المزايا الَّتي تتفوَّق فيها على التخمُّرات السَّائلة كالإنتاجية العالية، والتركيز الأعلى نسبيَّاً للمُنتَجات النهائيّة، والتجهيزات البسيطة، وتكلفة رأس المال ونفقات الطاقة المنخفضة (Pandey *et al*., 2008, 13, 22f). بالإضافة إلى إمكانيّة استخدام المواد الخام كركائز، واستخدام مجموعة متنوِّعة من الركائز المختلفة في التركيب، والحجم، والمقاومة الميكانيكية، والمسامية، وقدرة الاحتفاظ بالماء (Krishna, 2005, 2)، تؤمِّن هذه الركائز جميع المُغذِّيات الضرورية للنموّ (Pérez-Guerra *et al*., 2003, 343f). كما تُستَهلك الركائز ببطء وبشكل تدريجي، وقد تزداد درجة إتاحة الركائز أو تبقى ثابتة خلال عمليّة التخمير بدلاً من الانخفاض المُستمرّ في التَّخمُّرات المغمورة (Wang and Yang, 2007, 473). ويُتيح المحتوى الرطوبي المنخفض والطبيعة المُركَّزة للركائز استخدام أقل للمياه وانخفاض كمِّيّة مياه الصرف الناتجة، واستخدام مساحة أقل للتخمير نظراً للتحميل الحجمي المرتفع للركائز بالمقارنة مع التَّخمُّرات المغمورة، وسهولة السَّيطرة على التلّوث وانخفاض احتمال حدوث التلّوث البكتيري، والتكلفة المنخفضة للمعاملات اللّاحقة (Wang and Yang, 2007, 473; Pandey *et al*., 2008, 23; Krishna, 2005, 2). كما تؤدِّي المساحات السَّطحيَّة البينيّة المرتفعة للركائز بالنسبة لحجم السائل إلى تحقيق مستويات أعلى من التهوية الكافية، خاصّةً لبعض العمليات الَّتي تحتاج إلى مُعدَّل أكسدة عالي ضمن عمليات الاستقلاب (Wang and Yang, 2007, 473; Pérez-Guerra *et al*., 2003, 343). ويسهل حدوث التوزيع المنتظم للّقاح ضمن الوسط عند التلقيح بالأبواغ الفطرية (Pérez-Guerra *et al*., 2003, 343f).

كما تؤمِّن التخمُّرات الصّلبة ظروفاً بيئيّة تحاكي البيئة الطبيعيَّة لنموّ الأحياء الدقيقة، خاصّةً الفطريات، الَّتي تُشَكِّل المجموعة الرئيسة من الأحياء الدقيقة المستخدمة في التخمُّرات الصّلبة (Pérez-Guerra *et al*., 2003, 343; Wang and Yang, 2007, 472)، وهذا ما يسمح بإتمام التعبير الجيني بشكل أكثر اكتمالاً، وقد يقتصر إنتاج بعض المركبات على نظام التخمير

الصّلب أو تُنتَج بجودة أقل في التخمُّرات المغمورة، كما يُعدّ العائد ثابتاً وقابل للتكرار (Wang and Yang, 2007, 473). وقد تمتاز بعض المركبات المُنتَجة باستخدام التخمُّرات الصّلبة بخواصّ مختلفة قليلاً عن المركبات المُنتَجة بوساطة التَّخمُّرات المغمورة كأن تكون أكثر استقراراً حرارياً (Wang and Yang, 2007, 473; Pérez-Guerra *et al*., 2003, 344)، كما تمتاز بمناسبتها بشكلٍ خاصٍّ لإنتاج بعض المُنتَجات كالأنزيمات المتعلِّقة بتحليل اللجنوسيللوز وغيرها من أنزيمات الحلمهة كالفيتاز والبروتياز (Illanes, 2008, 62).

ويؤخذ على التَّخمُّرات الصّلبة من ناحية أخرى بعض العيوب عند المقارنة بالتَّخمُّرات المغمورة، إذ يقتصر الاستخدام على الكائنات الحية الدقيقة القادرة على النموّ في مستويات رطوبة منخفضة، وقد يظهر التلّوث بالفطريات غير المرغوبة. وعادةً ما تتطلَّب الركائز معاملة أوَّليَّة. تحتاج الركائز إلى مُعدَّل تلقيح مرتفع، كما أنَّ فترات الاستنبات أطول مما هو عليه في التخمُّرات المغمورة، خاصّةً الأطوار التمهيدية. كما أنَّ طبيعة المادة الصّلبة تجعل من الصَّعب مراقبة العوامل المُتغيِّرة خلال سير المعاملات كالـ pH، والمحتوى الرطوبي، والأوكسجين، والركائز، والكتلة الحيويَّة (Pérez-Guerra *et al*., 2003, 344). بالإضافة إلى التَّراكم الحراري الناتج عن الاستقلاب وصعوبة إزالته خاصّة في المُخمِّرات الكبيرة، نظراً لصعوبة الانتقال الحراري والكتلي، وتراكيز المواد الصّلبة المرتفعة وانخفاض المحتوى الرطوبي، وضعف التوصيل الحراري لمعظم الركائز الصّلبة، والطبيعة السَّاكنة لنظام التخمير الصّلب، والتدرُّجات الحراريَّة بسبب وجود المحتوى الرطوبي الداخلي بالارتباط مع توفُّر الفراغات البينيّة، ما قد يؤدِّي إلى فقدان النشاط الفطري، والتخريب الحراري للأنزيم فقد تصل نسبة الأنزيمات المُخرَّبة إلى 85% في بعض الظروف (Wang and Yang, 2007, 473f; Krishna, 2005, 5). كما يمكن أن يكون التحريك الميكانيكي شديد الصعوبة، إذ يقتصر الانتقال الكتلي على الانتشار (Pérez-Guerra *et al*., 2003, 344). وغالباً ما تكون رُشاحة المزرعة الصّلبة الحاوية على المُنتَجات ذات طبيعة لزجة. هذا ولم يتَّضح بعد العديد من الجوانب العلمية والهندسية الهامة، كما أنَّ المعلومات حول تصميم المفاعلات وإدارتها على النطاق الواسع نادرة (Pérez-Guerra *et al*., 2003, 344).

2-3-2- تخمُّرات الحالة السَّائلة:

تُعرَّف تخمُّرات الحالة (المواد) السَّائلة (Liquid-State (Substrate) Fermentations) بأنَّها نموّ الأحياء الدقيقة في وسط سائل يحتوي على المُغذِّيات اللّازمة للنموّ. وتستخدم فيه ركازة سائلة أو مرق يحتوي على المُغذِّيات بصورة مُنحلّة أو مُعَلَّقة (Sumantha *et al*., 2006, 213; Subramaniyam and Vimala, 2012, 480). وتُطَبَّق معاملات التخمير السائل وفق الطريقتين السَّطحيَّة (Liquid Surface Fermentation)، والمغمورة (Submerged Fermentation) (Harvey and McNeil, 1994, 150).

ويتمّ إنتاج الأنزيمات الميكروبية بشكل رئيسي باستخدام التَّخمُّرات المغمورة (Illanes, 2008, 62; Dos Santos Bazanella, 2014, 263) لسهولة التعامل والتحكُّم بشكل أكبر في العوامل البيئيّة مثل درجة الحرارة ودرجة الحموضة كما تكون عمليات التهوية والخلط وإزالة الحرارة أسهل بكثير ممّا هي عليه في التَّخمُّرات الصّلبة، وسهولة التحكُّم في مُعدَّل النموّ كما يكون النموّ أسرع في المرق السائل، وسهولة فصل الخلايا عن الوسط، وإمكانيّة الحصول على دفعات مُتجدِّدة من المزارع باستخدام مفاعلات مُخصَّصة للحدّ من المشاكل المتعلِّقة بالنموّ، وتوفُّر المُغذِّيات بشكل مُنحلّ ومتاح وموحَّد للميكروبات، كما تتيح التحكُّم الدقيق بمكوِّنات الوسط وتراكيزه وإضافة بعض المُركَّبات، خاصّةً العوامل المُحفِّزة لتكوين المُنتَج كالعناصر النادرة (Piscitelli *et al*., 2014, 121; Dos Santos Bazanella, 2014, 263). وقد يؤخذ عليها بعض العيوب مثل ارتفاع التكلفة الأوَّليّة وتكاليف التشغيل وأوساط النموّ، والاستهلاك المرتفع للماء وارتفاع إنتاج مياه الصَّرف، وزيادة احتمالية التَّلوّث وضرورة التَّعقيم نظراً للفعاليّة المائية المرتفعة، وتشكيل الرَّغوة (Gaur *et al*., 2017, 240)، وحدوث بعض الظواهر مثل الكبح بنواتج هدم الكربون أو النتروجين (Catabolite Repression) (Viniegra-González *et al*., 2003, 166). ورغم المزايا العديدة للتخمُّرات الصّلبة تبقى التخمُّرات المغمورة هي التكنولوجيا المُفضَّلة لإنتاج الأنزيمات في معظم الحالات (Illanes, 2008, 62). ويُنتِج معظم المُصنِّعين الأنزيمات باستخدام التخمُّرات المغمورة (Viniegra-González *et al*., 2003, 157)، وتشير شركة Chr. Hansen (n.d.، para 1) إلى أنَّ المُخثِّر MICROLANT® Supreme ذو النقاوة المرتفعة والمُنتَج بوساطة *R. miehei* يُنتَج باستخدام التخمُّرات المغمورة، كما تنتج شركة Sigma-Aldrich العديد من الأنزيمات الفطرية

باستخدام التخمُّرات المغمورة كالليباز والبروتياز من *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich [SIAL], n.d.-a, para. 7; SIAL, n.d.-b, para. 3)، والسيللولاز من *Trichoderma reesei* (SIAL, n.d.-c, para. 4)، و*Aspergillus sp.* (SIAL, n.d.-d, para. 7)، والديكستراناز من *Chaetomium erraticum* (SIAL, n.d.-e, para. 6). ووفقاً لطريقة التغذية تُنجَز التَّخمُّرات المغمورة الصناعيَّة بِعدَّة طرائق تشمل تخمرات الدفعة الواحدة (المتقطعة) (Batch Fermentations) ذات النظام المغلق، والتخمُّرات شبه المتقطعة (Fed-Batch Fermentations) المُغذّاة بشكل دوري، والتخمُّرات المستمرّة (Continuous Fermentations) المزوَّدة بالوسط المُغذّي باستمرار مع سحب المرق المُتخمِّر بنفس المُعدَّل، وتعدّ طريقتي التَّخمُّرات المتقطعة وشبه المتقطعة هي الأكثر شيوعاً، وتلائم التخمُّرات شبه المتقطعة بشكلٍ خاصّ إنتاج الأنزيمات لإمكانيّة التحكُّم بالاستجابة الاستقلابية للخلايا المُنتِجة وسهولة التنفيذ، وعلى الرّغم من المزايا الواضحة للتَّخمُّرات المستمرّة كالإنتاجية العالية والتحكُّم الأفضل بالظروف يؤخذ على هذا النمط بعض النقاط كمخاطر التلّوث والتحوُّر الوراثي (Illanes, 2008, 63; Chisti, 2014, 752).

2-3-3- العوامل المؤثِّرة في التخمُّرات:

2-3-3-1- تركيب وسط التخمير:

تحتاج الكائنات الحية الدقيقة إلى التزوّد بالمواد الخام أو العوامل المُغذِّية للحصول على الطاقة وبناء المكوِّنات الخلويَّة الجديدة. ويُظهر تركيب الخلية الميكروبية أنَّ 95% من الوزن الجاف للخلية يتكوَّن من عدّة عناصر رئيسة وهي الكربون، والأوكسجين، والهيدروجين، والنيتروجين، والكبريت، والفوسفور، والبوتاسيوم، والكالسيوم، والمغنيزيوم، والحديد. وتُسمَّى هذه العناصر بالمُغذِّيات أو العناصر الكبرى (macroelements or macronutrients)، إذ تتطلَّبها الكائنات الحية الدقيقة بكمِّيَّات كبيرة نسبيّاً. وتُمَثِّل العناصر الستة الأولى (C, O, H, N, S, P) مكوِّنات الكربوهيدرات، والدهون، والبروتينات، والحموض النَّوويّة. وتتواجد العناصر الأربعة المتبقِّية ضمن الخلية بشكل شوارد موجبة وتقوم بأدوار مختلفة، إذ يُعَدّ البوتاسيوم (K^+) ضرورياً لتنشيط عدد من الأنزيمات بما فيها الأنزيمات الداخلة في تخليق البروتينات. ويُسهم الكالسيوم (Ca^{++}) بالإضافة للعديد من الأدوار في زيادة مقاومة الأبواغ الداخلية للبكتيريا للحرارة. ويُعدّ المغنيزيوم (Mg^{++}) مُتَمِّماً أنزيمياً للعديد من الأنزيمات، ويساهم في تشكيل واستخدام الـ ATP، وثباتيّة الريبوزومات،

وتركيب الأغشية الخلويَّة. ويُشكِّل الحديد (Fe^{+2}, Fe^{+3}) جزءاً من السيتوكرومات ومُتَمِّماً للأنزيمات والبروتينات الحاملة للإلكترون (Prescott, 2002, 96).

تحتاج جميع الكائنات بما فيها الأحياء الدقيقة بالإضافة للعناصر الكبرى إلى بعض المُغذِّيات الصغرى أو العناصر النادرة. إذ تحتاج معظم الخلايا للمنغنيز والزنك والكوبالت والموليبدنوم والنيكل، والنحاس بكمِّيَّات قليلة. وقد لا تَجِد المُغذِّيات الصغرى من النموّ، لكن عادةً ما تكون جزءاً من الأنزيمات والعوامل المُتَمِّمة وتساعد في تحفيز التفاعلات والحفاظ على بنية البروتين. فعلى سبيل المثال يوجد الزنك (Zn^{+2}) في المركز الفعّال لبعض الأنزيمات، كما يساعد المنغنيز (Mn^{+2}) العديد من الأنزيمات على نقل مجموعات الفوسفات، كما يتطلَّب تثبيت النتروجين وجود الموليبدينوم (Mo^{+2})، ويُعدّ الكوبالت (Co^{+2}) أحد مكوِّنات فيتامين B12 (Prescott, 2002, 96).

وتتطلَّب الخلايا توافر عوامل النموّ بكمِّيَّات قليلة كالفيتامينات، والبيورين، والبيراميدين، والحموض الأمينية، وغالباً يمكن تصنيعها داخل الخلية. وقد تتطلَّب بعض الحالات توفيرها في الوسط عندما لا تستطيع الخلية تصنيعها، إذ تضاف بصورة نقية، ويمكن استبدالها بالشكل الخام الأقل تكلفة ويُشكِّل مستخلص الخميرة خير مثال على ذلك إذ يؤمِّن مجموعة واسعة من عوامل النموّ وأهمّها مجموعة فيتامينات B (McNeil and Harvey, 2008, 109).

ويُشكِّل مصدر الكربون عنصراً ضرورياً لإمداد الخلية بالطاقة والمادة اللازمة للنموّ وتخليق العديد من مواد الاستقلاب الأوَّليّة والثانويّة، ويبلغ متوسط تركيب خلايا البكتيريا والخمائر والفطريات من الكربون حوالي 48–50%، ويُقدَّر عائد الكتلة الخلويَّة من الكربون بحوالي 50% (McNeil and Harvey, 2008, 103-104). ويُشكِّل النتروجين حوالي 12.5% من تركيب الخلية البكتيرية و7.5% من الخمائر و6% من الفطريات. وتُحدِّد كمِّيّة النتروجين في أي وسط مقدار الكتلة الحيويَّة الَّتي يمكن الوصول إليها عند تَوفُّر المقدار الكافي من الكربون والمُغذِّيات الأخرى. ويعدّ وجود النتروجين ضرورياً للنموّ واستقلاب بعض المُركَّبات كالبروتينات والحموض النَّوويّة (McNeil and Harvey, 2008, 103, 106).

2-3-3-1-1- ركائز التخمير السائل:

يمكن تقسيم الأوساط المستخدمة في معاملات التخمير السائل بحسب التركيب إلى ثلاث فئات: أوساط صناعية (Synthetic Media)، وأوساط شبه صناعية (Semi-synthetic Media)، وأوساط مُعقَّدة التركيب (Complex Media). تتكوَّن الأوساط الصناعيَّة من مواد كيميائية معروفة التركيب والتراكيز، وغالباً ما تكون بسيطة للغاية وتحتوي على مصادر للكربون والنتروجين، والأملاح المُغذِّية، وقد يزيد تعقيد الوسط التركيبي تبعاً لمتطلَّبات ونوع نموّ الخلايا المزروعة. بينما تحتوي الأوساط شبه الصناعيَّة على واحد أو أكثر من الركائز متغيِّرة التركيب نسبيّاً كمستخلص الخميرة. وتتكوَّن الأوساط مُعقَّدة التركيب من مواد عضوية متباينة التركيب تبعاً للمنشأ وموسم الإنتاج، وتمتاز بالتكلفة المنخفضة نسبيّاً (McNeil and Harvey, 2008, 100-101). ويعتمد اختيار مصادر الكربون والنتروجين على نوع الكائن الحي الدقيق وقدرته على استهلاك المصدر، ونوع المُنتَج المرغوب من عملية التخمير، والمُدَّة المُحددَّة للاستهلاك، بالإضافة إلى تأثير المصدر النتروجيني في قيم الـ pH (McNeil and Harvey, 2008, 104-108).

أظهر Silveira وزملاؤه (2005، 933f) تأثير عدد من أوساط التخمير السَّائلة في إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* ، وأشار الباحثون إلى تفوّق الوسط الحاوي على رشيح الذُّرة (2.2 g/L) على الوسط المُركَّب من الجلوكوز (18 g/L) والكازئين (4 g/L) ومستخلص بذور القطن (4 g/L)، إذ تحقَّقَت قيم النشاط الأنزيمي 923 و666.7 (SU/mL) في وسطي التخمير على التَّوالي. كما أشار الباحثون إلى انخفاض النشاط الأنزيمي باستخدام السكروز والمولاس كمصدرين للكربون.

تُمثِّل الكربوهيدرات مصدر الكربون الرئيس في التخمُّرات رغم إمكانيّة استخدام مصادر أخرى مثل الكحوليات والألكانات والحموض العضويَّة (Zanoelo *et al*., 2014, 101). ويُعَدّ استخدام الجلوكوز كمصدر كربوني خياراً شائعاً في معاملات إنتاج البروتياز الفطري، إذ يُمثِّل مصدراً متاحاً للكربون سهل الاستقلاب، وقد تُظهِر التراكيز المرتفعة للجلوكوز تأثيراً مُثبِّطاً لإنتاج البروتياز (Sharma *et al*., 2017, 118)، وقد أظهر Ayhan وزملاؤه (2001، 153) تأثير تركيز الجلوكوز في إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* في نظام تخمير مغمور بدفعة

واحدة تحت ظروف ثابتة (pH ابتدائي 6.8، ومُعدَّل تلقيح 5.2% v/v، ودرجة حرارة 37.6℃، ومُعدَّل تحريك 81 spm). وقد تحقَّقَ أعلى نشاط أنزيمي عند تركيز ابتدائي للجلوكوز يعادل 29.6 g/dm^3، بينما انخفض النشاط الأنزيم عند التراكيز الأعلى. وفي دراسة لـ De lima وزملائه (2008، 580f) حول إنتاج البروتياز من فطر *R. miehei* في بيئة تخمير مغمور (380 rpm, 30℃, 40 hrs) تحقَّقَ أعلى نشاط تخثُّر للبروتياز (1200 SU) عند استخدام الجلوكوز بتركيز 20 g/L كمصدر للكربون بالجمع مع الكازئين بتركيز 4 g/L كمصدر آزوتي، بالمقارنة مع 631 SU عند استخدام اللاكتوز (20 g/L) كمصدر للكربون بوجود الكازئين (4 g/L). وفي دراسة لـ Beyenal وزملائه (1999، 529) حول تأثير تركيز الجلوكوز في إنتاج البروتياز من فطر *R. miehei* في نظام تخمير مغمور مستمر (400 rpm) كان التركيز 7.5 g/dm^3 هو التركيز الأمثل للجلوكوز لتحقيق أعلى نشاط تخثُّر للبروتياز.

2-3-3-1-2- الركائز الصّلبة:

يعتمد اختيار الركازة لمعاملات التخمير الصّلب على العديد من العوامل وتُشَكِّل التكلفة ومدى تَوفُّر المادة العوامل الرئيسة. ويمكن التمييز بين نوعين من أنظمة التَّخمُّرات الصّلبة اعتماداً على نوع الركازة، يتضمَّن النظام الأوَّل استخدام ركائز صلبة مغذاة بأوساط كيميائية سائلة وينحصر دور الركائز على تشكيل نقطة الارتكاز للنموّ كألياف القِنَّب، والبيرلايت، والفيرموكولايت. ويُعدّ النظام الثاني هو الأكثر شيوعاً وينطوي على استخدام ركائز طبيعيّة تؤمِّن كلاً من الدّعم الفيزيائي والعناصر المُغذِّية، وغالباً ما تكون مُنتَجات زراعية أو نواتج ثانويّة صناعيّة-زراعية (Ooijkaas *et al*., 2000, 356f). وتشترك الركائز الأخيرة بالبنية الجزيئيّة الأساسيَّة الَّتي تتكوَّن من النشاء، والسيللوز، والليجنوسيللوز، والبكتين، والبولي سكاريدات الأخرى. وقد تحتاج الركائز الخام للتحضير والمعاملة الأوَّليّة، وإضافة المُغذِّيات، وضبط الـ pH والمحتوى الرطوبي (Krishna, 2005, 6).

درَسَ Foda وزملاؤه (2012، 582) جدوى استخدام عدد من المخلَّفات الصناعيَّة-الزراعية في إنتاج البروتياز من *R. miehei* ، وقد أعطى استخدام نخالة القمح كركازة أعلى نشاط لتخثُّر الحليب (33350 SU/g Substrate) بالمقارنة مع 18450، 17150، 15000، 7000، 4600، 4400، 3900، 3600، 0، 0 ، 0 (SU/g Substrate) عند استخدام كلٍ من دقيق

فول الصويا، ودقيق الحبة السوداء، ودقيق السِّمسم، ودقيق بذور القطن، وقشور الفول السوداني، وخميرة العلف، ومسحوق بذور الكتان، وقشور الأَرُز، وقشور البرتقال، وقشور البطاطا، وقش الأَرُز على التَّوالي.

ودرس Preetha وBoopathy (1994، 39) استخدام عدد من أوساط التخمير لإنتاج البروتياز من الفطريات *R.miehei* و*R.pusillus* ، وأشار الباحثان إلى أنَّ استخدام نخالة القمح قد أعطى زيادة ملحوظة في نشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ للبروتياز المُنتَج وانحفاض مرافق في النشاط الحالّ للبروتين، إذ بلغت قيم النشاط الأنزيمي (1260 SU/mg; 140 PU/mg) و (500 SU/mg; 40 PU/mg) للبروتياز المُنتَج من كلٍ من النَّوعين على التَّوالي، بالمقارنة مع ظهور قيم النشاط الأنزيمي (550 SU/mg; 1110 PU/mg)، و (170 SU/mg; 390 PU/mg) في البروتياز المُنتَج من *R.miehei*، و (900 SU/mg; 180 PU/mg)، و(410 SU/mg; 90 PU/mg) للبروتياز المُنتَج من *R.pusillus* عند استخدام وسطي مستخلص الخميرة–جلوكوز، والبطاطا–دكستروز على التَّوالي، ولم ينتج بالمقابل أيّ نشاط يُذكَر عند استخدام أوساط الجلوكوز–ببتون، والحليب المقشود–جلوكوز، والببتون–مستخلص الخميرة.

قد تحتوي الركائز على المُغذِّيات بتراكيز أقل من الحدود المثالية أو قد يكون هناك غياب لإحدى هذه المُغذِّيات، ما يستوجب إضافة المُغذِّيات الخارجية (Pandey *et al*., 1999, 153). تُعدّ نخالة القمح الركازة الأكثر استخداماً في معاملات التخمير (Pandey *et al*., 1999, 149-152)، نظراً لملاءَمتها لظروف التخمير الصّلب، وقدرتها العالية على الاحتفاظ بالماء، والمسامية الكافية لتبادل الغازات، والمحتوى المرتفع من الكربون والمُغذِّيات الأخرى (Taşkın and Eltem, 2008, 204)، إذ تحتوي على 65% كربوهيدرات، و16% بروتين، بالإضافة إلى الكالسيوم، والحديد، والمغنيزيوم، والفوسفات، والبوتاسيوم، والصوديوم، والزنك، والفيتامينات B1, B2, B3, E, K ، واللبيبيدات (USDA, 2019b)، بالإضافة إلى الكلفة الاقتصادية المنخفضة.

أظهر Khademi وزملاؤه (2013، 119–117) تأثير تركيب وسط التخمير في إنتاج البروتياز من فطر *R. miehei*. وقد بيَّن الباحثون أنَّ استخدام نخالة القمح كركازة منفردة قد أعطى أعلى إنتاج للبروتياز (5100 SU/g Substrate) بالمقارنة مع نخالة القمح المُدعَّمة بنسبة 10% بكلٍ من دقيق الذُّرة، ودقيق القمح، ودقيق الفول السوداني، ودقيق الأرُّز، ودقيق جوز الهند، إذ بلغ نشاط تخثُّر الحليب للأنزيم الناتج عن هذه الأوساط 4850، 4750، 4500، 3750، 2600 (SU/g Substrate) على التَّوالي. وأشار الباحثون إلى ازدياد النشاط الأنزيمي بإضافة بعض المصادر النقية من الكربوهيدرات، إذ أعطت إضافة كلٍ من الجلوكوز، والنشاء المُنحلّ،

واللاكتوز بنسبة 1 % قيمة أعلى لنشاط تخثُّر الحليب، قُدِّرت بـ 5600، و5500، و5250 (SU/g Substrate) على التَّوالي، بينما ظهر انحفاض في النشاط الأنزيمي عند إضافة السكروز، والجالاكتوز، واللاكتوز إذ بلغ نشاط التخثُّر 5000، 4900، 4800 (SU/g Substrate) على التَّوالي. كما درس الباحثون تأثير عدد من المصادر النتروجينية في إنتاج البروتياز، إذ أعطت إضافة الكازئين بنسبة 1.5 % أعلى مردود لنشاط التخثُّر (7100 SU\g Substrate)، تلتها إضافة مستخلص الخميرة بنسبة 1.5% إذ بلغ مردود النشاط 6300 SU/g Substrate، ثُمَّ الألبومين، فمسحوق الحليب المقشود بنسبة 1%. بينما كان لإضافة الجيلاتين، والببتون بنسبة 1% أثر سلبي في النشاط الأنزيمي. وأشار الباحثون إلى عدم تأثير إضافة الكازئين بنسب 2-5% في النشاط الأنزيمي، وظهور الأثر السلبي للإضافة "10%" في النشاط الأنزيمي، كما كان لإضافة المصادر غير العضويَّة (اليوريا، نترات النتريوم، سلفات الأمونيوم، أستات الأمونيوم) بنسبة 0.5% أيضاً أثر سلبي في النشاط الأنزيمي. كما أشار الباحثون إلى عدم تأثير إضافة العناصر المعدنية (Mg^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}) في النشاط الأنزيمي منفردة أو مجتمعة ضمن التراكيز 0.001-100 mg/L، وعزا الباحثون ذلك إلى احتوء نخالة القمح على الكمِّيَّات الكافية من هذه المُغذِّيات.

ودرس Thakur وزملاؤه (1990a، 18f) تأثير إضافة عدد من المصادر الكربونية مُعقَّدة التركيب (دقيق القمح، دقيق الأَرُزّ، دقيق الذُّرة، ودقيق التبيوكة) بنسب مختلفة إلى وسط التخمير (نخالة القمح) في إنتاج أنزيم البروتياز من فطر *R. miehei*، إذ حفَّزت جميع الإضافات الإنتاج الأنزيمي وتفوَّقت إضافة دقيق القمح بنسبة 10%، وقد قُدِّر عائد نشاط التخثُّر بـ 34000 SU/g" "Substrate. أما إضافة النشاء المُحَلمَه حمضياً أو أنزيمياً فقد ثبَّط الإنتاج الأنزيمي. وعزا الباحثون ذلك إلى دور الجلوكوز في حدوث الكبح بنواتج الهدم. كما أظهر الباحثون تأثير المصادر النتروجينية في إنتاج البروتياز، إذ أضيفت المصادر غير العضويَّة بما يُحقِّق تركيز 0.5% w/w للنتروجين في وسط التخمير، وقد أعطى وجود نترات الصوديوم واليوريا عائداً أنزيمياً منخفضاً للغاية، في حين حفَّزت نترات الأمونيوم نموّ جيِّد وتكوين أنزيمي معتدل. وقد حفَّزت المصادر العضويَّة تكوين عائد أنزيمي جيد عند إضافتها بتراكيز 1% w/w، وحقَّقت إضافة الجيلاتين أعلى نشاط أنزيمي (40287 SU\g Substrate)، تلتها إضافة مسحوق الحليب المقشود، ومسحوق فول الصويا، ومسحوق الفول السوداني على التَّوالي. وقد أعطت التراكيز الأعلى لمسحوق الحليب المقشود زيادة في النشاط الأنزيمي وصولاً إلى 42900 SU\g Substrate عند

تركيز 5% بينما تناقص النشاط الأنزيمي بزيادة تراكيز إضافة الجيلاتين عن 1%. وقد أظهر Foda وزملاؤه (2012، 583f) تأثير إضافة المصادر النتروجينية المختلفة إلى وسط التخمير في إنتاج البروتياز من *R. miehei* ، فقد أعطت إضافة مسحوق مصل الجبن بنسبة 2% أعلى عائد لنشاط التخثُّر (48600 SU/g Substrate)، تلاها إضافة الحليب المقشود بنسبة 3%، ثم الكازئين (2%)، وتحقَّقَ العائد 42850، و39200 (SU/g Substrate) على التَّوالي، كما كان للتراكيز المرتفعة للكازئين تأثير مُثبِّط لتكوين الأنزيم، وأدَّت عملية الإضافة بنسبة 10% إلى تثبيط النشاط الأنزيمي. وأشار Preetha وBoopathy (1994، 40) إلى زيادة النشاط الأنزيمي للبروتياز المُنتَج من فطر *R. miehei* بمقدار 2 ، و3.5 أضعاف لكلٍ من نشاط تخثُّر الحليب (MCA) والنشاط الحالّ البروتين (PA) على التَّوالي، عند إضافة مسحوق الحليب المقشود بنسب تصل إلى 2% إلى وسط التخمير الصّلب مع ثبات النسبة MCA/PA بالمقارنة مع الشاهد. كما أشار الباحثون إلى ازدياد نسبي في النسبة MCA/PA للبروتياز المُنتَج من *R. pusillus* بإضافة مسحوق الحليب المقشود عند نسب إضافة تصل إلى 2%.

يرتبط حجم جزيئات الركائز بخواصّ الركازة الأخرى كنسبة المساحة السَّطحيَّة/الحجم، الَّتي تُحدِّد الجزء من الركازة الَّذي يمكن الوصول إليه في بداية التخمير من قِبل الأحياء الدقيقة (Krishna, 2005, 6)، وتؤمِّن الجزيئات ذات النسبة المرتفعة (للمساحة السَّطحيَّة بالنسبة للحجم) سطحاً كبيراً نسبيّاً للنشاط الميكروبي (Chisti, 2014, 758). وتزداد هذه النسبة كلما انخفض حجم الجسيم. كما يؤثِّر حجم الجزيئات في كثافة التعبئة، ما يؤثِّر في قدرة نظام التخمير على تحقيق الانتقال الحراري والكتلي. إذ يُحدِّد حجم الجسيمات حجم الفراغ الَّذي يشغله الهواء، وبالتالي مُعدَّل نقل الأكسجين والتأثير في النموّ. يساعد حجم الجزيئات الأصغر في الانتقال الحراري وتبادل الأوكسجين وثاني أكسيد الكربون ما بين الهواء وسطح الركائز ضمن الكتلة السَّطحيَّة. وتوفِّر الجسيمات الأكبر حجماً كفاءة أكبر في التنفس والتهوية الداخلية، لكنّها توفِّر سطحاً محدوداً للعمل الميكروبي (Krishna, 2005, 6). وفي المقابل تُعَدّ الجزيئات ذات الحجم والشكل بالغ الصغر، الَّتي يمكن أن تُحزَم معاً بإحكام (المكعبة، والمسطحة، والرقائق) غير مرغوبة نظراً للتعبئة المُحكمة، ما يُقلِّل من الفراغات البينيّة اللازمة للتهوية (Chisti, 2014, 758). وقد أظهر Foda وزملاؤه (2012، 584) تأثير حجم جزيئات الركازة (نخالة القمح) في إنتاج البروتياز من

فطر *Rhizomucor miehei*. وقد تمَّ تحقيق زيادة 16% في نشاط تخثُّر الحليب عند استخدام جزيئات من نخالة القمح بحجم أكبر من 300 µm، وانخفضت هذه النسبة بانخفاض حجم الجزيئات، إذ لم يعطِ استخدام جزيئات بحجم 75 µm أيّ نشاط يذكر.

2-3-3-1-3- المحتوى الرطوبي للركازة الصّلبة:

تتطلَّب أهمِّيَّة المحتوى الرطوبي والفعاليّة المائية النظر في الكمِّيَّات الدقيقة من الماء المضافة إلى الركازة. إذ يميل المحتوى الرطوبي المنخفض للحدّ من انتشار المُغذِّيات، والنموّ الميكروبي، والاستقرار الأنزيمي، وانتفاخ الركازة. بينما تؤدي مستويات الرطوبة المرتفعة إلى تكتل الجزيئات، والحد من انتشار الغازات، ومنافسة البكتيريا (Krishna, 2005, 4). ويختلف المحتوى الرطوبي الَّذي تتشكَّل فيه الرطوبة الحُرَّة بحسب الركازة، إذ يلاحظ الماء الحر في قشور الأشجار عند المحتوى الرطوبي 40%، ويظهر في الأَرُز والكاسافا عند تجاوز المحتوى الرطوبي 50-55%، ويظهر الماء الحرّ في الركائز اللجنوسيللولوزية قبل الوصول إلى المحتوى الرطوبي 80% (Raimbault, 1998, 15). ويتراوح المحتوى الرطوبي بشكلٍ عامّ في معاملات التخمُّرات الصّلبة في المجال 30-85% بالنسبة للبكتيريا و20-70% في حالة الفطريات (Krishna, 2005, 4).

أشار Thakur وزملاؤه (1990b، 411) إلى أنَّ المحتوى الرطوبي "70%" لوسط التخمير قد أعطى أعلى نشاط أنزيمي للبروتياز المُنتَج من فطر *Rhizomucor miehei* عند استخدام نخالة القمح كركازة أساسية. وأشاروا أيضاً إلى انخفاض ملحوظ في النشاط الأنزيمي عند المستويات الأعلى للرطوبة. وأظهرت دراسة لـ Preetha وBoopathy (1994، 39) أنَّ ترطيب وسط التخمير (نخالة القمح) بمُعدَّل 1:0.6 (W:V)، أعطى أكبر قيمة لنسبة النشاط الأنزيمي (MCA\PA) للبروتياز المُنتَج بوساطة الفطريات *Rhizomucor miehei, Rhizomucor pusillus* . بينما أظهر Khademi وزملاؤه (2013، 120)، وFoda وزملاؤه (2012، 582) أنَّ المحتوى الرطوبي 50% لوسط التخمير (نخالة القمح) هو المحتوى الأمثل للحصول على أعلى إنتاج من البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* .

2-3-3-2- الرقم الهيدروجيني (pH):

يَبرُز دور الـ pH كعامل مُحدِّد للنموّ والبقاء الميكروبي بطرائق مختلفة، إذ يُحدِّد نشاط البروتونات، الَّتي تُعدّ العامل الرئيس في تفاعلات الأكسدة والاختزال، كما يُؤثِّر في درجة الإتاحة البيولوجية للمُغذِّيات والعناصر النادرة، وغيرها من التفاعلات الحاصلة في بيئة النموّ. بالإضافة إلى تأثيره في نشاط الأنزيمات الخارجيّة. كما ينعكس تأثير الـ pH في تفاعلات الأكسدة والاختزال على الأنشطة الاستقلابية الميكروبية كالتنفُّس الخلوي (Jin and Kirk, 2018, 1f). ويشغل كل نوع من الأحياء الدقيقة مجال معين من الـ pH خاص بنموِّه ونشاطه مع قيم مثالية ضمن هذا المجال، إذ تُظهِر الفطريات الخيطية استجابة جيدة للنموّ ضمن نطاق واسع (pH 2-9 مع مدى مثالي (pH 3.8-6.0) (Krishna, 2005, 5). وقد أشار Şeker وزملاؤه (1998، 472) إلى تأثُّر نموّ فطر *Rhizomucor miehei* وإنتاجه للبروتياز في نظام تخمير سائل مستمرّ تبعاً لقيم الـ pH في وسط التخمير، إذ لم يظهر نموّ ملموس للكتلة الخلويَّة وأيّ نشاط يذكر لتخثُّر الحليب عند الضّبط المستمرّ للـ pH عند القيم 4 و8، بينما ازداد نشاط التخثُّر ضمن المجال]4 ، 8[، حيث تحقَّقَ أعلى نشاط تخثُّر عند pH 6.8. وأشار Silviera وزملاؤه (2005، 935) إلى أنَّ ضبط الحموضة الابتدائية لوسط التخمير السائل عند pH 5.3 قد أعطى أنزيمات بروتياز من *Rhizomucor miehei* بنشاط تخثُّر للحليب أعلى منه عند القيم (pH 4, 4.5). كما أشار Bailey و Siika-aho (1988، 163) إلى أنَّ الضبط الابتدائي لحموضة المزرعة المغمورة لفطر *Rhizomucor miehei* عند درجة pH 5، قد أعطى نتائج أجدى في إنتاج البروتياز منه عن الضبط عند درجتي pH 5.5 و4.5. بينما أشار Mujica وزملاؤه (2020، 3201) إلى أنَّ ضبط الحموضة الابتدائية لوسط التخمير السائل لـ *Rhizomucor miehei* عند pH 4، أعطى نشاط تخثُّر للبروتياز أعلى منه عند الضّبط عند pH 6.

قد تتغيَّر قيم الـ pH تبعاً للأنشطة الاستقلابية كإفراز الحموض العضويَّة أو استهلاكها في وسط التخمير، أو بفعل الأثر الناتج عن حلمهة المصدر النتروجيني (Krishna, 2005, 5). درس Beyenal وزملاؤه (1999، 530) تغيُّر الـ pH لوسط النموّ لفطر *Rhizomucor miehei* خلال سير عملية التخمير المغمور، وأشاروا إلى انخفاض في قيم الرقم الهيدروجيني الابتدائي (pH 6.8) بشكل متناسب مع كمِّيّة الجلوكوز في مزارع الدفعة الواحدة غير مُنظمَّة الحموضة،

والانخفاض إلى أدنى مستوى (pH 2.7) عند التراكيز الابتدائية الأعلى من الجلوكوز. وأشاروا إلى وصول الرقم الهيدروجيني إلى pH 4.8-5.2 في المزارع المستمرة، وهو المدى الَّذي يُحقِّق أقل نسبة لفقدان النشاط الأنزيمي، ولاحظوا إنتاج أنزيمي مستقرّ للبروتياز لمُدَّة طويلة عند إضافة التراكيز المتوسطة المناسبة من الجلوكوز رغم عدم الضّبط المستمرّ للـ pH خلال التخمير. كما أشار الباحثون إلى الأثر السّلبي للضّبط المستمرّ للـ pH في نموّ المزرعة وإنتاجها للبروتياز إذ تأثَّرت المؤشِّرات بعد 48-72 hrs من إضافة NaOH. وقد أشار Ayhan (2001، 157f) إلى الوصول إلى أعلى نشاط للبروتياز من *Rhizomucor miehei* عند الضّبط الابتدائي للـ pH في وسط التخمير السائل عند pH 6.8، بالمقارنة مع باقي القيم ضمن المجال (pH 5.7-7.5).

2-3-3-3- درجة الحرارة:

تُمثِّل درجة الحرارة العامل الأكثر أهمِّيَّة بين العوامل الفيزيائيَّة المؤثِّرة في أداء التخمُّرات، خاصّةً التخمُّرات الصّلبة نظراً لحساسيَّة النموّ وإنتاج الأنزيمات أو نواتج الاستقلاب لدرجة الحرارة. وكما هو الحال في قيمة الرقم الهيدروجيني، فإنه يمكن للفطريات النموّ ضمن نطاق واسع من درجات الحرارة (20-55 ℃)، وتكمن أهمِّيَّة درجة الحرارة في تطوّر العمليات البيولوجية في أنَّها تُحدِّد بعض التأثيرات الهامّة كتخريب البروتين، وتثبيط الأنزيمات، وتثبيط أو تسريع إنتاج مُستقلَب معيَّن، بالإضافة إلى موت الخلايا (Krishna, 2005, 5).

درس Streets و Ingle (1972، 975) تأثير درجات الحرارة (30, 37, 40, 42.5, 45, 48 ℃) في نموّ فطر *Rhizomucor miehei* في بيئة تخمير مغمور. وأشارا إلى تَحقُّق أقصى نموّ عند درجة حرارة 48 ℃. ولم يحدث أيّ إنبات للأبواغ عند الدَّرجات 36.7 و 53.5 ℃ خلال 8 ساعات، وكانت درجة الحرارة 45 ℃ هي الدرجة المثالية لإنبات الأبواغ. وحدث النموّ عند الدَّرجات الحدِّية (20, 25 ℃) عندما تمَّ إنبات الأبواغ مسبقاً عند الدرجة 37 ℃. وتجدر الإشارة إلى أنَّ درجة الحرارة المثالية للنموّ غالباً ما تُظهِر اختلافاً عن الدرجة المثالية للإفراز الأنزيمي، والنهج الواضح في هذه الحالة هو تنفيذ المعاملة على مرحلتين بحيث تُقارب درجة الحرارة الأوَّليّة الدرجة المثالية للنموّ، لتُعدَّل الحرارة إلى الدرجة المثالية لتكوين المُنتَج في المرحلة اللّاحقة (Harvey and McNeil, 1994, 165). وقد أشار Khademi وزملاؤه (2013، 119f) إلى ازدياد نموّ الفطر *Rhizomucor miehei* وإنتاجه للبروتياز بارتفاع درجة الحرارة عن 25 ℃ وصولاً إلى أعلى

نشاط أنزيمي عند 42℃، ثُمَّ انخفاض النشاط الأنزيمي عند الدَّرجات الأعلى وصولاً لتثبيط كامل عند 52℃. كما أشار Thakur وزملاؤه (1990b، 411) إلى الحصول على أعلى عائد لنشاط التخثُّر للبروتياز من *Rhizomucor miehei* في وسط تخمير صلب عند درجة حرارة 42℃، والانخفاض في إنتاج البروتياز عند درجات الحرارة الأعلى والأكثر انخفاضاً. وفي دراسة أخرى لـ Foda وزملائه (2012، 582f) أعطى الفطر *Rhizomucor miehei* أعلى عائد لنشاط التخثُّر للبروتياز عند درجة حرارة 40℃، وكان لانخفاض وارتفاع درجات الحرارة تأثير سلبيّ في العائد الأنزيمي. بينما أشار Bailey و Siika-aho (1988، 163) إلى الحصول على أفضل إنتاج للبروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* في نظام تخمير مغمور عند درجة الحرارة 30℃. وأشار Ayhan وزملاؤه (2001، 157) إلى الحصول على أعلى نشاط لتخثُّر الحليب للبروتياز من *Rhizomucor miehei* في نظام تخمير مغمور بدفعة واحدة بظروف ثابتة عند درجة الحرارة 37.6℃.

2-3-3-4- نظام التهوية والتحريك:

تُحقِّق التهوية تزويد الأحياء الدقيقة بالأوكسجين وإزالة ثاني أوكسيد الكربون، وبخار الماء، والمكوِّنات المتطايرة الناتجة عن عمليات الاستقلاب، بالإضافة إلى إزالة الحرارة المتراكمة، خاصّةً في نظام التخمير الصّلب. كما يلعب نظام التحريك دوراً هاماً في مجانسة بيئة النموّ، والتزويد بالأوكسجين، والتوزيع الحراري، (Zhou *et al*., 2018, 4, 8; Pérez-Guerra *et al*., 2003, 346). ومن جهة أخرى فقد تؤدِّي سرعات التحريك المرتفعة إلى زيادة قوى القصّ في مرق التخمير ما قد يؤدِّي إلى تقطيع الميسيليوم، والإضرار بالبنية الخلويَّة، وتباين النموّ، والتأثير في تكوين المُستقلبَات، والتوليد الحراري (Zhou *et al*., 2018, 4,8). كما قد يَحول التحريك من دون ارتباط الهيفات الفطرية بالركائز الصّلبة ضمن كتلة واحدة. وقد يؤدِّي إلى الإضرار بهذه الهيفات (Mitchell *et al*., 2006, 91). كما أنَّ تحقيق انتشار المُغذِّيات في نظام التخمير الصّلب ليس بالأهمِّيَّة البالغة بالنسبة للفطريات بسبب الاختراق الجيِّد للميسيليوم للركائز الصّلبة (Pérez-Guerra *et al*., 2003, 346). وقد أظهر Ayhan وزملاؤه (2001، 158f) تأثير مُعدَّل التحريك (67-120 spm) في إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* في نظام التخمير المغمور ذي الدفعة الواحدة تحت ظروف ثابتة، إذ تشكَّل النموّ الفطري بالقرب من سطح وسط التخمير

بشكل كُريّات كبيرة وأعطى نشاطاً أنزيمياً متوسطاً عند سرعات التحريك المنخفضة، بينما أعطت سرعات التحريك المرتفعة نشاطاً أنزيمياً منخفضاً، وكان حجم الكُريّات الفطرية أقل مما هو عليه في باقي المعاملات، كما ازداد مُعدَّل استهلاك الجلوكوز الأوَّلي بشكل متناسب مع زيادة مُعدَّل التحريك نتيجة لارتفاع مُعدَّل نقل الجلوكوز، وتحقَّقَ أعلى نشاط أنزيمي عند مُعدَّل تحريك 81" spm" بعد 167 hrs. وأشار Mujica وزملاؤه (2020، 3201) إلى الوصول إلى أعلى نشاط أنزيمي (667 SU/mL) للبروتياز من *Rhizomucor miehei* بعد 72 hrs من التحضين عند درجة حرارة 37 °C عند تحريك وسط التخمير السائل بسرعة "300 rpm" بالمقارنة مع النشاط الحاصل عند التحريك عند مُعدَّل "200 rpm" تحت الظروف نفسها، كما أشار الباحثون إلى الأثر المعنوي لتفاعل عوامل الـ pH، وزمن التحضين، وسرعة التحريك في نشاط التخثُّر.

2-3-3-5- زمن التخمُّر وحركيَّة النموّ للمزارع الميكروبية:

تظهر الأطوار المختلفة لمنحني نموّ الخلايا الميكروبية أو ما يُسمَّى بدورة النموّ في حال نموِّها في نظام مغلق. وتبدأ بالطور التمهيدي أو طور الركود (Lag Phase)، الَّذي قد لا يظهر في جميع الحالات (Macauley-Patrick and Finn, 2008, 71). ويكاد يكون النموّ النَّوعيّ في هذا الطور معدوماً من الناحية العملية ($\mu \approx 0$)، إذ لا تبدأ الكتلة الخلويَّة الميكروبية بالانقسام في هذه المرحلة (Rodriguez-Leon *et al*., 2013, 184)، ويقتصر النموّ على الزيادة في الوزن والحجم. ويُعزى الدخول في هذه المرحلة إلى التكيُّف الفيزيولوجي للخلية مع ظروف المزرعة. وقد ينطوي ذلك على شرط زمني لتخليق رنا مرسال معين (mRNA) وتخليق البروتينات اللازمة لتلبية متطلَّبات المزرعة الجديدة. وقد تعود هذه المرحلة أيضاً إلى الكثافات المنخفضة للكائنات الحية الدقيقة، الَّتي تؤدّي إلى التخفيف من الأنزيمات الخارجية والمُغذِّيات المفرزة من الخلايا النّامية، وعادةً ما يتمّ تشارك هذه المواد من قبل الخلايا المتجاورة. وفي حال انخفاض كثافة الخلايا تقل تراكيز هذه المواد ويصعب تناولها. ونتيجة لذلك يتباطأ نموّ وانقسام الخلايا وانتقالها إلى المرحلة الأُسِّية. يدوم الطور التمهيدي من دقائق إلى ساعات عديدة. ويمكن التحكُّم في امتداد هذا الطور إلى حدٍ ما لاعتماده على نوع الوسط وحجم اللّقاح الأوَّلي (Maier and Pepper, 2015, 38f). ويفضَّل اختصار هذه المرحلة في معاملات التخمير لاختصار الوقت

والتكلفة بتحضير اللّقاح في وسط مماثل تحت ظروف بيئيّة مشابهة واستخدام لّقاح بحجم لا يقل عن 5% من خلايا نامية بالطور اللوغاريتمي (Macauley-Patrick and Finn, 2008, 71).

وتبدأ الخلايا بالنموّ (من حيث الانقسام) بسرعة خلال طور النموّ المتسارع (accelerated growth phase) وذلك بتكوين خلايا جديدة، ويزداد مُعدَّل النموّ النَّوعيّ خلال هذا الطور ($\mu >$ 0). وتُعدّ الفترة الزمنية لهذه المرحلة قصيرة نسبيّاً بالمقارنة مع العملية بأكملها (Rodriguez-Leon *et al*., 2013, 184).

وتنتظم سرعة الانقسام خلال الطور اللوغاريتمي أو الأُسِّي (logarithmic or exponential growth phase) ويتميَّز هذا الطور بثبات مُعدَّل النموّ النَّوعيّ خلال كامل المرحلة، ويُعَدّ مُعدَّل النموّ اللوغاريتمي النَّوعيّ أعلى مُعدَّل نموّ نوعيّ يمكن تحقيقه خلال مرحلة التخمُّر (Rodriguez-Leon *et al*., 2013, 184). كما يمكن تسجيل أقصر وقت جيل في هذا الطور (Maier and Pepper, 2015, 40). وتكون الخلايا في أفضل أطوار النشاط الفيزيولوجي وتكون قادرة على تحويل مصادر الكربون إلى سلائف بيولوجية تتمثَّل بشكلٍ عامّ بـ ATP، PEP، وتدرُّج البروتون. وتدخل هذه السلائف في مسارات بيولوجية مختلفة للتخليق الحيوي لمختلف المواحيد (Monomers) (الحموض الأمينية، والنوكليوتيدات، والحموض الدهنية، والسكريات)، الَّتي تتبلمر بدورها لإعطاء البوليمرات المطلوبة (البروتينات، والحموض النَّوويّة، والحموض الريبيّة، والدهون) اللازمة لتكوين الكتلة الحيويَّة الجديدة (El-Mansi *et al*., 2006, 17).

يؤدِّي ازدياد الكتلة والأعداد الخلويَّة خلال الطور اللوغاريتمي إلى الانخفاض التدريجي للمُغذِّيات وتراكُم نواتج الاستقلاب في وسط النموّ، ما يؤدِّي إلى الدخول في طور النموّ المتباطئ (Decelerated growth phase)، إذ يبدأ مُعدَّل تكوين الكتلة الحيويَّة بالتباطؤ في هذه المرحلة (El-Mansi *et al*., 2006, 24; Rodriguez-Leon *et al*., 2013, 184).

ويؤدِّي استنفاذ المواد المغذية وزيادة نسبة المُثبِّطات كالمُنتَجات المُفرَزة (كالإيثانول، وحمض اللاكتيك، وحمض الخليك، والميثانول، والمركبات العطرية)، الَّتي قد تكون سامّة في المزارع ذات الكثافة العالية، إلى انخفاض مُعدَّل النموّ إلى الصفر لتبدأ بعض الخلايا بالموت. وتُسمَّى هذه المرحلة بطور ثبات النموّ (Stationary growth phase) (Macauley-Patrick and Finn, 2008,

(71f. وتحصل حالة من التوازن ما بين كمِّيّة الخلايا الَّتي تم تكوينها وكمِّيّة الخلايا الميتة أو الَّتي فقدت قدرتها على الانقسام. وتبدأ الخلايا الحية بالتغذية على الخلايا الميتة المتحلِّلة حيث تستمر الخلايا بالنموّ والانقسام في هذا الطور قدر الإمكان. وتبدو الخلايا أصغر وأكثر استدارة عمّا هي عليه في الطور اللوغاريتمي نتيجة للإجهاد الغذائي (Maier and Pepper, 2015, 40f).

يزداد عدد الخلايا الميتة في النظام المغلق بمرور الزمن لتمر بالمرحلة الأخيرة من منحني النموّ وهي طور الموت أو التلاشي، الَّذي قد تتواجد فيه بعض الخلايا القادرة على النموّ والانقسام لكن نسبة فقد هذه الخلايا أكبر من اكتسابها، ويكون المُعدَّل النَّوعيّ لموت الخلايا أكبر من المُعدَّل النَّوعيّ للنموّ (Rodriguez-Leon *et al*., 2013, 185).

وتصنَّف التخمُّرات وفقاً للعلاقة الحركيَّة بين النموّ وتكوين المُنتَج إلى ثلاث أنواع: مترافقة مع النموّ، ومترافقة جزئيّاً مع النموّ، وغير مترافقة مع النموّ، كما تعرف بالأنواع I، وII، وIII على التَّوالي. واعتماداً على ما إذا كان المُنتَج مُشتقاً بشكل مباشر من الركازة المستخدمة في الاستقلاب الأوَّلي (النوع I)، أو تمَّ إنتاجه في مسار ثانوي (النوع II). ويحدث النوع (III) إذا تمَّ تكوين المُنتَج والاستقلاب الأوَّلي في أوقات منفصلة تماماً (Crueger *et al*., 2017, 70f). ويتمّ إنتاج المُنتَجات المرتبطة بالنموّ (المُستقلَبات الأوَّليّة) خلال الطور اللوغاريتمي مع انخفاض تكوينها مع توقُّف النموّ، وعادةً ما يرتبط مُعدَّل تكوين المُنتَج مباشرة بمُعدَّل النموّ، ويمكن إنهاء التخمير في نهاية مرحلة النموّ اللوغاريتمي وقبل دخول الخلية إلى طور الثَّبات. ويكاد يكون مُعدَّل تكوين المُنتَجات غير المرتبطة بالنموّ (منتجات الاستقلاب الثانويّة) معدوماً خلال نموّ الخلايا النشطة ويتمّ إنتاج هذه المُنتَجات خلال طور الثَّبات (Macauley-Patrick and Finn, 2008, 72). وقد تختلف فترة التخمير اللازمة لتخليق نفس المُستقلَب باختلاف نظام التخمير، كما قد تختلف باختلاف ركازة التفاعل (Demir, 2012, 16f).

درس Escobar وBarnett (1993، 1010–1013) العوامل الحركيَّة في مزرعة مغلقة لفطر *Rhizomucor miehei* لإنتاج البروتياز في بيئة تخمير سائلة، إذ تمَّ تقدير مُعدَّل استهلاك الركازة، والتراكيز الخلويَّة والأنزيمية في ظروف مختلفة، ليتبيَّن أنَّ إنتاج البروتياز مترافق جزئياً مع النموّ نظراً لأنَّ النموّ وإنتاج الأنزيم لا يتبعان دائماً لنفس النموذج. واقترح الباحثان أنَّ إنتاج الفطر للأنزيم يتبع مسار ثانويّ ينفصل عن الاستقلاب الأساسي، وأنَّ تخليق الفطر للمركبات

يعتمد على تراكيز كلٍ من الخلايا وركازة التفاعل، ولاسيما على مُعدَّل استهلاك الركازة، إذ ترافق زيادة النشاط الأنزيمي بانخفاض تراكيز الركازة في الوسط (بعد استهلاكها)، وتحقَّقَ أعلى نشاط أنزيمي بعد 120 hrs من بدء التخمير. ولوحظ تغيُّر في درجة الـ pH تَمثَّل بانخفاض تدريجي في بداية التخمير وارتفاع كبير في المراحل الأخيرة، الأمر الَّذي أثَّرَ سلباً في الإنتاج الأنزيمي. وفي دراسة لـ Thakur وزملائه (1990b، 413) حول إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* في بيئة تخمير سائلة وأخرى صلبة، ازداد النشاط الأنزيمي للبروتياز في نظامي التخمير خلال الفترة "24-48 hrs" وصولاً إلى أقصى قيمة بعد 72 hrs من بدء التحضين ليبدأ النشاط بالانحدار بعد هذه الفترة. وقد أشار Preetha وBoopathy (1994، 39f) إلى الوصول إلى أعلى قيمة لنشاط التخثُّر النَّوعيّ ونسبة النشاط (MCA/PA) للبروتياز من *Rhizomucor miehei* بعد 5 أيام من التحضين على نخالة القمح بينما تحقَّقَ أعلى نشاط نوعيّ حال للبروتين بعد 3 أيام من التحضين، وأشار Kazemi-Vaysari (2002، 101) وزملاؤه إلى أنَّ الوصول إلى أقصى إفراز ونشاط أنزيمي للبروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* في بيئة تخمير صلبة كان بعد 4 أيام من بدء التحضين، كما أشار Silveira وزملاؤه (2005، 934) إلى ازدياد النشاط الأنزيمي للبروتياز المُنتَج من *Rhizomucor miehei* في بيئة تخمير صلبة بعد 48 hrs من التحضين للوصول إلى أقصى نشاط أنزيمي بعد 72 ساعة، وأوضح Khademi وزملاؤه (2013، 117) أنَّ الوصول لأقصى نشاط أنزيمي للبروتياز من *Rhizomucor miehei* بعد التحضين لمُدَّة 110 hrs في وسط صلب، وفي دراسة لـ Foda وزملائه (2012، 584) ازداد الإنتاج الأنزيمي للبروتياز وصولاً إلى 3 أيام تبع ذلك انخفاض في إنتاج الأنزيم، وعزوا ذلك إلى انخفاض المُغذِّيات المُتاحة للفطريات.

2-3-3-6- نوع اللّقاح وحجمه:

يَظهر التَبَوُّغ اللاجنسي عند غالبية الفطريات والأكتينومايسس المستخدمة في التخمُّرات الصناعيَّة، ومن الشائع استخدام مُعَلَّق الأبواغ عند تحضير اللّقاح في معاملات التخمير (Stanbury *et al*., 2016, 368). ويمتاز اللّقاح البوغي بالمقاومة العالية للظروف، وإمكانيّة التخزين طويل الأمد، وسهولة التحضير، وغالباً ما تستطيع الأبواغ القيام بتفاعلات التحويل الحيويّ بنفس كفاءة الميسيليوم. وقد يُعاب عليه الوقت الأطول للطور التمهيدي، والمُتطلَّبات

الأكبر لحجم اللّقاح، بالإضافة إلى اختلاف الظروف المثلى لإنبات الأبواغ عن ظروف النموّ الخضري (Mitchell, 1992, 25-26). وقد لا تُنتِج بعض الفطريات الأبواغ اللاجنسية ما يستوجب استخدام لّقاح الميسيليوم الخضري، كفطر *Gibberella fujikuroi* المستخدم في الإنتاج التِّجاريّ للجبريلين (Stanbury *et al*., 2016, 376). كما قد تُظهِر بعض الأحياء تكوين أفضل للمُنتَج عند استخدام اللّقاح الخضري (Abdullah *et al*., 1985, 20)، وقد أوضح Bailey و-Siika aho (1988، 164f) أنَّ استعمال اللّقاح الخضري بعمر 3 أيام لفطر *Rhizomucor miehei* في وسط تخمير مغمور قد أدّى إلى تخفيض الطور التمهيدي إلى 5 ساعات بالمقارنة مع 30 ساعة عند استخدام اللّقاح البوغي بعمر 14 يوماً، كما أعطى استخدام اللّقاح الخضري نشاطاً أنزيمياً مرتفعاً للبروتياز خلال فترة أقل. وتكمن المشكلة الرَّئيسيّة في اللّقاح الخضري في صعوبة الحصول على لّقاح موحَّد قياسي، ويتمّ اللّجوء إلى التجزئة للحصول على عدد كبير من أجزاء الميسيليوم وبالتالي عدد كبير من النقاط النّامية (Stanbury *et al*., 2016, 377).

ويتراوح حجم اللّقاح المستخدم في التَّخمُّرات الصناعيَّة ضمن المجال 0.1–10% من حجم الركازة وبتراكيز 10^6–10^8 (بوغة/ mL) (Lambert and Meers, 1983, 267; Gowthaman *et al*., 2001, 306). ويتمّ التلقيح في التَّخمُّرات الصّلبة بمُعدَّلات أعلى نسبيّاً بما يضمن توزيع الأبواغ أو أجزاء الميسيليوم على معظم جزيئات الركازة من دون التَّكدُّس والتَّنافس على المُغذِّيات المحدودة (Abdullah *et al*., 1985, 26). وقد أظهر Ayhan وزملاؤه (2001، 158) تأثير حجم اللّقاح بمُعلَّق أبواغ الفطر *Rhizomucor miehei* في إنتاج البروتياز باستخدام نظام تخمير مغمور ضمن المجال 3.1–11.2% (v/v)، إذ أعطى التلقيح بمُعلَّق الأبواغ (8×10^6 بوغة/ cm^3) بعمر 72 hrs، وبمُعدَّل 5.2% أعلى نشاط لتخثُّر الحليب. وأشار الباحثون إلى تناسب استهلاك الجلوكوز في وسط التخمير مع حجم اللّقاح نتيجةً للكتلة الخلويَّة المُتشكِّلة. وأشار Foda وزملاؤه (2012، 583) إلى الحصول على أعلى عائد لنشاط التخثُّر للبروتياز من *Rhizomucor miehei* عند تلقيح نخالة القمح بمُعلَّق الأبواغ بنسبة "1.8×10^8 CFU/g" وانخفاض النشاط الأنزيمي عند المُعدَّلات الأعلى. هذا وقد يرتبط شكل المزرعة الفطرية الناتجة بظروف إعداد اللّقاح، إلى جانب العوامل الأخرى، كالإضافات في وسط التخمير والتحريك (Stanbury *et al*., 2016, 377f)، إذ يميل اللّقاح ذو التركيز المرتفع إلى إعطاء شكل منتشر

للنموّ، في حين أنَّ استخدام لّقاح بتراكيز منخفضة من الأبواغ يميل إلى تكوين الكُريّات (Whitaker, 1992, 25). ويميل الشكل الخيطي للنموّ إلى إعطاء خواص لزوجة غير نيوتونيّة عالية لمرق التخمير، ما يصعب تحقيق التهوية المتعادلة، بينما يعطي الشكل الكُرويّ خصائص نيوتونية للمرق أقل لزوجة بكثير لكن أقل تجانساً. وقد تتعرَّض مراكز الحبيبات إلى انخفاض الأوكسجين والمُغذِّيات بسبب قيود الانتشار، ما يعيق نموّ الكتلة الحيويَّة في المركز، أو يُعرِّضها للتحلُّل (Stanbury *et al*., 2016, 377f).

2-4- المعاملات اللّاحقة:

يُفرَز العديد من الأنزيمات إلى خارج الخلية أو كبروتينات مرتبطة بالغشاء الخلوي الخارجي، وتُشكِّل الأنزيمات الخارجية هذه غالبية الأنزيمات الصناعيَّة كالأميلاز، والسيلولاز، والديكستراناز، والبروتياز، والأميلوجلوكوزيداز. بينما يُفَرز بعض الأنزيمات داخل الخلية أو يرتبط بقوّة بالغشاء الخلويّ، كالأسبارجيناز، والكاتالاز، والكولسترول أوكسيداز، والجلوكوز أوكسيداز. وبينما يَسهُل استخلاص الأنزيمات الخارجية من محلول التخمير السائل أو رُشاحة المزرعة الصّلبة، يتطلَّب استخراج الأنزيمات الداخلية العديد من المعاملات الأكثر تعقيداً (Robinson, 2015, 22; Sumantha *et al*., 2006, 214f).

يمكن استخدام واحدة أو أكثر من تقنيات تحطيم الخلايا لتحرير الأنزيم الداخلي، إذ تُستخدم الطرائق غير الميكانيكية في حالات الإنتاج المحدود مثل التجفيف تحت التفريغ، والتجفيد، والصدمة الحراريَّة، والصدمة التناضحيّة، والتحلُّل الكيميائي للجدار الخلوي بالمُذيبات، أو الأنزيمات، أو المضادّات الحيويَّة، أو خافضات التَّوتُّر السَّطحيّ. بينما تُستخدم الطرائق الميكانيكية عند الإنتاج على نطاق واسع كالبثق، والتَّعريض للأمواج فوق الصَّوتيّة، والطَّحن بالكُريّات (Ottens *et al*., 2006, 221f).

وتُفتَّت المواد الصّلبة المُتخمِّرة ويتمّ استخلاص الأنزيمات الخارجية وفق عملية متقطعة أو مستمرّة. وتتم تصفية الأنزيم (Leaching) بالتَّماسّ مع المُذيب (50-60 دقيقة وبنسبة 1-8:1 مذيب:مادة صلبة)، إذ يُستخدم الماء، أو المحاليل الموقية، أو محاليل الأملاح المُخفَّفة (مثل كلوريد الصوديوم 0.9%)، أو الجليسرول (1%) (Lonsane and Krishnaiah, 1992, 157f)، أو المحاليل المُخفَّفة (1%) للمُنظِّفات غير الأيونية (مثل triton x-100، tween 20، tween 40، tween 60، tween 80)، وتعمل المُنظِّفات على كل من الجدار الخلوي والغشاء السيتوبلاسمي لجعل الخلية نفوذة لمواد بروتينية مُعيَّنة، ما يؤدِّي إلى استخلاص الأنزيمات المرتبطة بالغشاء

بالإضافة إلى البروتينات الخارجيّة (Sumantha *et al*., 2006, 214). وتعود أهمِّيَّة الحفاظ على درجة حموضة وحرارة مُعيَّنة في بعض حالات الاستخلاص إلى الحفاظ على استقرار الأنزيم، فرغم إتمام معظم عمليات الاستخلاص عند درجة حرارة 30℃، يساعد الحفاظ على درجة حرارة 4-10 ℃ على تجنُّب النموّ الميكروبي، وتخريب البروتين أو تحلّله. كما يساعد الحفاظ على pH قريب من 7، والابتعاد عن نقطة التعادل الكهربائي للأنزيم على تجنُّب ترسيب الأنزيم (Chisti, 1999, 2455). وقد تختلف الدرجة المثالية لاستقرار الأنزيم عن الدرجة المثالية للتصفية، وقد حصل Kazemi-Vaysari (2002، 102) وزملاؤه على أعلى نشاط نوعيّ لتخثُّر الحليب للبروتياز من *Rhizomucor miehei* بالاستخلاص بالترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 50% عند pH 6.5.

تُحرِّر طرائق الاستخلاص المختلفة العديد من المكوِّنات الخلويَّة كالحموض النَّوويّة والبولي سكاريد إلى جانب الأنزيم في وسط الاستخلاص، وتُشكِّل هذه المكوِّنات المصدر الرئيسي لتلوُّث المُنتَج بالإضافة إلى باقي الأجزاء الخلويَّة. وتُجرى عملية التنقية بهدف إنتاج أنزيم بدرجة عالية من النقاوة وفعالية أنزيمية مرتفعة، وبجزيئات مستقرَّة كفاية للمزيد من المعاملة (Sumantha *et al*., 2006, 215)، وتُحدَّد الدرجة النهائيّة للتنقية وفق مجال استخدام المُحضَّر الأنزيمي، إذ يستخدم الأنزيم الخام في بعض الصناعات كصناعة النسيج والورق وتحضير الأعلاف، بينما تصل نقاوة المُنتَج المستخدم في المجالات الطِّبيَّة إلى 99.99% (Sing *et al*., 2008, 196f; Ottens *et al*., 2006, 221).

تُجرى عملية الترويق (Clarification) لإزالة الخلايا وأجزائها قبل تركيز وتنقية المُنتَج النهائي، ويُشكِّل الطرد المركزي والترشيح التقنيتان الرئيستان لترويق المُنتَج، كما يمكن التركيد للتخلّص من الجزيئات الكبيرة. ويساعد هضم الحموض النَّوويّة بالنوكلياز في فصل الأنزيمات عن بروتينات الخلية، ويُخفِّض من اللزوجة الناتجة عنها. وتتم إزالته بالمراحل اللاحقة من التنقية (Ottens *et al*., 2006, 223; Sumantha *et al*., 2006, 215). وقد استخدم Khademi وزملاؤه (2013، 116)، وFoda وزملاؤه (2012، 580)، وSilveira (2005، 933) عملية التَّماسّ مع الماء، وترشيح المحلول الناتج، ثُمَّ الطرد المركزي للحصول على المستخلص الخام للبروتياز من *Rhizomucor miehei* من وسط التخمير الصّلب. كما استخدم Silveira وزملاؤه (2005، 933) ترشيح مرق التخمير السائل، ثُمَّ الطرد المركزي لتحضير المُنتَج الخام لبروتياز *Rhizomucor miehei*.

يتمّ تركيز المُنتَج قبل استعادة الأنزيم من المُذيب وتنقيته النهائيّة، وغالباً ما يقصد بذلك إزالة الماء، وقد تكفي هذه الخطوة لتحضير المُنتَج النهائي المُنقّى. ويُعد التبخير الطريقة الأكثر شيوعاً لإزالة الماء أو المُذيب من المزيج، ويراعى في هذه الطريقة الحفاظ على درجة حرارة منخفضة وضغط منخفض لتجنُّب تخريب الأنزيم (Ottens *et al*., 2006, 229).

يُستخدم الترسيب خلال مراحل عديدة من المعاملات اللّاحقة، فقد يُستخدم في المراحل الأوَّليّة لإزالة الماء والأملاح لتشكيل مركب وسيط مستقر، كما يُستخدم لتركيز المُنتَج قبل التنقية النهائيّة، إذ تتم إزالة الجزيئات غير المرغوبة بالترسيب بالأملاح كسلفات الأمونيوم أو بالمحاليل كالأسيتون والإيثانول، إذ يمكن إزالة الأملاح المرتبطة بالأنزيم بالديلزة لاحقاً (Ottens *et al*., 2006, 231).

استخدم Thakur وزملاؤه (1990b، 410؛ 1993، 400) التَّماسّ مع الماء مع تطبيق الضغط للحصول على تراكيز أكبر نسبيّاً من بروتياز *Rhizomucor miehei* في محلول الاستخلاص من وسط التخمير الصّلب، واتباع عملية الاستخلاص بالطرد المركزي فالتبخير الدوراني القسري. وتمَّت تنقية الأنزيم جزئيّاً بالطين المُمتَز، والمعاملة الحراريَّة ومعادلة الـ pH لترسيب الأنزيمات غير المرغوبة كالليباز، وتمَّ ترسيب البروتياز المُنقى جزئيّاً بالإيثانول.

ودرس Kazemi-Vaysari (2002، 102) وزملاؤه الظروف المثلى لاسترداد بروتياز *Rhizomucor miehei* من رُشاحة وسط التخمير الصّلب، إذ تحقَّقَ أقصى نشاط نوعيّ للأنزيم باسترداده عند pH 6.5 بالترسيب بمحلول كبريتات الأمونيوم (50%) بعدد مرات تنقية يعادل 3.9 أضعاف، تلاه الترسيب بمحلول الأسيتون (65%)، ثم الترسيب بالإيثانول.

يمكن تركيز المُنتَج أيضاً باستخدام تقنيات الترشيح الغشائي، حيث تُحتَجَز الخلايا بوساطة أغشية الترشيح الدقيق (ذات المسام 0.2-0.5 µm)، بينما تَحتجِز أغشية الترشيح فوق العالي (10 nm) البروتينات ذات الوزن الجزيئي المرتفع، وتسمح بمرور الماء والأملاح، إذ تُستخدم الأخيرة في تركيز المُنتَج، أو لغسيل الأملاح منه (Ottens *et al*., 2006, 334).

تُعدّ البلورة والاستخلاص بالمُذيبات (الاستخلاص سائل–سائل) أهم الطرائق المستخدمة في تنقية المُنتَج، وتعتمد الطريقتان على الاستخلاص الانتقائي للمُنتَج بين مجموعة من المكوِّنات، إذ يُطبَّق الاستخلاص السائل ثنائي الطور لفصل المُنتَج باستخدام المُذيبات العضويَّة كالبوتانول، والأسيتات بوتيل، أو المُركَّبات الأمينيّة الأخرى. وينتقل المُنتَج للطور المُذيب، بينما تنتقل المكوِّنات الأخرى للجزء الراسب. كما تتم عملية البلورة بإيصال المُذيب إلى درجة فوق الإشباع

وترسيب بلورات المُنتَج، عن طريق التبريد وتخفيض درجة الذوبان، أو التبخير وتركيز المُنتَج، وتمتاز البلورة عن الترسيب بدرجة عالية من النقاوة وعدم استخدام المواد المضافة (Ottens *et al*., 2006, 238).

تُعطي معاملات التنقية فوق العالية (Ultrapurification) مُنتَجاً بنسب عالية من النقاوة تصل إلى 99.999%، وتتمثَّل التقنيات المستخدمة في هذه المعاملات بشكل رئيسي بالكروماتوغرافيا. ويُحدَّد نوع العملية وفقاً لخواص المُنتَج، كما تتم عملية الفصل بالاعتماد على إحدى هذه الخواصّ. إذ يستخدم الترشيح الهلامي لفصل الجزيئات بالاعتماد على حجمها، بينما يستخدم الادمصاص بالاعتماد على القطبيّة والتفاعل الكاره للماء. كما تعتمد كروماتوغرافيا التبادل الأيوني على شحنة الجزيئات في عملية الفصل، وتعتمد كروماتوغرافيا الاستشراب الانجذابي (Affinity chromatography) على شكل الجزيئات البروتينية لربطها بمُمتزات انتقائية (Ottens *et al*., 2006, 240f). وتُبدي الأنزيمات ذات الدرجة المرتفعة من النقاوة زيادة ملحوظة في نشاطها النَّوعيّ (Sumantha *et al*., 2006, 215). فقد أشار Preetha وBoopathy (1997، 574) إلى ازدياد الفعاليّة النَّوعيّة لبروتياز *Rhizomucor miehei* بزيادة درجة التنقية، إذ ازداد النشاط النَّوعيّ لتخثُّر الحليب 1.4 ضعف نتيجة عملية الديلزة، وازداد 5.3 أضعاف عند اتباع العملية بكروماتوغرافيا التبادل الأيوني (DEAE cellulose)، كما ازداد النشاط النَّوعيّ 6.7 أضعاف عند إتمام التنقية بكروماتوغرافيا الاستشراب الانجذابي (Benzamidine-Sepharose) بالمقارنة مع النشاط الناتج عن رُشاحة وسط التخمير الصّلب، وأظهر الأنزيم المُنقى ضعف نسبة النشاط MCA/PA. كما أشار الباحثان إلى زوال الأصبغة المرتبطة برُشاحة المزرعة في المُنتَج الأنزيمي نتيجة التنقية بالاستشراب الانجذابي، رغم عدم زوال اللون بطرائق التنقية الأخرى. وبلغ الوزن الجزيئي للأنزيم المُنقّى 40.5 kDa عند القياس بالرحلان الكهربائي باستخدام هالم كبريتات دوديكل الصوديوم مُتعدِّد الأكريلامايد (SDS-PAGE).

2-5- تحسين الإنتاج الحيوي للأنواع الميكروبية:

تُعَدّ دراسة الظروف المثلى لعملية الإنتاج الحيويّ إحدى الطرائق المُتَّبعة في تحسين إنتاج الأحياء الدقيقة للمركَّبات الحيويَّة، وقد وُجِدَ في هذا المجال أن الخلايا الميكروبية ذات قدرة عالية على التحوير والتغيُّر سواء على المستوى التركيبي أو الوظيفي اعتماداً على البيئة المحيطة.

ومن جهة أخرى، قد يؤدِّي الاختيار السليم لظروف الإنتاج لأي عملية تصنيع حيويّ إلى إنتاج مواد ذات مواصفات جيدة وبكمِّيَّات كبيرة نوعاً ما لكن دون الوصول إلى حالة الإنتاج المُفرط، إذ يخضع الاستقلاب وإفراز الأنزيمات لجينات تنظيم خاصّة لمنع الهدر في الطاقة وتراكم النواتج الوسيطة. كما قد يَصعُب التطبيق الدقيق لظروف الإنتاج المخبرية عند التوسُّع في عملية الإنتاج. وقد يؤدِّي إلى تلاشي القابلية الإنتاجية للعديد من الخلايا في خضم عملية التوسيع (الخفاجي، 1990، 205f). وهنا يبرُز دور التَّحسين الوراثي في زيادة الإنتاج الحيويّ للأنواع الميكروبية، وما يجعل السلالات المُحسَّنة هي المُفضَّلة في عمليات التخمير هو قدرتها على استهلاك المواد الخام المُعقَّدة وغير المكلفة بكفاءة، وتغيير نسب المُنتَج والتخلص من الشوائب أو المُنتَجات الثانويّة غير المرغوبة في العمليات اللّاحقة، وتقليل المتطلَّبات الخاصّة بالإنتاج كدرجة الحرارة أو التهوية، وإفراز المُنتَج بما يَسهُل فصله، وتوفير بنية خلويّة تُسهِّل فصل المُنتَج، وتحمُّل تراكيز عالية من المُنتَج، وتقصير فترات التخمير، وإنتاج المُنتَج الحيوي بكمِّيَّات مرتفعة (Rao *et al.*, 2012, 17). ويتمّ التَّحسين الوراثي للسلالات الميكروبية باستخدام تقنيات التعديل الجيني كتعطيل الجينات، وزيادة التعبير الجيني إذا كانت الجينات المسؤولة عن الإنتاج معروفة (Stephanopoulos *et al.*, 1998, 236; Adrio and Demain, 2010, 116-131). أو يتمّ من خلال إدخال طفرات عشوائيّة لكروموزومات الكائن الحي في حالة الجينات غير المعروفة وذلك بالتعريض للأشعّة فوق البنفسجيَّة أو المعاملة بالمُطفِّرات الأخرى كالمواد الكيميائيَّة (Adrio and Demain, 2006, 187-214). وعندما تَصعُب زيادة التعبير الجيني في الكائنات المُنتِجة ذاتها، فإنَّه يُلجأ للتعبير المُغايِر (Heterologous Expression) للمُنتَج المرغوب في أنواع ميكروبية أخرى، يمكن إحداث التعديل الجيني فيها بشكل أكثر سهولة، كما يُستخدم ذلك عند الإنتاج بكمِّيَّات كبيرة (Keasling, 2012, 189-195).

2-5-1- الطفرات:

الطفرة هي تغيُّر مُستقِرّ قابل للتوريث في النمط الوراثي نتيجة تغيُّر في النوكليوتيدات أو تغيير ترتيبها في منطقة معيَّنة من المجموع الوراثي (Genome). وتحدث الطفرة نتيجة الأخطاء خلال عملية نسخ وتضاعف الحمض النَّوويّ، أو تعرُّضه للأضرار الطبيعيَّة أو المُحدَثة، أو نتيجة

لإعادة التركيب الوراثي، أو نشاط العناصر الوراثية المتنقِّلة (الجينات القافزة) (Twyman, 2018, 201).

ويمكن تمييز الطفرات تبعاً لأثرها الوظيفي إلى طفرات لاغية (Null Mutant)، الَّتي تؤدّي إلى فقدان وظيفة الجين بأكمله، وطفرات الفقدان الجزئي للوظيفة وينتج عنها درجة مُعيَّنة من المُنتَج أو نشاطه، وطفرات الفقدان الوظيفي الحسّاسة للحرارة (أو ظروف أخرى)، الَّتي تُنتج النمط الظاهري نتيجة تعرُّضها لضغوط بيئيّة أو وراثيّة مُعيَّنة (Hawley and Walker, 2003, 9).

وتقسم الطفرات على مستوى الـ DNA تبعاً لطبيعة وعدد القواعد النتروجينية المتأثِّرة إلى طفرات نقطيّة (طفرات استبدال القاعدة الواحدة) (Point Mutations)، وطفرات الحذف والإدخال (Insertion/Deletion Mutations) (Torgerson and Ochs, 2014, 76-77).

وتتضمَّن الطفرات النقطية استبدال قاعدة نتروجينية واحدة فقط، وتسمى بالاستبدال المتكافئ (Transition) عند استبدال البيورين ببيورين آخر أو بيراميدين ببيراميدين آخر، في حين تُسمَّى بالاستبدال المُغايِر (Transversion) إذا حدث استبدال بيورين ببيراميدين والعكس صحيح.

وتؤدِّي معظم حالات استبدال القاعدة الواحدة إلى ما يُعرف بالطفرات الخاطئة (Missense Mutation)، إذ يؤدِّي تغيُّر النكليوتيد إلى تغيُّر الحمض الأميني وبالتالي البروتين الناتج.

قد لا يؤدِّي تغيُّر النيكليوتيد إلى تغيُّر الحمض الأميني في البروتين الناتج لوجود أكثر من شيفرة وتسمى هذه الحالة بالطفرات الصامتة (Silent – or Samsenes- Mutation).

وتحصل حالة الطفرات عديمة المعنى (Nonsense Mutation) عند تخليق كودون إنهاء نتيجة تغيير النيكليوتيد وبالتالي إيقاف عملية الترجمة (Torgerson and Ochs, 2014, 76; Hawley and Walker, 2003, 10).

ونادراً ما تعود الطفرات النقطية إلى النيكليوتيدات الأصلية الَّتي تؤدِّي إلى إنتاج البروتين الوظيفي وتُسمَّى هذه الحالة بطفرة الارتداد (Reversion Mutation) (Torgerson and Ochs, 2014, 76).

وتشمل طفرات الحذف والإدخال حذف أو إضافة نيكليوتيد واحد أو أكثر ضمن الجين. ويتمّ الحفاظ على ترجمة البروتين إذا كان عدد النيكليوتيدات المُدخلة أو المحذوفة قابلاً للقسمة على 3 وتُسمَّى الطفرة ضمن الإطار (In-frame Mutation)، وتؤدّي إلى حذف واحد أو أكثر من الحموض الأمينية داخل البروتين المُشفَّر، وإذا لم يكن عدد النيكليوتيدات قابلاً للقسمة على 3 فإن إطار القراءة لترجمة البروتين يتعطَّل، ويحدث ما يُسمَّى بإزاحة الإطار (Frameshift) (Hawley and Walker, 2003, 11; Torgerson and Ochs, 2014, 77).

ويمكن أن تحدث طفرات الانقلاب (Inversion)، والتضاعف (Duplication)، والحذف (Deletion) على مستوى الكروموسوم، بالإضافة إلى طفرات الانتقال (Translocation)، الَّتي تتضمَّن إعادة ربط أجزاء لكروموسومات غير متجانسة (Hawley and Walker, 2003, 11). كما تحدث طفرات التغيُّرات العددية (Aneuploidy) لأعداد الكروموسومات على مستوى المجموع الوراثي (Genome) (Torres *et al*., 2008, 737; Miglani, 2002, 92).

2-5-2- العوامل المُطفِّرة:

2-5-2-1- المُطفِّرات الفيزيائيَّة:

تتمثَّل المُطفِّرات الفيزيائيَّة بشكل رئيسي بالإشعاعات بالرّغم من إمكانيّة حدوث الطفرات بفعل التغيُّر في قيم الـ pH، أو الصدمات الحراريَّة. ويمكن تمييز الإشعاعات من حيث الكتلة أو الشحنة إلى إشعاعات كهرومغناطيسيّة وأخرى جُسيميِّة. كما يمكن تمييزها بحسب قدرتها على إحداث التأيُّن (Beyzadeoglu *et al*., 2010, 4; Meltz, 1991, 206). ويُعدّ الإشعاع الكهرومغناطيسي أو غير الجُسيميّ كطاقة كهرومغناطيسيّة تنتقل عبر الفراغ لا تمتلك كتلة أو شحنة، ويمكن عدَّه كفوتوناً أو حزمة من الطاقة أو كموجة تنتقل بسرعة الضوء (Meltz, 1991, 206). ويشمل الطيف الكهرومغناطيسي مدى واسع من الأشعّة بدءاً من أمواج الراديو ذات التَّردُّد والطاقة المنخفضين وطول الموجة المرتفع مروراً بالأمواج الميكرويّة، فالأشعّة تحت الحمراء، فالأشعّة المرئية، فالأشعّة فوق البنفسجيَّة، وصولاً إلى الأشعّة المؤيِّنة، الَّتي تضمّ الأشعّة السينية، وأشعّة غاما ذات الطاقة المرتفعة وطول الموجة المنخفض والتَّردُّد المرتفع (Beyzadeoglu *et al*., 2010, 4).

2-5-2-1-1- الأشعّة فوق البنفسجيَّة:

يُعدّ استخدام الأشعّة فوق البنفسجيَّة الطريقة الأكثر شيوعاً لإحداث الطفرات (Shibai *et al.*, 2017, 2)، وينجُم عن تأثير الأشعّة فوق البنفسجيَّة جميع أنواع الطُفور (Glass, 1982, 118). ويمكن التمييز بين ثلاث أطياف: UV-A (321-400 nm)، و UV-B (296-320 nm)، و UV-C (100-295 nm)، ويشمل الطيف UV-C المدى الموجي الأعلى امتصاصاً (280 nm)، إذ يُسبِّب الضَّرر الأكبر للـ DNA في الأحياء المعرَّضة له. وهو المدى المُستخدم في اختبار تأثير الأشعّة فوق البنفسجيَّة في الخلايا الحيّة (Tropp, 2014, 319).

ويترتَّب على تخريب الدنا بفعل الأشعّة فوق البنفسجيَّة تكوين نوعين رئيسيين من المُنتَجات الضَّوئيَّة (photoproducts) ويقتضي المساران تكوين ثنائيّات بين القواعد البيرميدينية المتجاورة على شريط الدنا ذاته. يتضمَّن المسار الأوَّل تكوين cyclobutane pyrimidine dimmers (CPD) ويُشكِّل حوالي 75% من الضَّرر المُستحثّ لأشعّة UV، تتولَّد حلقة السايكلوبوتان بتشكُّل رابطة بين ذرّات C-5 و C-6 للحلقات البيراميدينية المتجاورة. ومن أكثر الثنائيّات شيوعاً تايمين–تايمين، سيتوزين–تايمين، ودايمير سيتوزين–سيتوزين الَّذي يتشكَّل بمُعدَّل أكثر بطئاً.

ويُمثِّل المسار الثاني غالبية أشكال عطب الدنا المتبقِّية ويتشكَّل فيه ما يُسمَّى بمنتجات (6-4) الضَّوئيَّة (Photoproducts 6-4)، وتتشكَّل فيه رابطة بين الذَّرّة C-6 للبيرميدين `3 (تايمين أو سيتوزين) والذَّرّة C-4 للبيرميدين `5 (عادة ما يكون سيتوزين)، ويُكوِّن هذا المُنتَج تشوهاً في البنية الحلزونية للدنا نظراً لتعامد الحلقتين البيراميدينية. وفي حال عدم إزالة المُنتَجات الضَّوئيَّة فقد تتداخل مع العمليّة الطبيعيَّة للنسخ والتضاعف ما يؤدِّي إلى موت الخلية أو الطُفور (Tropp, 2014, 319-321).

استُخدِمت الأشعّة فوق البنفسجيَّة على نطاق واسع لإحداث طفرات ذات إنتاج مُرتفع للعديد من الأنزيمات مثل الأكسيليناز من *Bacillus mojavensis* (Ghazi *et al.*, 2014, 844-853)، والجلوكوز أوكسيداز من *Aspergillus niger* (Khattab and Bazaraa, 2005, 289-294)، والفيتاز من *Aspergillus niger* (Chelius and Wodzinski, 1994, 79-83)، والبروتياز من *Bacillus licheniformis* (Nadeem *et al.*, 2010, 1015-1025)، و *Trichoderma viride* (Li *et*

(Dutta and Banerjee, 2005, 127-133) *Pseudomonas sp.* و ،(*al.*, 2010, 190-198)، و *Aspergillus niger* (Radha *et al.*, 2012, 1517).

عملَ Tajik وزملاؤه (2014، 1،3،5) على تعريض أبواغ فطر *Rhizomucor miehei* للأشعّة فوق البنفسجيَّة (280 nm, 20 cm) لفترات مختلفة (30-180 sec) بهدف إحداث طفرات ذات إنتاج مرتفع للبروتياز، وقد أدّى التشعيع لمُدَّة 52 sec إلى إحداث طفرة تحسَّن فيها نشاط التخثُّر للبروتياز بنسبة 49.7%، إذ بلغ نشاط التخثُّر للبروتياز المُنتَج من هذه الطفرة 1771 SU/mL بالمقارنة مع 1183 SU/mL في السلالة الأصلية. كما ازدادت نسبة النشاط الأنزيمي MCA/PA بشكل معنوي مقارنة بالسلالة الأصلية. وفي دراسة لـ Zhang وزملائه (2016، 406) حول تطفير فطر *Rhizomucor miehei* تحقَّقَ أعلى مُعدَّل إيجابي للطفور (21.45%) عند التعريض للأشعّة فوق البنفسجيَّة لمُدَّة 90 sec، وكان مُعدَّل القتل 78.57%. وازداد نشاط تخثُّر الحليب (MCA) للبروتياز المُنتَج من الطفرة المُحدَثة بنسبة 42.85% كما انخفض النشاط التحلُّلي (PA) في الأنزيم المُنتَج بنسبة 13.66%.

2-5-2-1-2- الأمواج الميكرويّة Microwaves:

هي إشعاع كهرومغناطيسيّ غير مؤيِّن يقع ضمن المدى التَّردُّدي (300 MHz-300 GHz) الَّذي يُشكِّل جزءاً من إشعاع التَّردُّد الراديوي (Radio Frequency Radiation RFR)، ويتراوح طول الموجة ضمن المجال (1M-1mm)، ويمكن تمييز طيف الأمواج الميكرويّة وفق أنواع من التَّردُّد وهي التَّردُّد فوق العالي (Ultra-High Frequency UHF, 300 MHz- 3 GHz)، والتَّردُّد فائق العلو (Super-High Frequency SHF, 3-30 GHz)، والتَّردُّد مفرط العلو (Extremely-High Frequency EHF, 30-300 GHz) (Meltz, 1991, 225f). ويظهر تأثير الأمواج الميكرويّة في الأنسجة الخلويَّة من خلال تدفُّق الأيّونات الحرة داخل الخلايا وفيما بينها رغم قدرة الخلايا على الشحن والتفريغ إلى حدٍ ما (أقل من 1MHz). ويتوقف عمق الاختراق على ثابت العزل للخلايا (Meltz, 1991, 229). وتقاس الجرعة الإشعاعيّة للأمواج الميكرويّة بحساب كثافة الطاقة للمصدر الإشعاعيّ وهي كمِّيّة الطاقة الَّتي تسقط على وحدة المساحة الَّتي تبعد عن المصدر الإشعاعيّ مسافة مُعيَّنة خلال واحدة الزمن. كما تُقدَّر الجرعة الإشعاعية بكمِّيّة الطاقة المُمتصَّة

من قبل وزن مُعيَّن من الأنسجة خلال واحدة الزمن، أو ما يُعرف بمُعدَّل الامتصاص النَّوعيّ (Specific Absorption Rat SAR) (Meltz, 1991, 227-228).

وتُستَخدم الأمواج الميكرويّة بشكل واسع لتخفيض تعداد الأحياء الدقيقة في الأغذية (Bozkurt-Cekmer and Davidson, 2017, 223-227)، ويعتمد التأثير البيولوجي للأمواج الميكرويّة على العديد من العوامل مثل الطول الموجي أو التَّردُّد، والكثافة ومُدَّة االتشعيع، بالإضافة إلى مرحلة النموّ، والظروف الهوائية للنموّ، والتركيب الغذائي لبيئة النموّ، وكثافة أو تعداد الخلايا، والخواصّ الوراثية، وطبيعة الاستقلاب، وبنية الغشاء الخلويّ، وخواصّ النَّوع أو السلالة (Soghomonyan *et al.*, 2016, 4763f). وقد عُزيَ سابقاً دور الأمواج الميكرويّة في قتل الكائنات الحية الدّقيقة بشكل أساسي إلى تأثيرها الحراري (Banik *et al.*, 2003, 155). كما أشار العديد من التقارير في أدبيّات البحث العلمي إلى غياب التأثير المُطفِّر للأمواج الميكرويّة، فقد أشار Dardalhon وزملاؤه (1981، 37) إلى غياب التأثير البيولوجي للتردُّدات الفائقة من الأمواج الميكرويّة (9.4 GHz, 17 GHz, 70-75 GHz) في السلالات المُعدَّلة والطبيعيَّة لـ *Escherichia coli* و*Saccharomyces cerevisiae*، إذ لم يُلحَظ أثر معنوي للأمواج في مُعدَّل البقاء أو قدرة الإصلاح أو إحداث طفرات فوق مستوى الطفرات التلقائيّة. وفي دراسة لـ Dhahi وزملائه (1982، 345)، لم يكن لتعريض مُعلَّق الأبواغ الكونيدية لفطر *Aspergillus amstelodami* للأمواج الميكرويّة (8.7 GHz, 2.09 mW/cm2) لفترات 3-6 hrs عند درجة حرارة 28-30℃ أي أثر في إحداث الطفرات.

اقترحت دراسات أخرى وجود تأثيرات غير حراريّة للأمواج الميكرويّة تُنتِج أنواعاً مختلفة من التحويرات الجزيئيّة، فقد أظهرت دراسة لـ Mezykowski (1980، 75) تحسُّناً في مُعدَّل تخليق الـ DNA في فطر *Physarum polycephalum* عند تعريضه للأمواج الميكرويّة (2450-MHz,10 mW/cm2)، بالرّغم من عدم تأثُّر أبواغ الفطر *Aspergillus nidulans* من حيث مُعدَّل البقاء أو التغيُّرات المورفولوجية أو حدوث الطفرات عند تعريضها للأمواج الميكرويّة. كما أظهرت دراسة لـ Hamnerius (1985، 405) ارتفاع التراكيز الخلويَّة في المزارع المُشَعَّعة لبكتيريا *Salmoella typhimurium* بالأمواج عالية التَّردُّد (2.45, 3.10 GHz)، بالرّغم من عدم حدوث الطفرات. كما أشار Sato وزملاؤه (1996، 145–150) إلى ارتفاع مُعدَّلات القتل في بكتيريا *E.Coli*

المُعرَّضة للأمواج الميكرويّة عند درجات الحرارة "45,47,50℃" بشكل أعلى منه عند استخدام التعقيم الحراري التقليدي. وأشار Shamis وزملاؤه (2011، 3017) إلى ظهور تغيُّرات مورفولوجية مؤقَّتة كالمظهر الجاف، وفتحات المسام في غشاء الخلية، وتمكين مرور جزيئات الديكستران في بكتيريا *E.Coli* المُعرَّضة للأمواج الميكرويّة (18 GHz, 1500 kW/m2) عند درجة حرارة 40℃. وأشار Bulgakova وزملاؤه (1996، 1289) إلى التغيُّر الملحوظ لحساسية بكتيريا *staphylococcus* نحو 5 من أصل 14 نوعاً من المضادات الحيويَّة ذات آليات عمل مختلفة عند تعريض البكتيريا للأمواج الميكرويّة ذات التَّردُّد مفرط العلو (42, 54, 66, 78+ GHz). كما أشار Torgomyan و Trchounian (2015، 419) إلى ازدياد فعالية المضادات الحيويَّة (التتراسيكلين، والكانامايسين، والكلورامفينيكول، والسيفترياكسون) المُشعَّعة بالأمواج الألكترومغناطيسيّة ذات التَّردُّد مفرط العلو (53 GHz) اتجاه بكتيريا *E.Coli*.

استخدم Li وزملاؤه (2010، 190–198) التشعيع بالأمواج الميكرويّة (2450 MHz, 7000 w) لفترات مختلفة (15-195 sec) لإحداث طفرات في فطر *Trichoderma Viride*، وأتبَعَ الباحثون هذه العملية بتعريض أبواغ الطفرات الناتجة للأشعّة فوق البنفسجيَّة (254 nm) لمُدَّة 1.5 min وعلى بعد 15 cm عن المصدر الإشعاعيّ، إذ أعطت عملية التطفير 5 طفرات فائقة الإنتاج للسيلولاز أظهرت استقراراً وراثياً على مدى 9 أجيال. وأظهرت الدراسات الجزيئيّة للطفرات وجود طفرات قاعدية في الجين endoglucanase I (EG I) المُشفِّر لبروتين EG I المُكوِّن الأساسي لأنزيم السيلولاز. وفي دراسة لـ Manoliu وزملائه (2004، 1) أدّى تعريض الفطريات *Chaetomium globosum, Alternaria alternata* للأمواج الميكرويّة (10.75 GHz, $1mW/cm^2$) إلى تثبيط الأنزيمات succinate dehydrogenase، و malate dehydrogenase في كلٍ من الفطرين، وحصل تأثير مُثبِّط لأنزيم alpha ceto glutarate dehydrogenase في فطر *Chaetomium globosum* وتأثير مُنشِّط في *Alternaria alternate*، كما لوحظ أثر تحفيزي لأنزيم Isocitrate dehydrogenase في كلٍ من الفطرين.

2-5-2-2- المطفرات الكيميائيَّة:

تتباين المُطفِّرات الكيميائيَّة تبعاً لمنشئها البيولوجي، وطبيعة تركيبها، كاختلاف نوع النظام الحلقي، والتركيب العضويّ، والمجموعات الوظيفيّة. كما تُبدي اختلافاً كبيراً، من حيث طبيعة

استقلابها وتفاعلها مع الـ DNA والآليّة الّتي تُحدِث من خلالها الضَّرر الجيني، فقد يظهر الأثر غير المباشر عن طريق تكوين المُطفِّرات لأنواع الأوكسجين التفاعلية متعدِّدة الأضرار للـ DNA، أو عن طريق دخول بعض المركبات أو ما تُسمَّى بمُطفِّرات الإقحام بين القواعد المُتراصَّة في الحلزون المزدوج، أو إدخال القواعد المُحوَّرة ومُشابِهات القواعد، أو ما تُسمَّى بمُطفِّرات الدمج من قبل الأنزيمات الى الدنا بعد التعرُّف عليها على أنها قواعد نتروجينيّة أثناء تضاعف الـ DNA. وقد يظهر الأثر المباشر لبعض المُطفِّرات بعد دخولها ضمن مسارات استقلابية لتكوين مُنتَجات ذات إضافات تساهمية مع الحمض النَّوويّ. وقد تقوم بعض المُطفِّرات بتكوين إضافات للـ DNA دون الحاجة للاستقلاب كإضافة مجموعة ميثيل أو إيثيل إلى قواعد الـ DNA، كما هو الحال في عوامل الألكلة (Heflich, 1991, 143, 145, 186-188, 192). وتكمن الميزة الأساسيَّة لاستخدام عوامل الألكلة بالتَّواتر شديد الارتفاع الَّذي تحدث من خلاله الطفرات، إذ يعادل ناتج استخدام العوامل المؤلكِلة 10–20 مرّة استخدام الأشعّة المؤيِّنة (Hawley and Walker, 2003, 41).

2-5-2-2-1- إيثيل سلفونات الميثان:

يُعَدّ مركب إيثيل سلفونات الميثان (Ethyl Methane Sulfonate; EMS) أحد عوامل الألكلة شائعة الاستخدام، ويعمل على إدخال مجموعة ألكيل (-CH2 CH3) إلى القواعد النيكليوتيدية وبالتالي تحوير كفاءة الاقتران وفق قاعدة Watson وCrick، إذ يقترن الجوانين المؤلكَل مع التايمين بدلاً من السيتوزين، وفي حال عدم إصلاح الضَّرر قبل التناسخ التالي ستُستبدل أزواج القواعد الأصلية (GC) إلى (AT) لينتج الاستبدال المتكافئ (GC→AT). كما تُسبِّب نزع البورينات (Depurination) من الـ DNA لتحدث طفرات الاستبدال المتكافئ أو المُغاير عند إدخال القاعدة الخاطئة. وتبعاً لذلك فإنَّ جزءاً كبيراً من الطفرات الناتجة عن EMS هي طفرات خاطئة أو طفرات صامتة. وقد يُنتِج EMS أنواعاً أكثر تعقيداً من الطفرات مثل طفرات الحذف وإن كان ذلك بتكرار أقل، وإنَّ آلية إحداث EMS لمثل هذه الطفرات غير مفهومة تماماً (Hawley and Walker, 2003, 40f; Jeyanthi, 2009, 257f). وقد أظهرت دراسة لـ Lai وزملائه (2004، 622) حول إحداث طفرات في بكتيريا *Bacillus subtilis* باستخدام EMS لاستهداف الجين المُرَمِّز لأنزيم سيرين بروتياز ونشاطه، أنَّ 42.1% من الطفرات النقطيّة الَّتي تمَّ الكشف عنها كانت من نوع الاستبدال المتكافئ (GC→AT)، و34.2% كانت من نوع الاستبدال المتكافئ

(AT→GC)، و23.7% من نوع الاستبدال غير المتكافئ (GC→CG). وقد أشار العديد من التقارير إلى فعالية التطفير العشوائي في تحسين إفراز الأنزيمات ونشاطها باستخدام EMS، فقد أشار Ribeiro وزملاؤه (2013، 322) إلى ازدياد فعاليّة الأنزيمات Endoglucanase I (EGI)، و α-amylase ، و β-glucosidas المُنتَجة من فطر *Ashbya gossypii* المُطفَّر باستخدام EMS (5% v/v, 90 min)، بما يصل إلى 2−3 أضعاف. وأشار Khattab و Bazaraa (2005، 289) إلى ازدياد فعالية الجلوكوز أوكسيداز بما يصل إلى 114.5−322.1% في سلالات فطر *Aspergillus niger* المُطفَّرة باستخدام (EMS; 200 mM) لفترات (20,40,60 min). وفي دراسة لـ Wu وزملائه (2011، 2149) لتحسين إنتاج أنزيم β-mannanase من فطر *Aspergillus niger* بالتعريض للأمواج الميكرويّة (700W,2450 MHz) واتباع العملية بالمعاملة بـ EMS (2%, 1:1 v/v)، ازداد النشاط الأنزيمي في الطفرة الناتجة عن التعريض للأمواج الميكرويّة بمقدار 1.44 ضعف، كما ازداد النشاط الأنزيمي عند معاملة الطفرة الناتجة بـ EMS بمقدار 1.98 ضعف لنشاط الأنزيم الناتج عن السلالة الأصليّة. وفي دراسة أجراها Kumar وزملاؤه (2015، 1) ازداد نشاط الأنزيمات CMCase، و Avicelase ، و FPase ، و β-glucosidase بمقدار 2−5 أضعاف في الطفرات المُحدَثة بتعريض الفطر *Aspergillus terreus* للأشعّة فوق البنفسجيَّة (30 W, 254 nm) على مسافة 10 cm لفترات مختلفة (15 sec- 60 min) والاتباع بمعاملة الطفرات المنتخبة بـ EMS (200 µg/ mL, 1;1 v/v) لفترات مختلفة (15-150 min). كما أشار Radha وزملاؤه (2012، 1517f) إلى ازدياد النشاط الأنزيمي للبروتياز المُنتَج من فطر *Aspergillus niger* بمقدار 1.53 ضعف بمعاملة المُعلَّق البوغي بـ EMS (3 mg: mL, 60 min). هذا ولم يسبق استخدام الأمواج الميكرويّة و EMS في برامج التطفير المورثي لتحسين إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei*.

3- مواد البحث وطرائقه:

3-1- مكان تنفيذ البحث وزمانه: أُجريت الدراسة في مخابر قسم علوم الأغذية بكلية الزراعة- جامعة دمشق، ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيويَّة- دمشق، خلال الفترة مابين عامي 2018 و2022.

3-2- مواد البحث: يُبيِّن الجدول 1 مصادر المواد المستخدمة في البحث.

الجدول 1: المواد المستخدمة في البحث.

المادة	الشركة المُصنِّعة وبلد المنشأ
حمض اللاكتيك	Riedel-de Haën- Germany
الفينول	HiMedia –India
جليسرول	Riedel-de Haën- Germany
أزرق الميثيل	Sigma-Aldrich- Germany
حمض ثلاثي كلورو الخليك	Avonchem- UK
HCl	Acros Organics- Belgium
NaOH	HiMedia –India
محلول الأمونيا (25%)	SURECHEM PRODUCTS-UK
جلوكوز	Sham lab-Syria
لاكتوز	Sham lab-Syria
مستخلص الخميرة	Oxoid-Germany
ببتون	Titan Biotech- India
كازئين (Hammarsten)	HiMedia –India
آجار ديكستروز البطاطا	HiMedia –India
آجار- آجار	Titan Biotech- India
البنسلين	Sigma-Aldrich- USA
الستربتومايسين	Sigma-Aldrich – USA
الكلورامفينيكول	Sigma-Aldrich – USA
$CaCl_2$	Sigma-Aldrich- Germany
NaCl	HiMedia –India
K_2HPO_4	Fulka- Germany
$MgSO_4.7H_2O$	Avonchem- UK
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Panreac-Spain
$ZnSO_4.7H_2O$	Avonchem- UK
$CuSO_4.7H_2O$	Sigma-Aldrich- Germany
Na_2CO_3	HiMedia –India
$CuSO_4.5H_2O$	HiMedia –India

المادة	الشركة المُصنِّعة وبلد المنشأ
$(NH_4)_2SO_4$	Avonchem- UK
KCl	Avonchem- UK
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$	Fulka- Germany
$MnSO_4$	Avonchem- UK
Na_2HPO4	Qualikems-India
NaH_2PO4	Qualikems-India
حمض الستريك	HiMedia –India
سترات الصوديوم	Sigma-Aldrich- Germany
طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم	Avonchem- UK
ألبومين المصل البقري	Sigma-Aldrich – USA
كاشف Folin & ciocalteu's phenol	Sigma-Aldrich-Switzerland
L-tyrosin	Titan Biotech- India
Ethyl methanesulfonate	Sigma-Aldrich- Germany
الديكستران (Sephadex-G 100)	Sigma-Aldrich – USA
الأكريلاميد	Euro Clone –Italy
الجليسرول	PDH-UK
بيرسلفات الأمونيوم	Promega-USA
بروموفينول الأزرق	Riedel-de Haen- Germany
الواسم العياري للبروتين	AppliChem-Germany
SDS- Sodium Dodecyl Sulfate	PDH-UK
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth-Germany
Brilliant Blue G250	Roth-Germany
Tris-HCl	Plus one-Sweden
TEMED	Roth-USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich –USA
الجليسين	Promega-USA
البروتينات القياسيَّة	Jena Bioscience- Germany

3-2-1- صبغة لاكتوفينول أزرق القطن: استُخدمت لتصبيغ المُستعمرات الفطرية لغرض الفحص المجهري. حُضِّرت بإذابة 0.05 g من أزرق القطن (أزرق الميثيل) في 20 mL من الماء المُقطَّر وتَرك المحلول لمُدَّة 24 hrs. كما أُذيب 22 g من بلُّورات الفينول في 20 mL من حمض اللاكتيك بتسخين المزيج داخل حمَّام مائي والتحريك باستخدام مُحرِّك مغناطيسي، ثُمَّ أضيفت 40 mL من الجليسرول إلى المزيج السابق، رُشِّح محلول أزرق القطن وأضيف للمكوِّنات السابقة، ومُزج المُحضَّر النهائي جيداً وخُزِّنَ عند درجة حرارة الغرفة لحين الاستخدام (Kidd *et al*., 2016, 232).

3-2-2- ركائز التخمير الصّلبة: شملت نخالة القمح، ودقيق القمح، والذُّرة الصفراء، وفول الصويا، وتمَّ الحصول عليها من الأسواق المحلية، وطُحنت الذُّرة وفول الصويا، ثُمَّ غربلت باستخدام منخل معدني (1mm)، وحُفظت بعبوات مغلقة لحين الاستخدام.

3-2-3- أوساط الزرع:

- **وسط تشابك آجار المُحوَّر:** استُخدم في عزل الفطريات وتشخيصها، وحُضِّرَ وفقاً لما أشار إليه Yasuhara وزملاؤه (1994، 250):

(4 g Casein, 15 g glucose, 1 g K_2HPO_4, 0.5 $MgSO_4.7H_2O$, 0.5 g NaCl, 0.01 g $FeSO_4$, 15 g agar)/ L.

عُقِّم الوسط عند درجة 121˚C لمُدَّة 15 min، وضُبطت درجة الـ pH عند 6، وأُضيف البنسلين 0.01 g/L والستربتومايسين 0.5 g/L لمنع النموّ البكتيري ووزِّع الوسط في أطباق بتري.

- **وسط سابّورود آجار المُحوَّر:** استُخدم في عزل الفطريات وتشخيصها، وحُضِّرَ وفقاً لما أشار إليه Bills و Foster (2004، 607)، وقد حُضِّرَ وفق المكوِّنات:

(10 g peptone, 40 g glucose, 15 g agar, 0.1 g Chloramphenicol)/L

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

- **وسط آجار الحليب:** استُخدم للاختبار الأوَّلي لقدرة العزلات على إنتاج البروتياز، وحُضِّرَ من 10%(w/v) حليب فرز و2 %(w/v) آجار بعد تعقيم الأوَّل لمُدَّة 5 min عند درجة حرارة 121 °C

والثاني لمُدَّة 15 min عند درجة 121 °C. وقد خُلطت المكوِّنات بعد التعقيم، وصُبَّت في أطباق بتري (Nurkasanah and Widodo, 2015, 104).

– **وسط مرق دكستروز البطاطا المُحوَّر:** استُخدم لإنتاج الأنزيمات من العزلات الفطرية في مرحلة الغربلة، وحُضِّرَ من 4 g/L مستخلص بطاطا، و20 g/L جلوكوز، وعُدِّلَ بإضافة 10 g/L من الكازئين، وزِّعَت كل 50 mL من الوسط في دورق Erlenmeyer-250 mL، وعُقِّمَت الدوارق بالأوتوكلاف عند درجة 121℃ لمُدَّة 15 min.

وسط التخمير الصّلب: استُخدمت نخالة القمح فيه كركازة أساسيّة، وأُجري الاستبدال الجزئي لدقيق القمح، ومسحوق الذُّرة، ومسحوق الصويا بنخالة القمح بنسب 10–40%، كلّ على حدة، لتحديد تركيب الوسط الأمثل. وزِّعَ كل 20 g من وسط التخمير في دورق Erlenmeyer-250 mL، وتمَّ تحضير محلول ملحي معدني حمضي يحوي (g/L):

$ZnSO_4.\ 7H_2O$: 0.07, $MgSO_4.7H_2O$: 0.07, $CuSO_4.\ 7H_2O$: 0.07, $FeSO_4$: 0.09 (Thakur *et al*., 1990a, 16)

ومُدِّدَ 10 mL من هذا المحلول إلى 1 L، واستُخدم المحلول الأخير لترطيب وسط التخمير بنسب مختلفة، ضُبِطَت قيم الـ pH الابتدائية قبل التعقيم بإضافة NaOH (0.1 N) أو HCl (0.1 N) وصولاً للقيم المُحدَّدة وفق معاملات التصميم الإحصائي المعتمد. سُدَّت الدوارق بالقطن وعُقِّمت بالأوتوكلاف عند درجة 121℃ لمُدَّة 20 min، بعد التبريد حُقِنت الدوارق تحت ظروف معقَّمة بـ 10% V/W أو ما يعادل 2 mL من مُعلَّق الأبواغ (10^7 بوغة/mL).

وسط التخمير السائل: حُضِّر وفقاً لما ذكره Seker وزملاؤه (1999، 525)، وAndrade وزملاؤه (2002، 107) مع بعض التعديل، وقد استُخدم الجلوكوز واللاكتوز كمصدر للكربون وأُضيفت كلّ على حدة بالتراكيز (10, 20, 30, 40, 50 g/L). كما أُضيفت العناصر المعدنيّة الكبرى وفق النسب: 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، و2mL/L من محلول مُغذِّي من العناصر الصغرى وفق المكوِّنات:

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 $CuSO_4$

ولغربلة المصادر النتروجينية استُبدل الكازئين، ومستخلص الخميرة، والببتون بكبريتات الأمونيوم ضمن مكوِّنات وسط التخمير القياسي، إذ أُضيفت كلّ على حدة بالتراكيز (10, 20, 30, 40, 50

(g/L). وُزِّعَ 50 mL من وسط التخمير في دوارق Erlenmeyer 250 mL، وضُبطت قيم الـ pH الابتدائية لكل معاملة قبل التعقيم بإضافة NaOH (0.1 N) أو HCl (0.1 N) وصولاً إلى القيم المُحدَّدة وفق معاملات التصميم الإحصائي المعتمد، سُدَّت الدوارق بالقطن وعُقِّمت بالأوتوكلاف عند درجة حرارة 121 ℃ لمُدَّة 15 min، بعد التبريد حُقِنت الدوارق تحت ظروف معقمة بـ 5% (V/V) أو ما يعادل 2.5 mL من مُعلَّق الأبواغ (10^7 بوغة/mL). ثُمَّ حُضِّنَت الدوارق في حاضنة هزّازة دورانية بسرعة 150 rpm لفترات وعند درجات حرارة مختلفة وفقاً لمعاملات التصميم الإحصائي.

3-2-4- الحليب: استُخدِم حليب الأبقار الخام لعملية تصنيع الجبن، وقد تمَّ الحصول عليه من مزرعة أبي جرش التابعة لكلية الزراعة في جامعة دمشق.

3-2-5- المنفحة التِّجاريَّة: استُخدمت أقراص المنفحة التِّجاريَّة Chr. Hansen; BioRen® 97T100 دانماركية المنشأ (وزن القرص 0.5 g، الفعاليّة الأنزيمية للقرص 100000 SU (±5%)، المكوِّنات الأنزيمية: 94-100% كيموزين و0-6% ببسين)، للمقارنة مع المُحضَّر الأنزيمي المُنتَج باستخدام العزلات الفطرية. وقد قورنت المؤشِّرات الأنزيمية لكلٍ من المُحضَّرين، كما قورنت خواص الجبنة البيضاء المُصنَّعة بوساطة كل منهما.

3-3- طرائق البحث:

3-3-1- اعتيان التربة: جُمعت 45 عينة من التربة من مواقع مختلفة شملت حدائق ومشاتل وأراضي زراعية ضمن ثلاث محافظات (دمشق، وحمص، ودير الزور) (الجدول 2). جُمعت العينات بعد إزالة الطبقة السَّطحيَّة للتربة، وقد أُخذت على عمق 10-15 cm. جُفِّفَت هذه العينات هوائياً عند درجة حرارة 22 ℃ لمُدَّة 3 أيام، ثم طُحِنت لتفتيت الكتل الترابية، ثمَّ غُربلت باستخدام منخل معدني (2mm) وحُفِظَت في أكياس من البولي إثيلين لحين إجراء عملية العزل.

الجدول 2: مواقع جمع عينات التربة المستخدمة في عزل الفطريات.

رقم العينة	مصدر العينة
1	مشتل خاص– مساكن برزة– دمشق.
2	أرض زراعية– البهدلية– ريف دمشق
3	كلية الزراعة– دمشق
4	أرض زراعية– برنية– دمشق
5	أرض زراعية– بيادر نادر– اللوان– دمشق
6	أرض زراعية– السبينة– ريف دمشق
7	أرض زراعية– الكسوة– ريف دمشق
8	مركز البحوث الزراعية– قرحتا – ريف دمشق
9	أرض زراعية– دير علي– ريف دمشق
10	أرض زراعية– شركة القلمون– زغبر– ريف دمشق
11	حديقة تشرين– دمشق
12	حديقة الجاحظ– دمشق
13	حديقة الزاهرة– دمشق
14	أرض زراعية– ميسلون– ريف دمشق
15	أرض زراعية– سرغايا– ريف دمشق
16	محطة أكساد– المريعية– دير الزور
17	مركز دير الزور الزراعي– دير الزور
18	مشتل سعلو لإكثار النخيل– دير الزور
19	أرض زراعية– حي الكسر– دير الزور
20	أرض زراعية– حويجة كّاطع– دير الزور
21	أرض زراعية– البوليل– دير الزور
22	حديقة طليطلة– دير الزور
23	حديقة الأشعري– دير الزور

رقم العينة	مصدر العينة
24	حديقة المعلمين– دير الزور
25	مصلحة الحراج (سد مسعود)– دير الزور
26	مركز البحوث الزراعية – دير الزور
27	أرض زراعية– حويجة صَكُّر– دير الزور
28	أرض زراعية– حويجة صَكُّر– دير الزور
29	مشتل الفرات الرعوي– دير الزور
30	أرض زراعية– حطلة– دير الزور
31	كلية الزراعة– حمص
32	أرض زراعية– مرمريتا– حمص
33	أرض زراعية– مشتى عازار– حمص
34	أرض زراعية– تلكلخ– حمص
35	أرض زراعية– حسيا– حمص
36	أرض زراعية– القريتين– حمص
37	أرض زراعية– الصوان– حمص
38	أرض زراعية– شمسين– حمص
39	أرض زراعية– المخرم الفوقاني–حمص
40	أرض زراعية– الصدد– حمص
41	أرض زراعية– القصير– حمص
42	أرض زراعية– قطينة– حمص
43	أرض زراعية– الحواش– حمص
44	أرض زراعية– شنشار– حمص
45	أرض زراعية– الفرقلس– حمص

3-3-2- عزل الفطر وتشخيصه: تمَّ عزل الفطريات ابتداءً من عينات التربة وفقاً لما أشار إليه Davet و Rouxel (2000، 6f)، إذ حُضِّرَ مُعلَّق من التربة والماء، وذلك بوزن 10 g من عينة التربة ووضعها داخل دورق مُعقَّم يحتوي على 90 mL من الماء المُقطَّر والمُعقَّم، وتحريك المكوِّنات باستخدام هزاز بسرعة 150 rpm لمُدَّة 30 min ثُمَّ تَرك المُعلَّق ليترسب لمُدَّة 10 min. وحُضِّرت التخفيفات العشرية (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) ابتداءً من مُعلَّق التربة باستخدام الماء المُقطَّر والمُعقَّم، وتَمَّ أخذ 1mL من كل تخفيف، ووزِّعَ ضمن أطباق بتري على سطح بيئتي تشابك آجار المُحوَّر، وسابّورود آجار المُحوَّر. وحُضِّنت الأطباق عند درجة حرارة 40℃ لمُدَّة 7 أيام مع عمل 5 مُكرَّرات لكل تخفيف. نُقلت المستعمرات النّامية الَّتي تنطبق عليها المواصفات المظهرية إلى أوساط تشابك آجار وسابّورود آجار مرّة أخرى لغرض التنقية والتشخيص. وقد لوحظ شكل المزرعة ولونها وقوامها، بالإضافة إلى الخصائص المجهرية حيث حُضِّرت شرائح من هذه المستعمرات باستخدام صبغة لاكتوفينول أزرق القطن، وفُحصت بالمجهر الضوئي ولوحِظَ شكل الأكياس البوغية، وحاملات الأكياس البوغية، والأبواغ، والهيفات، والجُذيرات. عولِجَت صور المجهر الضوئي، وتمَّ قياس أبعاد المُحضَّرات باستخدام برنامج ImageJ (Rasband, n.d)، وشُخِّصت العزلات وفقاً للمفاتيح التشخيصيّة الَّتي ذكرها Cooney و Emerson (1964، 26f)، و Schipper (1978، 53f، 58f)، و De Hoog (2000، 95f).

3-3-3- الكشف عن العزلات المُنتِجة للأفلاتوكسين: تمَّ الكشف عن وجود الأفلاتوكسينات في بيئة النموّ للعزلات الفطرية وفقاً لما ذكره Saito و Machida (1999، 206)، وقد زُرِعَت العزلات في أطباق بتري تحتوي على بيئة PDA عن طريق ثقب منتصف الطبق، ووزِّع 0.2 mL من محلول الأمونيا (25%) على السطح الداخلي لغطاء الطبق باستخدام محقن طبي مزوّد بفلتر غشائي (0.22µm)، ثُمَّ حُضِّنت الأطباق بشكل مقلوب عند درجة 37 °C لمُدَّة 7 أيام، وتمَّت مراقبة لون محيط المزرعة النامية والوجه العكسي للطبق خلال فترة التحضين. ويُشير تغيُّر لون البيئة للَّون الأحمر إلى النتيجة الإيجابية للاختبار، إذ يظهر اللون الأحمر نتيجة اختزال الأفلاتوكسين بفعل الأمونيا المُتبخِّرة.

3-3-4- تحضير مُعلَّق الأبواغ: لُقِّحَ الفطر على أطباق بتري 90 mm تحتوي على 20 mL من بيئة PDA عن طريق ثقب منتصف الطبق، ثُمَّ حُضِّنت الأطباق عند درجة 37 °C لمُدَّة 5

أيام، وتمَّ الحصول على اللّقاح بخدش سطح الآجار بوجود 30 mL من الماء المقطَّر والمعقَّم، وقُدِّر تركيز الأبواغ في المُعلَّق الناتج بوساطة Neubauer chamber.

3-3-5- غربلة العزلات الفطرية: تمَّ اختبار قدرة العزلات على إنتاج البروتياز بشكل أوَّليّ على بيئة آجار الحليب، ثمَّ غُربلت العزلات اعتماداً على تقدير كمِّيّة الأنزيم المُنتَج والفعاليّة الأنزيمية في مرق ديكستروز البطاطا المُحوَّر، وقد لُقِّحَت الدوارق الحاوية على الوسط تحت ظروف معقمة بـ 5% (V/V) أو ما يعادل 2.5 mL من مُعلَّق الأبواغ (10^7 بوغة/mL). وتمَّ قياس المحتوى الأنزيمي، نشاط تخثُّر الحليب (MCA)، النشاط النَّوعيّ، النشاط الحالّ للبروتين (PA)، ونسبة نشاط تخثُّر الحليب/ النشاط الحالّ للبروتين (MCA/PA) للمستخلص الأنزيمي الناتج لتقييم جودة الأنزيم. وصُمِّمَت هذه التجارب بواقع ثلاث مُكرَّرات لكل اختبار، وعُبِّرَ عنها بمتوسطات (± الانحراف المعياري)، وتمَّ تحليل جميع النتائج اعتماداً على تحليل التباين (ANOVA) واختبار أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى معنوية 0.01 باستخدام برنامج IBM SPSS Statistics 21.

3-3-6- استخلاص الأنزيم من وسط التخمير: بعد إتمام التخمير، تمَّ فصل الميسيليوم عن وسط التخمير السائل باستخدام ورق ترشيح (Whatman paper No1)، ولتصفية المحلول الأنزيمي عُرِّض للطرد المركزي (5000 rpm) لمُدَّة 20 min، وفُصلت الرُشاحة لتقدير المحتوى والنشاط الأنزيمي. ولاستخلاص الأنزيم من وسط التخمير الصّلب أضيفت 100 mL ماء مقطر (4 ℃) إلى وسط التخمير، ووضِعت الدوارق على هزاز بسرعة 220 rpm لمُدَّة ساعة واحدة. وتمَّ ترشيح وتصفية المحلول الأنزيمي الناتج بالطريقة نفسها (Fernández-Lahore *et al*., 1998, 84).

3-3-7- تحديد المحتوى البروتيني: حُدِّدَ المحتوى البروتيني للمستخلص الأنزيمي باستخدام طريقة Lowry وزملائه (1951، 265-266)، وقد استُخدمت الكواشف الآتية:

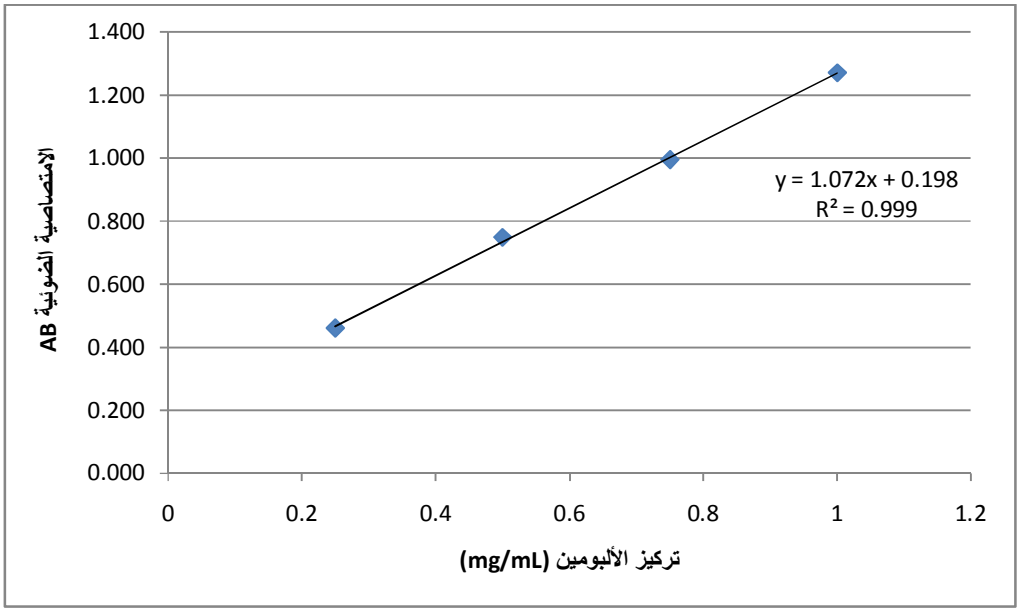
الكاشف A: 2% Na_2CO_3 في NaOH (0.1 N).

الكاشف B: 0.5 % $CuSO_4.5H_2O$ في 1% طرطرات الصوديوم أو البوتاسيوم.

الكاشف C: حُضِّر آنياً بمزج 50 mL من الكاشف A مع 1 mL من الكاشف B.

كاشف Folin & Ciocaltue's phenol (2M): مُدِّدَ بالماء المقطر بنسبة 1:1.

وحُضِّرَ محلول قياسي من ألبومين المصل البقري Bovine Serum Albumin (BSA) بتراكيز مُتدرِّجة. وأُضيف 2 mL من الكاشف C إلى 0.4 mL من كل تركيز من محلول BSA ضمن أنبوبة اختبار، وحُضِّنت الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة لمُدَّة 10 دقائق. ثُمَّ أضيف 0.2 mL من كاشف فولين فينول المُمدَّد إلى المزيج وحُضِّنت الأنابيب بمعزل عن الضوء لمُدَّة نصف ساعة. ثُمَّ قيست الامتصاصية الضَّوئيَّة للمحاليل الناتجة باستخدام المطياف الضوئي عند طول موجة 750 nm. ورُسِمَ المنحنى القياسي الَّذي تتمثَّل فيه التراكيز المختلفة مع الامتصاصية الضَّوئيَّة (الشكل 3). وقيست الامتصاصية الضَّوئيَّة لعينات الفحص بالطريقة نفسها، وقُدِّرَ المحتوى البروتيني فيها اعتماداً على المنحني القياسي.



الشكل 3: المنحني القياسي للألبومين.

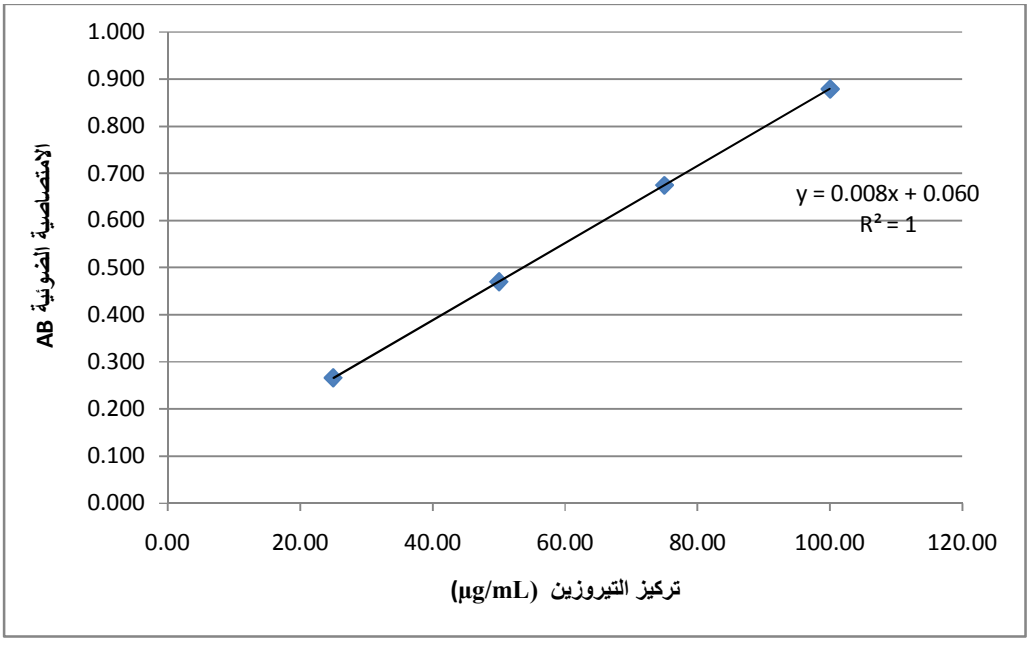
3-3-8- تحديد النشاط الأنزيمي:

- **نشاط تخثُّر الحليب (Milk Clotting Activity):** حُدِّدَ تبعاً لطريقة Arima وزملائه (1967، 541-542)، وعُبِّرَ عنه بوحدة Soxhlet (SU). وتُعرَّف بأنَّها كمِّيّة الأنزيم الَّتي تُخثِّر 1 mL من محلول يحوي 0.1 g مسحوق حليب مقشود و0.0014 g كلوريد الكالسيوم خلال 40 min عند درجة حرارة 35 ℃. إذ أُضيفَ 1mL من المستخلص الأنزيمي إلى 5mL من محلول الحليب مُعاد التركيب، وحُضِّنَ المزيج في حَمّام مائي عند درجة حرارة 35 °C، وتمَّت مراقبة عملية التخثُّر بتدوير أنبوب الاختبار من وقتٍ لآخر لحين ظهور جزيئات غير مترابطة في محلول التفاعل. وقِيسَ نشاط التخثُّر بالقانون الآتي:

$$\text{MCA (SU)} = \frac{\text{M (ml)}}{\text{E (ml)}} \times \frac{35}{\text{t (c)}} \times \frac{2400}{\text{T (sec)}}$$

بحيث أنَّ M هو حجم الحليب، E: حجم المستخلص الأنزيمي، t: درجة حرارة التفاعل، T: زمن التخثُّر.

– **النشاط الحالّ للبروتين (النشاط البروتيوليتي) (Proteolytic Activity):** حُدِّدَ عن طريق تقدير هضم الكازئين تبعاً لطريقة Kunitz (1947، 306–308). وقد أُضيف 1 mL من الرَّاشِح الأنزيمي إلى 1 mL من محلول الكازئين (1 % في 0.1 M محلول منظم فوسفاتي Sorensen ، pH 6)، وحُضِّنَ عند درجة حرارة 35 ℃ لمُدَّة 20 min، ثم أُضيفت 3 mL من محلول 5 % لثلاثي كلورو حمض الخل (TCA) لإيقاف التفاعل وترسيب الكازئين المتبقّي. وحُضِّرَ محلول الشاهد بالطريقة نفسها، عدا إضافة TCA إلى محلول التفاعل قبل إضافة المحلول الأنزيمي، وتُركت المحاليل لمُدَّة ساعة عند درجة حرارة 25 ℃، ثم نُبذت بسرعة 5000 rpm لمُدَّة 10 min. وبعد الترشيح قُدِّرَ المحتوى من الحموض الأمينية والببتيدات المتحرِّرة في المحلول الرائق باستخدام طريقة Lowry وزملائه (1951، 265–266) عند طول موجة 750 nm وباستخدام منحني قياسي للتيروزين (الشكل 4). وعُبِّر عن النشاط البروتيوليتي بوحدة بروتياز (PU)، وهي الفعاليّة الَّتي تؤدّي إلى تحرير 1 µg من التيروزين في الدَّقيقة الواحدة تحت ظروف القياس.



الشكل 4: المنحني القياسي للتيروزين.

– **الفعالية النَّوعيّة للأنزيم:** وهي عدد وحدات الفعالية الأنزيمية لكل 1 mg من الأنزيم.

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

3-3-9- أمثلة التخمير السائل: أُجريت هذه العملية وفق خطوتين، إذ غُربلت مكوِّنات وسط التخمير بتغيير معامل بعد الآخر (one-factor-at-a-time) لاختصار عدد المعاملات، وتحديد مستويات هذه العوامل ضمن تصميم RSM في المرحلة اللّاحقة.

– **الغربلة الأوَّليّة لمكوِّنات وسط التخمير السائل:** أُضيفَ الجلوكوز واللاكتوز إلى وسط التخمير كلّ على حدة بالتراكيز 10، 20، 30، 40، 50 (g/L)، وحُدِّدَ نوع المصدر الكربوني وتركيزه الأمثل لاستخدامه في المراحل اللّاحقة بناءً على كمِّيّة البروتياز المُنتَج ونشاطه. ولاختيار المصدر النتروجيني استُبدل الكازئين، ومستخلص الخميرة، والببتون بكبريتات الأمونيوم ضمن مكوِّنات وسط التخمير القياسي، إذ أُضيفت كلّ على حدة بالتراكيز 10، 20، 30، 40، 50 (g/L). وصُمِّمت هذه التجارب بتغيير معامل بعد الآخر، وبواقع ثلاث مُكرَّرات لكل معاملة وعُبِّر عنها بمتوسِّطات (± الانحراف المعياري)، وتمَّ تحليل جميع النتائج اعتماداً على تحليل التباين (ANOVA) واختبار أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى معنوية 0.01 باستخدام برنامج IBM SPSS Statistics 21.

– أمثلة ظروف التخمير السائل باستخدام منهجية الاستجابة السَّطحيَّة (Response Surface Methodology):

صُمِّمَت التجربة، وحُلِّلَت النتائج باستخدام برنامج Minitab 17، وقد تمَّت دراسة 5 عوامل وهي درجة الحرارة، وزمن التخمير، ودرجة الـ pH، وتركيز الجلوكوز، وتركيز الكازئين. وغُيِّرَت قيم هذه العوامل ضمن 5 مستويات (الجدول 3)، واستخدم التصميم المُركَّب المركزي (Central Composite Design) للحصول على 44 معاملة (الجدول 4). وحُلِّلَت النتائج التجريبيَّة للمعاملات باستخدام تحليل الانحدار المُتعدِّد، وتحليل التباين عند مستوى معنوية 0.05، وتمَّ

تحديد الظروف المثلى لإنتاج البروتياز باعتماد نشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر للنشاط الحالّ للبروتين كمُتغيّري استجابة، بما يُحقِّق أعلى قيمة لكلٍ من المؤشِّرين.

الجدول 3: التصميم التجريبي للمتغيرات المُستقلّة ومستوياتها المستخدمة في أمثلة التخمير السائل.

المتغيِّرات المدروسة	رمز المتغيِّر	الوحدة	فواصل ومستويات المتغيِّر				
			-2	-1	0	+1	+2
زمن التخمير	X1	ساعة	24	48	72	96	120
درجة الحرارة	X2	̊C	30	35	40	45	50
pH	X3	−	3	4	5	6	7
تركيز الكربون	X4	(g/L)	30	35	40	45	50
تركيز النتروجين	X5	(g/L)	2	6	10	14	18

الجدول 4: المعاملات التجريبيَّة للتصميم الإحصائي الخاصّ بالتخمير السائل.

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

3-3-10- أمثلة التخمير الصّلب:

- **الغربلة الأوّليّة لمكوّنات وسط التخمير الصّلب:** استُخدمت نخالة القمح كركازة أساسية، وأجري الاستبدال الجزئي لدقيق القمح، ومسحوق الذُّرة، ومسحوق الصويا بنخالة القمح بنسب 10-40% كلّ على حدة. وحُدِّدَ التركيب الأمثل للركائز بناءً على كمِّيّة البروتياز المُنتَج ونشاطه. ولاختيار المصدر النتروجيني أُضيف الكازئين، ومستخلص الخميرة، والببتون إلى وسط التخمير بالنسب 1، 2، 3، 4، 5% كلّ على حدة. وتمَّ قياس كمِّيّة البروتياز المُنتَج ونشاطه في جميع المعاملات. صُمِّمَت التجارب بتغيير معامل بعد الآخر وبواقع ثلاث مُكرَّرات لكل معاملة وعبِّر عنها بمتوسِّطات (± الانحراف المعياري). وتمَّ تحليل جميع النتائج اعتماداً على تحليل التباين (ANOVA) واختبار أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى معنوية 0.01 باستخدام برنامج IBM SPSS Statistics 21.

- **أمثلة ظروف التخمير الصّلب باستخدام منهجية الاستجابة السَّطحيَّة:** صُمِّمَت التجربة، وحُلِّلَت النتائج باستخدام برنامج Minitab 17، وقد تمَّت دراسة 5 عوامل وهي درجة الحرارة، وزمن التخمير، ودرجة الـ pH، ونسبة الرطوبة، وتركيز الكازئين، غُيِّرَت قيم هذه العوامل ضمن 5 مستويات (الجدول 5)، واستخدم التصميم المُركَّب المركزي للحصول على 47 معاملة (الجدول 6). وحُلِّلَت النتائج التجريبيَّة للمعاملات باستخدام تحليل الانحدار المُتعدِّد، وتحليل التباين عند مستوى معنوية 0.05، وتمَّ تحديد الظروف المثلى لإنتاج البروتياز باعتماد نشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر للنشاط الحالّ للبروتين كمتغيِّري استجابة، بما يُحقِّق أعلى قيمة لكلٍ من المؤشِّرين.

الجدول 5: التصميم التجريبي للمتغيرات المُستقلّة ومستوياتها المستخدمة في أمثلة التخمير الصّلب.

المتغيِّرات المدروسة	رمز المُتغيِّر	الوحدة	فواصل ومستويات المتغيِّر				
			-2	-1	0	+1	+2
زمن التخمير	X1	ساعة	24	48	72	96	120
درجة الحرارة	X2	℃	30	35	40	45	50
pH	X3	-	3	4	5	6	7
نسبة الرطوبة	X4	%	40	50	60	70	80
تركيز الكازئين	X5	%	0.5	1	1.5	2	2.5

الجدول 6: المعاملات التجريبيَّة للتصميم الإحصائي الخاصّ بالتخمير الصَلب.

رقم المعاملة	المكرَّرات	قيم المتغيِّر				
		X1	X2	X3	X4	X5
1	1	48	35	4	50	1.0
2	1	96	35	4	50	2.0
3	1	48	45	4	50	2.0
4	1	96	45	4	50	1.0
5	1	48	35	6	50	2.0
6	1	96	35	6	50	1.0
7	1	48	45	6	50	1.0
8	1	96	45	6	50	2.0
9	1	48	35	4	70	2.0
10	1	96	35	4	70	1.0
11	1	48	45	4	70	1.0
12	1	96	45	4	70	2.0
13	1	48	35	6	70	1.0
14	1	96	35	6	70	2.0
15	1	48	45	6	70	2.0
16	1	96	45	6	70	1.0
17	1	48	35	4	50	2.0
18	1	96	35	4	50	1.0
19	1	48	45	4	50	1.0
20	1	96	45	4	50	2.0
21	1	48	35	6	50	1.0
22	1	96	35	6	50	2.0
23	1	48	45	6	50	2.0
24	1	96	45	6	50	1.0
25	1	48	35	4	70	1.0
26	1	96	35	4	70	2.0
27	1	48	45	4	70	2.0
28	1	96	45	4	70	1.0
29	1	48	35	6	70	2.0
30	1	96	35	6	70	1.0
31	1	48	45	6	70	1.0
32	1	96	45	6	70	2.0
33	1	72	40	5	60	1.5
34	1	72	40	5	60	1.5
35	1	72	40	5	60	1.5
36	1	72	40	5	60	1.5
37	1	72	40	5	60	1.5
38	2	24	40	5	60	1.5
39	2	120	40	5	60	1.5
40	2	72	30	5	60	1.5
41	2	72	50	5	60	1.5
42	2	72	40	3	60	1.5
43	2	72	40	7	60	1.5
44	2	72	40	5	40	1.5
45	2	72	40	5	80	1.5
46	2	72	40	5	60	0.5
47	2	72	40	5	60	2.5

3-3-11- معاملات التطفير:

- **التطفير باستخدام الأشعّة فوق البنفسجيَّة:** أُجريَ وفقاً لما ذكره Tajik وزملاؤه (2014، 3)، وZhang وزملاؤه (2016، 405) مع تعديل الجرعة الإشعاعيّة، حيث نُقلت 5 mL من مُعلَّق الأبواغ الفطرية إلى أطباق بتري تحت ظروف مُعقَّمة، وعُرِّضَت للأشعّة فوق البنفسجيَّة باستخدام مصباح مبيد للجراثيم (253 nm)، على أبعاد مختلفة عن مصدر الإشعاع (5, 10, 15, 20, 25 cm)، ولفترات مختلفة (5, 10, 15, 20, 25 sec). وبعد التشعيع تُرِكَت الأطباق في الظلام لمُدَّة ساعتين لتلافي الإصلاح الضوئي، ثُمَّ أُخضعت لعملية الغربلة.

- **التطفير باستخدام الأمواج الميكرويّة:** أُجريَ وفقاً لما ذكره Li وزملاؤه (2010، 192)، فقد نُقلت 5 mL من مُعلَّق الأبواغ الفطرية إلى أنابيب زجاجية (20 mL) تحت ظروف مُعقَّمة، وأُغلقت الأنابيب بالأغطية، ووضِعت في كأس بيشر (500 mL) يحتوي على مُكعَّبات ثلجية لتلافي ظهور الأثر الحراري. ثُمَّ عُرِّضت الأنابيب للأمواج الميكرويّة باستخدام فرن ميكروويف (1000 W, 2450 MHz) لفترات مختلفة (90, 120, 150, 180, 210 sec).

- **التطفير باستخدام إيثيل سلفونات الميثان (EMS):** أُجريَ وفقاً لما ذكره Radha وزملاؤه (2012، 1518)، وKumar وزملاؤه (2015، 3) مع بعض التعديل، فقد نُقلت 5 mL من مُعلَّق الأبواغ الفطرية إلى أنابيب تثفيل (15 mL) تحت ظروف مُعقَّمة، وأضيف 1 mL من محلول EMS وفق تركيز مختلف لكل معاملة، وبلغ تركيز EMS في المُعلَّق البوغي في المعاملات المختلفة 20، و35، و50، و65، و80 (µg/mL). وحُضِّنت الأنابيب عند درجة حرارة 35 ℃ لفترات مختلفة (10, 20, 30, 40, 50, 60 min)، ثُمَّ ثُفِّلت بسرعة 5000 rpm لمُدَّة 10 min، ثُمَّ استبعدت الرُشاحة باستخدام ماصة مُعقَّمة، وغُسلت الكُرَيّات البوغية المُتشكِّلة لإزالة آثار EMS المتبقِّية بإضافة الماء المُقطَّر والمُعَقَّم وتثفيل الأنابيب ثلاث مرات مع استبعاد الرُشاحة في كل مرة. وعُلِّقت الكريات البوغية المُتشكِّلة في المرحلة الأخيرة من كل أنبوب في 5 mL من الماء المُقطَّر والمُعَقَّم، وحُفظت لإجراء الغربلة.

- **غربلة الطفرات:** وزِّعَ 1 ml من المُعلَّق البوغي المُعرَّض لعوامل التطفير على سطح أطباق بتري تحتوي على 20 mL من بيئة PDA، ثُمَّ حُضِّنت الأطباق عند درجة حرارة 37 ℃ لمُدَّة 5

أيام، وحُضِّر المُعلَّق البوغي كما ذُكِرَ سابقاً، واستُخدم لعملية الإنتاج الأنزيمي باستخدام تخمُّرات الحالة الصّلبة. وقد أُجري التخمير تحت الظروف المثلى للإنتاج بناءً على نتائج عمليّة الأمثلة.

وغُربلت العزلات اعتماداً على تقدير كمِّيّة الأنزيم والفعالية الأنزيمية في المستخلص الأنزيمي المُنتَج. واختُبِرَ الثَّبات الوراثي للطفرات المُغربلة بعد مرور 8 أجيال، وتمَّ نقل 1 mL من المُعلَّق البوغي المُطفَّر إلى سطح أطباق بتري تحتوي على بيئة PDA، وحُضِّنت الأطباق عند درجة حرارة 37℃ لمُدَّة 5 أيام، ثُمَّ استُخدِمت المستعمرات النّامية لتلقيح أطباق جديدة، حُضِّرَ المُعلَّق البوغي ابتداءً من الجيل الثامن ليُستَخدم لعملية الإنتاج الأنزيمي بالتخمُّرات الصّلبة تحت الظروف المثلى للإنتاج.

3-3-12- التنقية الجزئيَّة للأنزيم:

- الترسيب بكبريتات الأمونيوم: تمَّ ترسيب البروتينات في المُحضَّر الأنزيمي الخام وفقاً لما ذكره Iwasaki وزملاؤه (1967، 547)، و Kazemi-Vaysari (2002، 100f) وزملاؤه، و Nooralabettu (2014، 9). وقد أُضيفت بلُّورات كبريتات الأمونيوم إلى المُحضَّر ببطء مع التحريك المستمرّ باستخدام مُحرِّك مغناطيسيّ عند درجة حرارة 4 ℃ حتى الوصول إلى درجة تشبُّع 75%. تُرك المحلول الناتج تحت التبريد (2-4℃) لمُدَّة 24 hrs لرفع نسبة الترسيب. ثُمَّ فُصِلَ الراسب عن السائل الرائق بالطرد المركزي بسرعة 10000 rpm لمُدَّة 20 min، وأضيفت 10 mL من مُنظِّم الفوسفات (0.02 M, pH 6) إلى الراسب. وحُفظ كلٌ من محلول الراسب البروتيني، والسائل الرائق عند درجة حرارة 4 ℃ للاستخدام لاحقاً، كما قُدِّرَ المحتوى البروتيني والنشاط الأنزيمي في جميع مراحل التنقية.

- التنقية بكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي: أُجريت وفقاً لما ذكره Karcher (1995، 170f)، و Abdelouahab وزملاؤه (2015، 349). وقد حُضِّر هالم الترشيح بإضافة 150 mL من دارئ الفوسفات (0.02 M; pH 6) إلى 5 g من حبيبات الديكستران (Sephadex G100)، وتُرك المُعلَّق الناتج لمُدَّة 48 hrs عند درجة حرارة 4℃ للوصول إلى الانتفاخ الكامل للحبيبات. وفُرِّغ الهالم المُتشكِّل من الغازات باستخدام مضخَّة تفريغ، ثُمَّ سُكِب بلطف في عمود زجاجي بأبعاد (2.6 × 30 cm) مع تجنُّب ظهور الفقاعات. غُسل العمود مرَّتين، وتمَّت موازنته باستخدام دارئ فوسفات

بمُعدَّل جريان 1 mL/min. حُقنت 3 mL من محلول الراسب البروتيني المُحضَّر وفق الخطوة السابقة في الجزء العلوي لعمود الترشيح، مع إمرار دارئ الفوسفات، وجُمِعَت أجزاء العينة المُسرَّبة من أسفل العمود بمُعدَّل "1 mL" للجزء الواحد، وقيست الامتصاصية للأجزاء المُجمَّعة عند طول موجة 280 nm، وقُدِّرت الفعالية الأنزيمية للأجزاء المُشكِّلة للقمم البروتينية، ثُمَّ جُمعت الأجزاء ذات الفعاليّة المرتفعة لتوصيف المُحضَّر الأنزيمي الناتج.

3-3-13- توصيف البروتياز المُنَقّى جزئياً:

3-3-13-1- تقدير الوزن الجزيئي باستخدام الرحلان الكهربائي: قُدِّر الوزن الجزيئي للمُحضَّر الناتج عن مراحل التنقية باستخدام الفصل الكهربائي لهالم كبريتات دوديكل الصوديوم مُتعدِّد الأكريلامايد Sodium dodecyl sulphate (SDS)–polyacrylamide gel electrophoresis، تبعاً لطريقة Laemmli (1970، 681)، ووفقاً لما ذكره Garfin (2009، 502-511). وقد حُضِّرت المواد الهالمية بدءاً من محلول خزين للأكريلاميد (29.2% أكريلاميد، و0.8% ثنائي ميثيلين الأكريلاميد N,N'-bis-methylene acrylamide)، ومحلول خزين لكبريتات دوديكل الصوديوم SDS (10%)، وموقي Tris-HCl، بالإضافة إلى الماء المُقطَّر، وتمَّت بلمرة المواد الهالمية لاحقاً بإضافة محلول آنيّ التحضير لبيرسلفات الأمونيوم (10%)، ومحلول جاهز لرباعي ميثيل إيثيلين دياميين (TEMED)، بعد الصَّبّ. وقد بلغ التركيز النهائي لهالم الفصل Tric-HCl (pH 8.8) 0.375 M، و0.1% SDS، و12% بولي أكريلامايد. كما بلغ التركيز النهائي لهالم الرَّصّ 4% بولي أكريلامايد، و Tric-HCl 0.125 M (pH 6.8)، و0.1% SDS (الجدول 7).

حُضِّرَ المحلول الموقي لهالم الفصل بتركيز 1.5 M، بإذابة 18.2 g من Tris (hydroxymethyl)aminomethane في 80 mL من الماء المُقطَّر، وعُدِّلَ الرقم الهيدروجيني إلى 8.8 بإضافة حمض كلور الماء، ثُمَّ أُكمِلَ الحجم إلى 100 mL. وحُضِّر المحلول الموقي لهلام الرَّصّ بتركيز 0.5 M، بإذابة 6.1 g من Tris في 80 mL من الماء المُقطَّر، وتعديل الرقم الهيدروجيني إلى 6.8 بإضافة حمض كلور الماء، وأُكمِلَ الحجم إلى 100 mL.

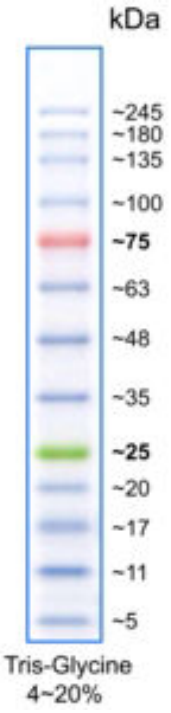
الجدول 7: مكوّنات هالم الفصل وهالم الرَّصّ والأحجام المستخدمة.

المادة	الحجم المستخدم لتحضير هالم الفصل (mL)	الحجم المستخدم لتحضير هالم الرَّصّ (mL)
ماء مُقطَّر	3.35	6.1
محلول خزين الأكريلاميد	4.0	1.3
Tris	2.5 (1.5 M pH 8.8)	2.5 (0.5 M, pH 6.8)
SDS 10%	0.1	0.1
APS 10%	0.05	0.05
TEMED	0.005	0.01

حُضِّرَ محلول الترحيل (Electrode buffer (pH 8.3 بالتركيز 0.025 M Tris، و0.192 M غلايسين، و0.1% SDS، بدءاً من 0.3 g Tris، و1.4 g غلايسين، و1 mL SDS (10%) في 100 mL ماء المُقطَّر. وحُضِّرَ مُنَظِّم العينات بالتركيز (0.0625 M Tris-HCl pH 6·8، 2% SDS، 10% جليسرول، 5% 2–مركابتوإيثانول، 0.001 بروموفينول الأزرق)، بدءاً من مُنظِّم خزين يتكون من 4.8 mL ماء مُقطَّر، و1.2 mL Tris (0.5 M, pH 6.8)، و2 mL SDS 10%، و1 mL جليسرول، و0.5 mL 0.5% بروموفينول الأزرق. ومُزِجَ 0.95 mL من مُنظِّم العينات الخزين مع 0.05 mL 5% 2–مركابتوإيثانول.

ثُبِّتَت الشرائح الزجاجية داخل إطار الصب باستخدام ملاقط جانبية، وحُدِّدَ ارتفاع صبّ هالم الفصل برسم خط أفقي أسفل تَوضُّع المشط الخاصّ بتشكيل آبار الحقن بمسافة 1 cm. وصُبَّ هالم الفصل، ثُمَّ أُضيفت كمِّيّة من الماء المُقطَّر للتخلُّص من الفقاعات الهوائية المُتشكِّلة، وجُفِّفَ الماء المقطَّر لاحقاً باستخدام ورق ترشيح بعد تصلُّب الهالم، ثُمَّ صُبَّ هالم الرَّصّ بعد تثبيت المشط الخاصّ بين الشريحتين، وأُزيلَ المشط بعد 20 min مع تجنُّب كسر الآبار المُتشَكِّلة. فُصِلَ الإطار من قالب الصبّ وثُبِّتَت الشريحتان داخل جهاز الرحلان بوساطة حامل مُثبَّت داخل خزان الفصل (Bio-Rad tank- California)، وغُمِرَ الحامل بمحلول الترحيل. وفُصِلت بنية البروتينات بتعريضها لدرجة حرارة 95 °C باستخدام حَمّام مائي لمُدَّة 4 min ممزوجة بمُنظِّم العينات (4:1). وحُمِّلَت العينات بمقدار 20 µl في الآبار أعلى الهلامة. أُغلِقَ الخزان وتمَّ توصيل مزوِّد الطاقة والأقطاب الموجبة والسالبة، وضُبِطَ التيار عند 100 V، حيث استمرَّت عملية الرحلان لمُدَّة 3 hrs، ولحين وصول الصبغة إلى نهاية الهالم. وقد رُفِعَ الحامل من خزان الفصل وأُخرِجَ

الهالم من بين الشرائح. نُقِعَ الهالم في محلول التَّثبيت (40% ميثانول، 10% ثلاثي كلورو حمض الخل) لمُدَّة ساعة، ثُمَّ غُسِلَ عِدّة مرّات بالماء المقطر لإزالة آثار محلول التَّثبيت، قبل النقع في محلول التصبيغ (0.1% صبغة كوماسي الزرقاء في محلول 40% ميثانول و10% حمض الخل) لمُدَّة 30 min حتى ظهور الحزم بشكل واضح. ثُمَّ أُزيلت الصبغة بكمِّيّة كافية من محلول إزالة التصبيغ (40% ميثانول و10% حمض الخل). وقُدِّرَ الوزن الجزيئي للبروتينات المفصولة بالمقارنة مع رحلان بروتينات قياسيَّة مُسبقة التصبيغ معروفة الوزن الجزيئي (5-245 kDa) (الشكل 5). وقد رُسِمَ المنحني القياسي الَّذي تتمثَّل فيه قيم لوغاريتم الأوزان الجزيئية للبروتينات الدَّالَّة مقابل الحركة النسبية لتلك البروتينات. وتُمَثِّل الحركة النسبية نسبة مسافة رحلان البروتين إلى مسافة رحلان الصبغة.



الشكل 5: البروتينات القياسيَّة المستخدمة (BlueElf prestained protien).

3-3-13-2- دراسة بعض الخواص الحركيَّة للأنزيم وثباتيته:

- **تأثير درجة الحرارة في فعالية الأنزيم:** حُضِّن الأنزيم والركازة بشكل منفصل ضمن أنابيب اختبار داخل حَمّام مائي ضمن المجال الحراري 30-60 ℃ مع فاصل 5 درجات لكل معاملة لمُدَّة 5 min قبل إتمام التفاعل، ثُمَّ قيست الفعاليّة الأنزيمية عند درجة حرارة المعاملة.

- **الثَّبات الحراري:** حُضِّن الأنزيم داخل حَمّام مائي ضمن المجال الحراري 40–70 ℃ ، مع فاصل 10 درجات لكل معاملة لفترات، تتراوح مابين 10 min و48 hrs، ثُمَّ بُرِّدَ الأنزيم عند درجة حرارة الغرفة، وقيس النشاط الأنزيمي عند درجة حرارة 35 °C.

- **تأثير كلوريد الكالسيوم:** أُضيفَ كلوريد الكالسيوم بالتراكيز 0.1-10 g/L إلى الحليب خالي الدَّسم مُعاد التَّكوين (10%)، وقِيسَ نشاط تخثُّر الحليب للمُحضَّر الأنزيمي عند كل تركيز.

- **تأثير كلوريد الصوديوم:** أُضيفَ كلوريد الصوديوم ضمن التراكيز 1.5–10% إلى محاليل حليب الفرز والكازئين، وقِيسَ نشاط التخثر في محلول حليب الفرز، والنشاط الحال للبروتين في محلول الكازئين عند كل تركيز مُضاف من كلوريد الصوديوم.

- **تأثير درجة الـ pH:** جُفِّدت عدة أجزاء من المُحضَّر الأنزيمي، ثُمَّ أعيدت إماهة المُحضَّر الناتج باستخدام دارئ الستررات (3–5 pH) ودارئ الفوسفات (6–7 pH). كما حُضِّرت محاليل الركائز باستخدام ذات المُنظِّمات لكل معاملة، وقِيسَ نشاط التخثُّر ضمن مجال 5–7 pH، كما قِيسَ النشاط الحالّ للبروتين ضمن مجال 3–7 pH.

- **الثَّبات اتجاه الـ pH:** تُرِكَت المحاليل الأنزيمية المُحضَّرة وفق الخطوة السابقة عند درجة حرارة الغرفة، وأُخِذَت أجزاء من هذه المُحضَّرات خلال فواصل زمنية متعدِّدة (2, 24, 48 hrs). وقيسَت الفعاليّة الأنزيمية المتبقِّية، كما عُدِّلت قيم الـ pH لأجزاء من هذه المُحضَّرات بإضافة NaOH (0.1 N) أو HCl (0.1 N) للوصول إلى درجة الـ pH المثلى للنشاط الأنزيمي. وقِيسَت الفعاليّة النَّوعيّة المتبقِّية بالمقارنة مع الفعاليّة المُسجَّلة للمحاليل الأنزيمية المُحضَّرة آنيّاً عند هذه الدرجة.

- **تأثير تركيز الركازة في فعالية الأنزيم وتحديد بعض العوامل الحركيَّة:** دُرِسَ تأثير تركيز عدد من الركائز (الكازئين، حليب الفرز، الحليب كامل الدَّسم) في فعاليّة البروتياز مع الحفاظ على تركيز ثابت للأنزيم (تركيز المُحضَّر الأنزيمي المنقى). وقد قيست الفعاليّة التحللية للبروتياز اتجاه تراكيز مختلفة من الكازئين (0.5–4%) وفقاً لما ذكره Kunitz (1947، 306–308)، كما قيست الفعاليّة التخثُّرية اتجاه محاليل حليب الفرز والحليب كامل الدَّسم مُعادة التَّكوين بالتراكيز 5–25% وفقاً لما ذكره Arima وزملاؤه (1967، 541–542). وحُدِّدَت الثوابت الحركيَّة K_m، وV_{max} اتجاه كل ركازة بطريقة Lineweaver و Burrk (1934، 658–666)، تبعاً

لما ذكره Bisswanger (2011، 28–33). وقد مُثِّلَت العلاقة بين مقلوب تركيز الركازة ومقلوب سرعة التفاعل، وحُسِبَت قيم K_m، وV_{max} بناءً على العلاقة الناتجة.

3-3-14- التطبيق العملي للأنزيم والمقارنة بالمنفحة التِّجاريَّة:

صُنِّعَ الجبن الأبيض من حليب الأبقار الخام وفقاً للطريقة التقليديّة السورية باستخدام المُخثِّر الفطري والمنفحة التِّجاريَّة Chr. Hansen BioRen® 97T100 كلّ على حدة، تبعاً لما ذكره أبو غرّة وزملاؤه (2010، 253)، وبحسب تعليمات الشركة المُصنِّعة للمنفحة (Chr. Hansen, 2019, 1-4). حيث عُدِّلت درجة حرارة الحليب إلى 38 ±2 °C. وأُضيف كلوريد الكالسيوم إلى الحليب بنسبة 1.4 g/L، ثُمَّ أُضيفت المنفحة بمُعدَّل 5000 SU لكل 1 لتر من الحليب (قرص\ 20 L) بعد إذابتها في الماء بنسبة 50:1 مع تحريك الحليب لمُدَّة 2-3 min عند كل إضافة، ثُمَّ حُضِّنَ الحليب عند درجة حرارة 38 ±2 °C لمُدَّة ساعة واحدة. قُطِّعَت الخثرة الناتجة يدوياً باستخدام آلة حادَّة، وفُصِلَت الخثرة عن المصل بوساطة مصفاة مفروشة بنسيج شاش قطني. وتمَّ كبس الخثرة باستخدام ثقل مناسب لمُدَّة 2 hrs لفصل كمِّيّة أكبر من المصل، وإعطاء الشكل المطلوب. وأُجري التمليح الجافّ (4%) للأقراص الناتجة، وحُفِظَت عند درجة حرارة 4 °C لحين إجراء التقييم الحسِّيّ. وصُنِّعَ الجبن باستخدام المُخثِّر الفطري بالطريقة السابقة نفسها بعد تحديد النسبة المُثلى لإضافة المُخثِّر. وقد أُضيفَ المُخثِّر إلى الحليب ضمن النسب 3000-7000 SU لكل 1 L من الحليب، وحُدِّدَت الإضافة المثلى بناءً على مردود الخثرة والتقييم الحسِّيّ لها. قُطِّعَ الجبن المُصنَّع باستخدام كلٍ من المنفحة والمُخثِّر الفطري ووضِعَت القطع داخل الماء المغلي لمُدَّة 6 min، ثُمَّ بُرِّدَت قبل تقديمها للتقييم الحسِّيّ. أُجري التقييم الحسِّيّ من قبل فريق من المُقيِّمين وفقاً لأسلوب الجمعية الأمريكية للأجبان (American Cheese Society, 2018, 4-36)، ووفقاً لما ذكره Clark و Costello (2009، 62–70)، مع بعض التعديل بما يناسب نوع الجبن المُنتَج. كما أُعطيَت 7 نقاط للرائحة، و30 نقطة للنكهة، و7 نقاط للقوام والملمس، و10 نقاط للمظهر الخارجي.

4- النتائج والمناقشة:

4-1- عزل الفطر وتشخيصه وغربلة العزلات:

4-1-1- عزل الفطر وتشخيصه:

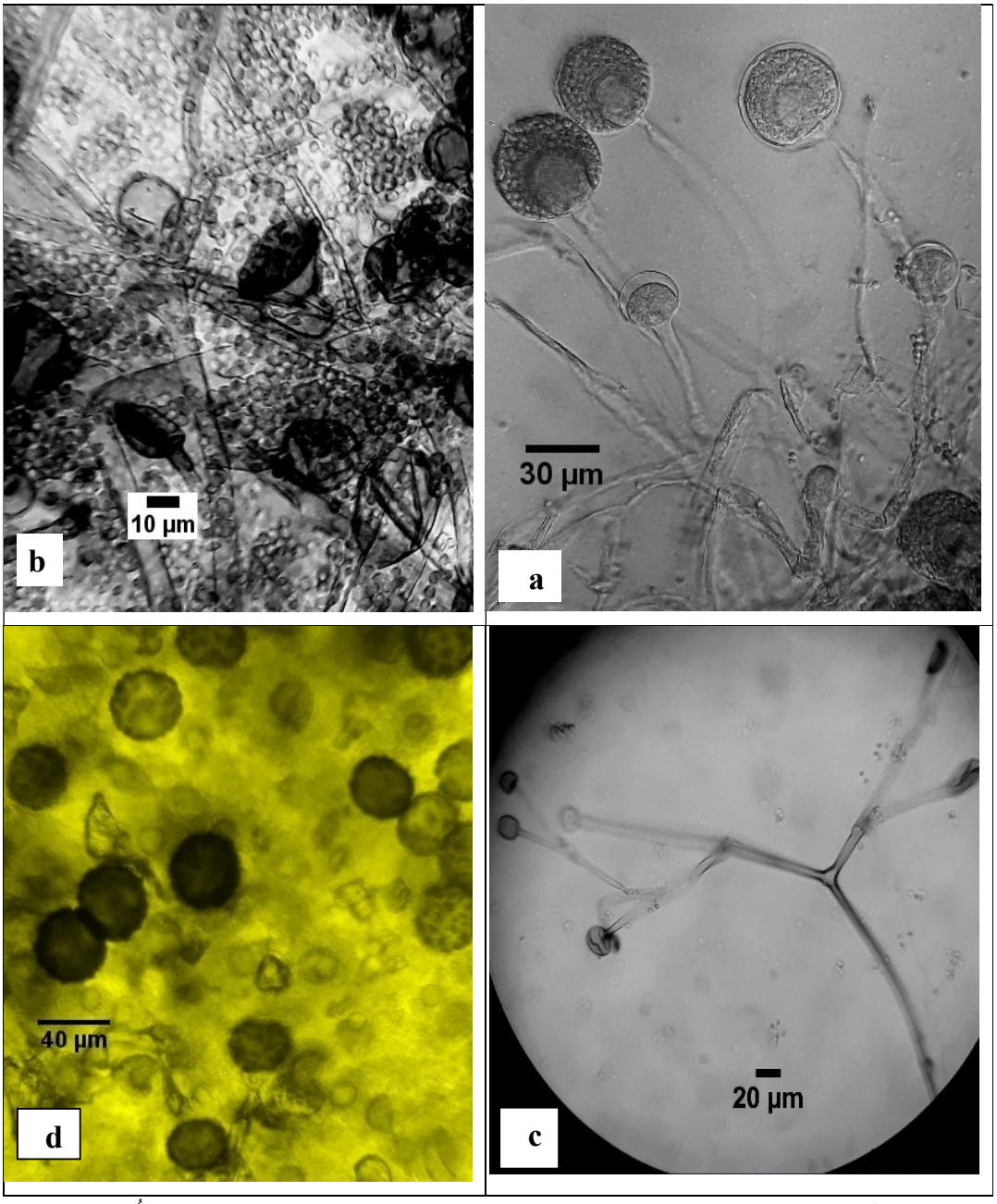
تمَّ انتقاء المستعمرات الَّتي تبدو عليها الصفات العامة لفطريات الرُّتبة Mucorales وفقاً لما ذكره Ribes وزملاؤه (2000، 248f)، وLackner وزملاؤه (2014، 285f)، إذ تميَّزت بتكوين ميسيليوم هوائي قائم، مُتفرِّع، مُستَدِقّ الأقطار، كثيف النموّ، بالغ الارتفاع. وقد نُقلت هذه المستعمرات إلى وسطي تشابك آجار المُحوَّر، وسابّورود آجار مرّة أخرى بهدف التنقية وتحديد خواصّ المزرعة، إذ شُخِّصت الخواصّ الشكليّة للمستعمرة وبعض ظروف النموّ، بالإضافة إلى الخصائص المجهرية.

وقد أظهر الفحص المجهريّ وجود الأكياس البوغية بشكل كُرويّ أو شبه كُرويّ بأقطار تتراوح بين 20 µm و51 µm محمولة على حاملات تصل بالارتفاع إلى 1mm ذات أقطار 21.7 -5.5 µm. ترتكز الأكياس البوغية على عُويمدات شبه كُرويَّة بأقطار 34.9-11.1 µm. وقد تبدو أُسطوانيّة إلى كُمَّثرية الشكل بأقطار 25.51-10.28µm، وارتفاع 30-12 µm، وسط غياب للنسيج المنتفخ (apophysis) أسفل العويمدات، تُشاهَد العويمدات والأبواغ السبورانجية داخل الأكياس البوغية بوضوح. حاملات الأكياس البوغية ذات تفرُّعات كاذبة المحور مع وجود حواجز (septa) قرب نقطة التفرُّع في أغلب الأحيان، تتكوَّن حاملات الأكياس البوغية على هيفات مدّادة ذات أقطار 12.5-6.3 µm، مع تَشكُّل ضعيف لأشباه الجذور بطول 17-13 µm. وتتمزَّق جدران الأكياس البوغية عند النضج لتُحرِّر الأبواغ السبورانجية، وتتَّخذ الأكياس المُمزَّقة شكل المِظَلّة، ثُمَّ تزول بقايا جدران الأكياس لاحقاً لتبدو العويمدات منفردة، أو قد يتبقى بعض الأجزاء بالقرب من الحامل. الأبواغ السبورانجية كُرويَّة صغيرة شفّافة بقطر 4.3-2.2 µm. الأبواغ الزيجية كُرويَّة بقطر 42-28.4 µm بلون بني مُسوَدّ إلى أسود (الشكل 6).

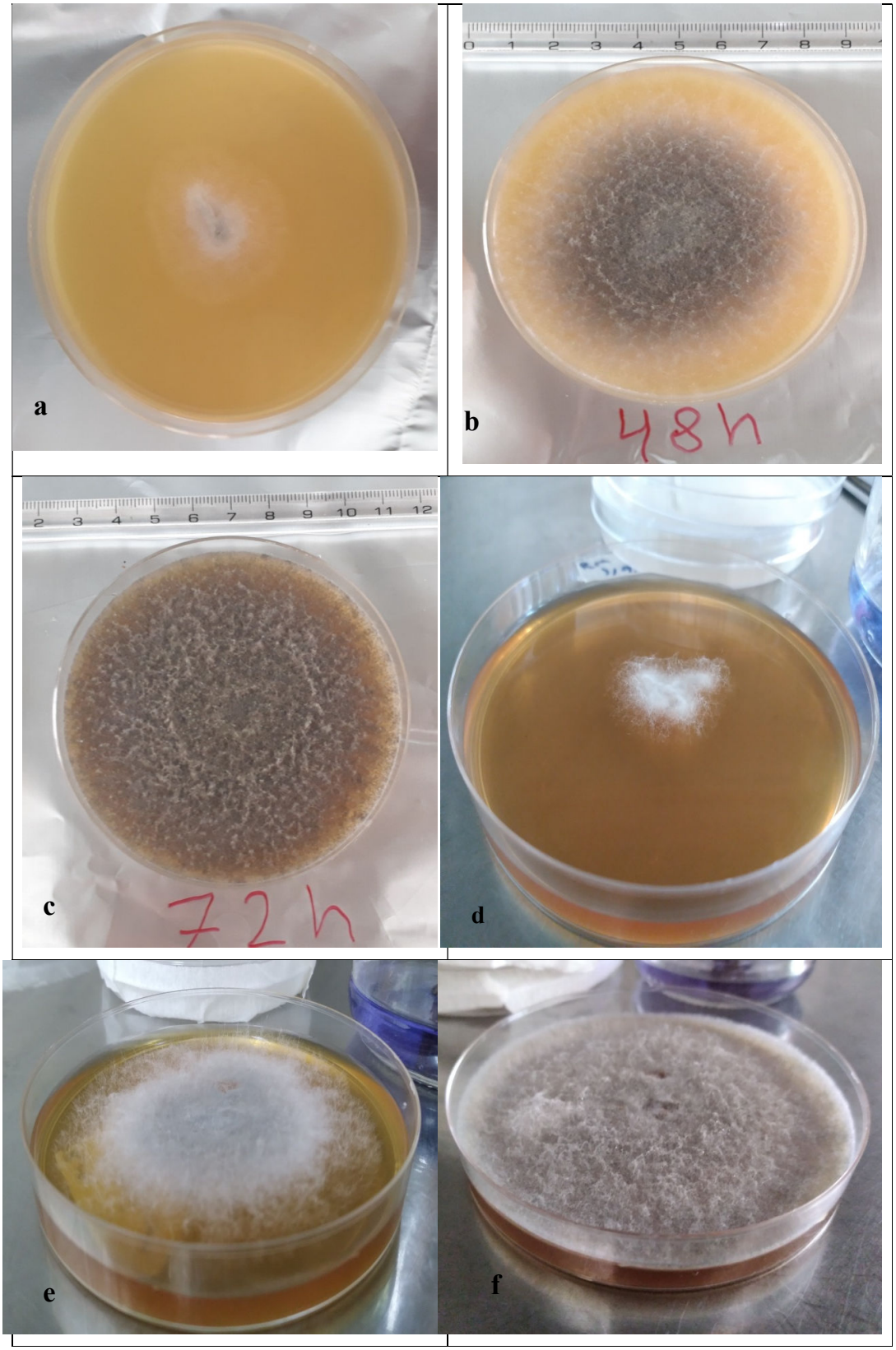
وقد ظهرت المستعمرات بلون أبيض بدايةً ثم رمادي شاحب إلى رمادي، بارتفاع 3-2 mm. وتميَّزت بنموّ سريع إذ ملأت الطبق البيتري (9 cm) بأكمله بعد 3 أيام من التحضين عند درجة حرارة 40℃ على بيئتي سابورود آجار وPDA (الشكل 7)، بينما كان النموّ منخفض الكثافة على

بيئة تشابيك آجار. وكان المدى الحراري للنموّ على بيئة PDA ℃25-55، مع أفضليّة للنموّ ضمن المدى الحراري ℃35-50 ونموّ ضعيف عند درجتي °C 25 و°C 55.

تُطابق هذه المواصفات المفاتيح التشخيصيّة الّتي ذكرها Cooney وEmerson (1964، 26f)، وSchipper (1978، 53f، 58f)، وDe Hoog (2000، 95f). بلغَ عدد العزلات المُصنَّفة 6 عزلات بدءاً من 45 عينة، أُعطيَت الرموز Rm1, Rm2, Rm3, Rm4, Rm5, Rm6، وشُخِّصت هذه العزلات ضمن النَّوع *Rhizomucor miehei* (Cooney et Emerson) Schipper.

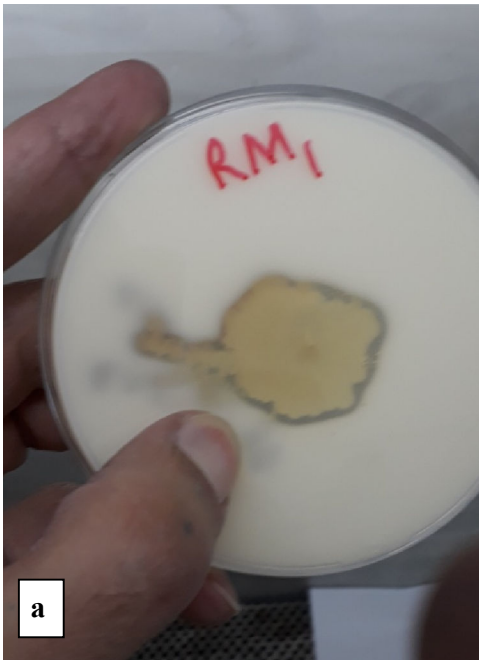


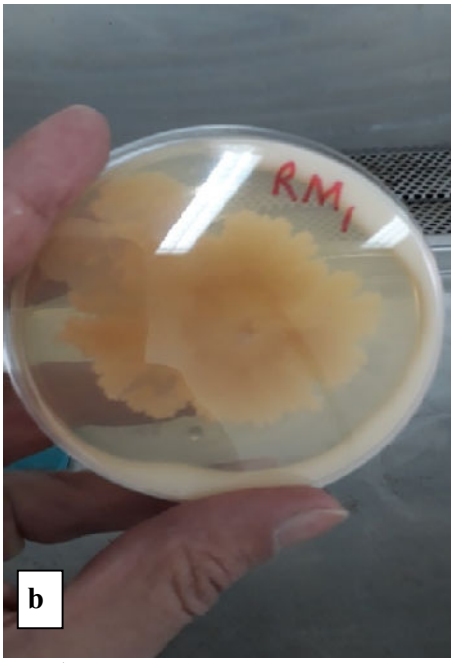
الشكل 6: صُوِّر مجهرية (10 x*40 x) توضّح مورفولوجيا فطر *Rhizomucor miehei*، العزلة مُنمَّاة على بيئة تشابيك آجار عند درجة حرارة 37℃. وتُمثِّل الصورة a: الأكياس البوغية وحاملاتها، تظهر العويمدات والأبواغ السبورانجية داخل جدران الكيس البوغي، b: تمزُّق جدران الأكياس البوغية وتحرُّر الأبواغ السبورانجية، c: تفرعات حاملات الأكياس البوغية منتهية بالعويمدات عارية بعد تمزّق الأكياس البوغية، d: الأبواغ الزيجية. الصُّوَر مُعالجة باستخدام برنامج ImageJ.



الشكل 7: مراحل تطوّر مستعمرات *Rhizomucor miehei* على بيئتي PDA (a, b, c)، وسابّورود آجار (d,e,f) خلال 24, 48, 72 hrs على التَّوالي عند درجة حرارة 40 °C.

4-1-2- اختبار قدرة العزلات الفطرية على إنتاج البروتياز: تمَّ الكشف عن إنتاج العزلات للبروتياز بشكل أولي ضمن وسط آجار الحليب (الشكل 8)، وأظهر الاختبار تَشكُّل هالات شفّافة متباينة الأقطار حول جميع المستعمرات النّامية نتيجة لتحلُّل الكازئين، ما يشير إلى قدرة هذه العزلات على إنتاج البروتياز، وتباين كمِّيّة الإنتاج في العزلات المختلفة، وقد أُخضع جميع العزلات لاختبار الفعاليّة الأنزيمية. ويُبيِّن الجدول 8 متوسط أقطار الهالات المُتشكّلة بعد 48 ساعة من التحضين عند درجة حرارة 37℃.





الشكل 8: زوال لون بيئة آجار الحليب نتيجة تحلل الكازئين بفعل إفراز البروتياز في وسط النموّ بعد التحضين لمُدَّة 24 (a)، و48 ساعة (b).

الجدول 8: قدرة العزلات الفطرية على إنتاج البروتياز اعتماداً على قطر الهالة المُتشكّلة.

رمز العزلة	مصدر العزلة	متوسط قطر الهالة المُتشكّلة ± SD (cm)
Rm1	دير الزور (حَويجة صَكُّر)	7.3 ± 0.5
Rm2	دير الزور (حَويجة كّاطع)	6.3 ± 0.3
Rm3	حمص (مشتى عازار)	6.5 ± 0.4
Rm4	دمشق (السبينة)	7.5 ± 0.5
Rm5	دمشق (اللوان)	6.1 ±0.3
Rm6	دمشق (سرغايا)	6.4 ±0.4

4-1-3- الكشف عن العزلات المُنتِجة للأفلاتوكسين: أظهرت نتائج الاختبار غياب الأفلاتوكسين في بيئة النموّ لجميع العزلات، إذ لم يظهر أيّ تغيُّر في لون بيئة النموّ بفعل وجود الأمونيا. وهذا يوافق ما أشار إليه Amer وزملاؤه (2015، 1074) حول عدم إنتاج فطر *Rhizomucor miehei* للأفلاتوكسين، ما يشير إلى صلاحيّة الأنزيم المُحضَّر للاستهلاك، إذ يُستخدم المُحضَّر الأنزيمي من *Rhizomucor miehei* بشكل واسع في تحضير العديد من مُنتَجات الألبان. وقد تمَّت المصادقة عليه منذ عام 1974 من قبل اللّجنة المشتركة لمنظمة الأغذية والزراعة ومنظَّمة الصحة العالمية الخاصّة بالمُضافات الغذائيَّة وفق حصّة يوميّة غير مُحدَّدة (Joint FAO/WHO, 1974, 34).

4-1-4- اختبار الفعاليّة الأنزيمية وغربلة السلالات: تمَّ اختبار الفعاليّة الأنزيمية للأنزيم المُنتَج بوساطة السلالات المعزولة في مرق دكستروز البطاطا المُحوَّر. وأُنجز التخمير لمُدَّة 6 أيام عند درجة حرارة ℃ 37، وتمَّ قياس المحتوى البروتيني، ونشاط تخثُّر الحليب، والنشاط النَّوعيّ، والنشاط البروتيوليتي، ونسبة النشاط MCA/PA للمستخلص الأنزيمي الناتج. ويُبيِّن الجدول 9 الفروق المعنوية للمحتوى والنشاط الأنزيمي للمستخلص الأنزيمي المُنتَج بوساطة العزلات المختلفة. وقد بلغت المؤشِّرات المدروسة الحدّ الأعلى في الأنزيم المُنتَج بوساطة العزلة Rm4 لكلٍ من المحتوى الأنزيمي، ونشاط تخثُّر الحليب، والنشاط النَّوعيّ، والنشاط البروتيوليتي، ونسبة MCA/PA. بينما بلغ المحتوى والنشاط الأنزيمي الحد الأدنى في المستخلص المُنتَج بوساطة العزلة Rm6. وكانت الأنزيمات المُنتَجة بوساطة العزلات الأخرى مُتوسِّطة النشاط الأنزيمي. وتفوق قيم نشاط التخثُّر ونسبة النشاط MCA/PA للأنزيم المُنتَج بوساطة العزلة Rm4 قيم النشاط الأنزيمي للبروتياز المُنتَج بوساطة السلالة *Rhizomucor miehei NRRL 3500* في مرق دكستروز البطاطا تحت ظروف مُشابِهة، الَّتي أشار إليها Preetha وBoopathy (1994، 39).

ويعود التباين في إنتاج الأنزيمات ما بين العزلات المختلفة إلى التنوّع الوراثي لسلالات النَّوع الواحد والمرتبط ببيئاتها الطبيعيَّة والأدوار الوظيفية الَّتي تلعبها ضمن هذه البيئات والتفاعل الميكروبي اتجاه العناصر البيئيّة واستجابتها للتغيُّرات في الظروف المحيطة، ما ينعكس على التعبير الوراثي وتكوين الأنزيمات (Boon *et al*., 2014, 90-118; Braga *et al*., 2016, 86-98). واستناداً إلى هذه النتائج، تمَّ اختيار العزلة Rm4 لإنتاج البروتياز في المراحل اللّاحقة من الدراسة.

الجدول 9: المحتوى والنشاط الأنزيمي لأنزيمات البروتياز المُنتجة بوساطة العزلات المختلفة.

رمز العزلة	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	نشاط تخثُّر الحليب (SU/mL)	نشاط التخثُّر النَّوعيّ (SU/mg)	النشاط البروتيوليتي (PU/mL)	نشاط التخثُّر / النشاط البروتيوليتي
Rm1	2.43 ± 0.10^{ac}	307 ± 15^{ad}	126.34 ± 1.38^{a}	1.55 ± 0.12^{a}	198.06 ± 8.05^{a}
Rm2	2.02 ± 0.11^{cd}	251 ± 11^{bce}	124.26 ± 1.87^{a}	1.28 ± 0.10^{a}	196.09 ± 9.57^{a}
Rm3	2.29 ± 0.14^{abc}	287 ± 21^{abd}	125.33 ± 2.14^{a}	1.45 ± 0.13^{a}	197.93 ± 4.65^{a}
Rm4	2.57 ± 0.14^{a}	327.72 ± 17^{d}	127.51 ± 0.47^{a}	1.65 ± 0.15^{a}	198.62 ± 11.06^{a}
Rm5	1.86 ± 0.10^{bd}	227 ± 13^{e}	122.04 ± 0.61^{a}	1.20 ± 0.11^{a}	189.17 ± 9.28^{a}
Rm6	2.16 ± 0.12^{abcd}	270 ± 15^{abe}	125 ± 0.10^{a}	1.38 ± 0.10^{a}	195.65 ± 4.70^{a}

* القيم في العمود الواحد الَّتي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.01.

4-2- أمثلة التخمير السائل:

4-2-1- الغربلة الأوَّليّة للركائز:

4-2-1-1- اختيار مصدر الكربون:

يُبيِّن الجدول 10 اختلاف المحتوى والنشاط الأنزيمي باختلاف نوع وتركيز مصدر الكربون، حيث بلغت قيم المحتوى الأنزيمي، والنشاط النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط البروتيوليتي للمستخلص الأنزيمي الحدّ الأعلى عند إضافة الجلوكوز بتركيز 40 g/L وقُدِّرت بمتوسط 1.9 mg/mL ، و65.02 SU/mg، و301.29 على التَّوالي. كما ظهر فرق معنوي واضح في قيمة نشاط تخثُّر الحليب، إذ بلغت 123.53 SU/mL بالمقارنة مع القيم 49.41 SU/mL، و 82.35 SU/mL، و99.62 SU/mL، و94.30 SU/mL في الأوساط ذات التراكيز 10 g/L، و20 g/L، و30 g/L، و50 g/L على التَّوالي.

كان الفطر قادراً على النموّ وإنتاج أنزيمات البروتياز في الأوساط الحاوية على اللاكتوز بجميع التراكيز. وكان التركيز 20 g/L هو أفضل إضافة للّاكتوز، إذ بلغت قيم المحتوى الأنزيمي، ونشاط تخثُّر الحليب والنشاط النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط البروتيوليتي للمستخلص الأنزيمي المُنتَج 1.38 mg/mL، و74.53 SU/mL، و54.01 SU/mg، و276.04 على التَّوالي. بينما كانت التراكيز الأخرى من اللاكتوز أقل تأثيراً في إنتاج الأنزيمات ونشاطها حيث انخفضت قيم جميع المؤشِّرات المدروسة للمستخلص الأنزيمي المُنتَج في الأوساط الأخرى للّاكتوز. وقد

ظهر فرق معنوي واضح في قيم المؤشِّرات في الأوساط ذات التراكيز المُتطرِّفة لكلٍ من الجلوكوز واللاكتوز.

وأعطى الوسط الحاوي على الجلوكوز بالتركيز الأمثل (40 g/L) عائداً ونشاطاً أنزيمياً أعلى منه في الوسط الحاوي على اللاكتوز عند القيمة المثلى للإضافة (20 g/L). ويتَّضح الأثر الأكبر للجلوكوز في مؤشِّرات جودة الأنزيم المُنتَج ونشاطه، فرغم تقارب كمِّيّة الأنزيم المُنتَج ازداد نشاط تخثُّر الحليب للمستخلص الأنزيمي بشكل ملحوظ في وسط الجلوكوز، إذ بلغ 123.53 SU/mL بالمقارنة مع 74.53 SU/mL في المستخلص الأنزيمي الناتج عن وسط اللاكتوز. كما ازداد النشاط النَّوعيّ ونسبة نشاط تخثُّر الحليب/ النشاط البروتيوليتي في وسط الجلوكوز، فقد بلغت قيم هذه المؤشِّرات 65.02 SU/mg، و301.29 على التَّوالي مقارنةً مع القيم 54.01 SU/mg، و276.04 في المستخلص الأنزيمي الناتج عن وسط اللاكتوز.

ويعود انخفاض إنتاج البروتياز المرافق للتراكيز المنخفضة للسُّكَّريات في وسط التخمير إلى عدم كفايتها للوصول للكتلة الخلويَّة المطلوبة وإنتاج الأنزيمات. أمّا انخفاض إنتاج البروتياز المرافق للتراكيز المرتفعة للسُّكَّريات، فقد يعود إلى ما يُعرف بالكبح بنواتج هدم الكربون (Carbon Catabolite Repression)، ففي حال غياب الجلوكوز يشارك البروتياز بتزويد الخلية بالحموض الأمينية والببتيدات لتُشكِّل مصدراً للكربون والطّاقة إلى جانب كونها مصدراً للنتروجين، ونتيجةً لذلك فقد يحدث تثبيط لتخليق البروتياز في ظروف الطاقة الخلويَّة المرتفعة وارتفاع تراكيز الجلوكوز (Sharma *et al*., 2017, 118; Chen *et al*., 2004, 496). وهذا يوافق ما توصَّل إليه Beyenal وزملاؤه (1999، 529) حول تثبيط إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei* بارتفاع تركيز الجلوكوز في وسط التخمير، وما توصَّل إليه Amer وزملاؤه (2015، 1074) بزيادة تراكيز الجلوكوز واللاكتوز في أوساط التخمير.

ويُعزى اختلاف تركيز عتبة الكبح الهدمي في كلٍ من حالتي الجلوكوز واللاكتوز إلى اختلاف الأثر التَّنظيمي لهذه المصادر في إنتاج البروتياز. إذ تُنتج السكريات إشارات تُعدِّل تشكيل بعض البروتينات الَّتي تؤثِّر بدورها في التّعبير عن الجينات المُعرَّضة للكبح عبر مسارات مختلفة (Gancedo, 1998, 334).

ويعود تفوُّق الجلوكوز كمصدر للكربون إلى درجة إتاحته المرتفعة وسهولة استقلابه، ما يؤمِّن المادة اللازمة للنموّ الأوَّلي وإنتاج الأنزيمات. وهذا يوافق ما توصَّل إليه De lima وزملاؤه (2008، 580f)، وAmer وزملاؤه (2015، 1074) حول تفوُّق الجلوكوز على اللاكتوز في تحفيز إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei*.

الجدول 10: تأثير مصدر الكربون في إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei*.

المصدر الكربوني	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	نشاط تخثُّر الحليب (SU/mL)	نشاط التخثُّر النَّوعيّ (SU/mg)	النشاط البروتيوليتي (PU/mL)	نشاط التخثُّر/ النشاط البروتيوليتي
جلوكوز					
10 g/L	1.20 ± 0.01^{ab}	49.41 ± 1.43^{af}	41.18 ± 1.20^{ad}	0.19 ± 0.01^{a}	260.05 ± 8.74^{ac}
20 g/L	1.37 ± 0.01^{a}	82.35 ± 6.11^{bc}	60.11 ± 5.69^{bc}	0.30 ± 0.05^{b}	274.50 ± 36.92^{ab}
30 g/L	1.62 ± 0.03^{ac}	99.62 ± 9.73^{c}	61.49 ± 6.89^{bc}	0.35 ± 0.04^{c}	284.63 ± 6.78^{bde}
40 g/L	1.90 ± 0.04^{c}	123.53 ± 13.98^{d}	65.02 ± 8.47^{c}	0.41 ± 0.05^{d}	301.29 ± 3.80^{e}
50 g/L	1.64 ± 0.02^{ac}	94.30 ± 8.83^{ce}	57.50 ± 6.62^{bc}	0.35 ± 0.04^{c}	269.43 ± 7.97^{adf}
لاكتوز					
10 g/L	1.34 ± 0.01^{ab}	66.84 ± 1.32^{ab}	49.88 ± 0.87^{ab}	0.25 ± 0.03^{e}	267.36 ± 7.67^{adf}
20 g/L	1.38 ± 0.01^{a}	74.53 ± 1.55^{be}	54.01 ± 1.04^{bcd}	0.27 ± 0.03^{be}	276.04 ± 6.35^{ad}
30 g/L	1.20 ± 0.01^{ab}	42.12 ± 2.55^{fj}	35.10 ± 2.59^{a}	0.16 ± 0.01^{a}	263.25 ± 0.73^{af}
40 g/L	1.20 ± 0.01^{ab}	39.55 ± 0.71^{fj}	32.96 ± 0.45^{a}	0.15 ± 0.01^{a}	263.67 ± 18.25^{af}
50 g/L	0.90 ± 0.01^{b}	25.40 ± 0.49^{j}	28.22 ± 0.33^{a}	0.1 ± 0.007^{f}	254.00 ± 29.28^{cf}

* القيم في العمود الواحد الَّتي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.01.

4-2-1-2- اختيار المصدر النتروجيني:

بناءً على النتائج السابقة، فقد تمَّ اعتماد الجلوكوز كمصدر للكربون، وأُضيف بالتركيز 40 g/L إلى مكوِّنات وسط التخمير. ولاختبار نوع وتركيز المصدر النتروجيني، استُبدِل الكازئين، ومستخلص الخميرة، والببتون بسلفات الأمونيوم في وسط التخمير، وقد أضيفت كلٌّ على حدة بالتراكيز 10, 20, 30, 40, 50 g/L.

ويُبيِّن الجدول 11 قدرة الفطر على استهلاك المصادر النتروجينية المختلفة، كما يظهر الأثر الإيجابيّ للمصادر العضويَّة 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 التخمير الَّذي أشار إليه Seker وزملاؤه (1999).

أشار العديد من الباحثين إلى تفوُّق المصادر العضويَّة في تحفيز إنتاج البروتياز بالمقارنة مع استخدام المصادر غير العضويَّة (Siala *et al*., 2012, 4f; Okpara *et al*., 2019, 49f; Benluvankar *et al*., 2016, 23f; Elgammal *et al*., 2020, 342f, Mamo *et al*., 2020, 578ff). إذ تميل الأملاح النتروجينية لتغيير قيم الـ pH، ويَنتُج عن استقلاب سلفات الأمونيوم أثر حامضي في وسط التخمير (Stanbury *et al*., 2016, 227)، ما قد يُغيِّر من الدرجة المثلى للنموّ الفطري وإنتاجه للأنزيم. وهذا يوافق ما توصَّل إليه Khademi وزملاؤه (2013، 118f) حول انخفاض إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* بإضافة المصادر النتروجينية غير العضويَّة.

وتظهر أهمِّيَّة الكازئين في تحفيز إنتاج البروتياز ونشاطه، فرغم تقارب كمِّيّة الأنزيم المُنتَج فاقت قيم مؤشِّرات جودة الأنزيم عند إضافة الكازئين بالتركيز الأمثل (10 g/L) القيم الحاصلة عند إضافة المصادر النتروجينية الأخرى عند جميع التراكيز. وقد بلغت قيم هذه المؤشِّرات 369.72 SU، 171.17 SU/mg، 543.71 لكلٍ من نشاط تخثُّر الحليب، والنشاط النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط البروتيوليتي على التَّوالي.

كما كانت التراكيز المثلى لإضافة كلٍ من مستخلص الخميرة والببتون 10 g/L و20 g/L على التَّوالي. وقد تفوَّقت قيم مؤشِّرات المحتوى الأنزيمي ونشاط تخثُّر الحليب عند إضافة الببتون بالتركيز الأمثل على القيم الناتجة عند إضافة مستخلص الخميرة، وبلغت قيم هذه المؤشِّرات 2.30 mg/mL و157.16 SU/mL على التَّوالي عند إضافة الببتون، بينما بلغت هذه القيم 1.92 mg/mL و138.20 SU/mL على التَّوالي عند إضافة مستخلص الخميرة. كما تفوَّقت في المقابل قيم مؤشِّرات النشاط النَّوعيّ ونسبة نشاط التخثر/النشاط البروتيوليتي عند إضافة مستخلص الخميرة بالتركيز الأمثل على القيم الناتجة عند إضافة الببتون، إذ بلغت قيم هذه المؤشِّرات 71.98 SU/mg و 460.76 على التَّوالي عند إضافة مستخلص الخميرة، بينما بلغت هذه القيم عند 70.50 SU/mg و259.59 على التَّوالي عند إضافة الببتون.

أشار العديد من الباحثين إلى ارتفاع نشاط تخثر الحليب لبروتياز *Rhizomucor miehei* بإغناء وسط التخمير بمسحوق الحليب المقشود (Preetha and Boopathy, 1994, 40; Thakur *et al*., 1990a, 19; Foda *et al*., 2012, 583f)، والكازئين (Silveira *et al*., 2005, 934; Foda *et al*., 2012, 583f)، ويعود ذلك إلى تحفيز إفراز البروتياز ونشاطه بفعل وجود الركازة المستهدَفة في وسط التخمير.

أخذت قيم المؤشِّرات الأنزيمية بالانخفاض بالتوازي مع الزيادة في نسب إضافة جميع المصادر النتروجينية. وقد أدَّت إضافة مستخلص الخميرة والببتون بالتراكيز 40 g/L و50 g/L إلى حدوث تثبيط كامل لإنتاج البروتياز في وسط التخمير.

ويُفسَّر انخفاض الإفراز والنشاط الأنزيمي المرافق للزيادة في تركيز المصدر النتروجيني وإتاحته بأنَّ الجينات المُشفِّرة للأنزيمات اللازمة لاستهلاك النتروجين تُنظَّم عادة بآليّات استحثاث أو تحفيز مُتخصِّصة تخضع لآليّة تحكُّم رئيسية تُعرف بآلية الكبح بنواتج هدم النتروجين (Nitrogen Catabolite Repression)، وتبعاً لهذه الآليّة فالجينات تُعبِّر بمستويات مرتفعة عند ظروف تحديد النتروجين فقط. أمّا النموّ بوجود مصادر جاهزة ومُفضَّلة من النتروجين، فإنَّه يؤدِّي إلى إعطاء إشارة لإيقاف التعبير الجيني للأنزيمات المحلِّلة (Marzluf, 1997, 17). ويمكن بذلك حفظ المصادر النتروجينية "مُكلِفة الاستقلاب" حتى استهلاك المصادر المُفضَّلة أو المُتاحة (Berger *et al*., 2008, 1386)، إذ تنتشر هذه الظاهرة في العديد من أنواع الفطريات (Marzluf, 1997, 17-32). وهذه النتائج تُشابه ما توصَّل إليه Escobar وBarnett (1995، 697)، وSilveira وزملاؤه (2005، 934)، وDe Lima وزملاؤه (2008، 579f)، حول ظهور التَّثبيط الاستقلابي بارتفاع تراكيز المصدر النتروجيني.

الجدول 11: تأثير النتروجين في إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* بالتخمير السائل.

المصدر النتروجيني	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	نشاط تخثُّر الحليب (SU/mL)	نشاط التخثُّر النَّوعيّ (SU/mg)	النشاط البروتيوليتي (PU/mL)	نشاط التخثُّر/ النشاط البروتيوليتي
سلفات الأمونيوم	1.90 ± 0.04^{ab}	123.53 ± 13.98^{ai}	65.02 ± 8.47^{ae}	0.41 ± 0.05^{a}	301.29 ± 3.80^{a}
كازئين					
10 g/L	2.16 ± 0.04^{ab}	369.72 ± 21.97^{b}	171.17 ± 7.17^{b}	0.68 ± 0.06^{b}	543.71 ± 22.33^{b}
20 g/L	2.13 ± 0.05^{ab}	343.14 ± 21.54^{c}	161.10 ± 6.71^{b}	0.64 ± 0.07^{b}	536.16 ± 35.76^{b}
30 g/L	2.11 ± 0.04^{ab}	307.02 ± 18.42^{d}	145.51 ± 6.43^{c}	0.90 ± 0.10^{c}	341.13 ± 24.97^{c}
40 g/L	1.90 ± 0.04^{ab}	162.04 ± 8.2^{e}	85.28 ± 3.94^{d}	1.20 ± 0.10^{d}	135.03 ± 6.29^{d}
50 g/L	1.82 ± 0.04^{b}	157.89 ± 14.73^{e}	86.75 ± 6.59^{d}	1.40 ± 0.17^{e}	112.78 ± 4.55^{e}
مستخلص الخميرة					
10 g/L	1.92 ± 0.04^{ab}	138.20 ± 6.9^{a}	71.98 ± 3.63^{ae}	0.30 ± 0.01^{f}	460.76 ± 10.82^{f}
20 g/L	1.2 ± 0.01^{c}	65.54 ± 4.11^{f}	54.62 ± 4.24^{af}	0.23 ± 0.02^{g}	284.96 ± 9.85^{g}
30 g/L	0.98 ± 0.01^{c}	30 ± 1.57^{g}	35.71 ± 3.01^{g}	0.20 ± 0.01^{g}	175 ± 1.28^{h}
40 g/L	0.92 ± 0.01^{c}	0^{h}	0^{h}	0.03 ± 0.01^{h}	0^{i}
50 g/L	0.92 ± 0.01^{c}	0^{h}	0^{h}	0.02 ± 0.01^{h}	0^{i}
ببتون					
10 g/L	2.10 ± 0.04^{ab}	106.29 ± 5.72^{i}	53.00 ± 3.36^{f}	0.28 ± 0.01^{f}	397.46 ± 8.83^{j}
20 g/L	2.30 ± 0.05^{a}	157.16 ± 7.11^{e}	70.50 ± 3.25^{e}	0.58 ± 0.05^{i}	279.59 ± 16.87^{g}
30 g/L	2.15 ± 0.04^{ab}	122.54 ± 6.32^{ai}	59.32 ± 3.44^{af}	0.46 ± 0.03^{j}	277.26 ± 6.17^{g}
40 g/L	0.90 ± 0.01^{c}	0^{h}	0^{h}	0.03 ± 0.01^{h}	0^{i}
50 g/L	0.87 ± 0.01^{c}	0^{h}	0^{h}	0.03 ± 0.01^{h}	0^{i}

* القيم في العمود الواحد الَّتي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.01.

وتَجدُر الإشارة إلى ارتفاع ملحوظ في الكتلة الحيويَّة للمزارع النّامية بوجود مستخلص الخميرة، إذ سُجِّلَت أعلى قيمة "17 g/L" عند التركيز 30 g/L، بينما سُجِّلت أعلى قيمة للكتلة الحيويَّة "8.2 g/L" في المزارع الحاوية على الكازئين بتركيز 10 g/L. لذا فقد اختُبِرَ تأثير الجمع بين مستخلص الخميرة والكازئين وفق عدّة نسب، وبوجود الجلوكوز بتركيز 40 g/L. ولم يَنتُج عن التراكيب المدروسة للمصدرين أي أثر معنوي في تحسين إنتاج البروتياز (البيانات غير مُدرَجة).

4-2-2- أمثلة ظروف التخمير السائل باستخدام منهجية الاستجابة السَّطحيَّة:

بناءً على نتائج الغربلة الأوَّليّة للركائز، فقد تمَّ اختيار الجلوكوز كمصدر كربوني، والكازئين كمصدر نتروجيني، وأضيفت بالتراكيز (30, 35, 40, 45, 50 g/L)، و(2, 6, 10, 14, 18 g/L) على التَّوالي ضمن معاملات التصميم الإحصائي.

ويُبيِّن الجدول 12 قيم المؤشِّرات الأنزيمية المُقاسة للمعاملات المختلفة، إذ تمَّ الحصول على أعلى قيم للمحتوى البروتيني، ونشاط تخثُّر الحليب من خلال المعاملات 36، و22 على التَّوالي، كما ظهرت أقل قيمة للنشاط الحالّ للبروتين للمستخلص الأنزيمي، وأقل نشاط نوعيّ حال للبروتين عند المعاملتين 35، و3 على التَّوالي. ومن جهة أخرى، فقد تفوَّقت قيم بعض المؤشِّرات، وتقاربت قيم أخرى في المعاملات 32، و33، و34 مع قيم المؤشِّرات المُقاسة في المعاملات آنفة الذكر (3, 22, 35, 36)، ما يشير إلى تباين تأثير ظروف التخمير في هذه المؤشِّرات من مؤشِّر إلى آخر.

الجدول 12: النتائج التجريبيَّة للتصميم الإحصائي الخاصّ بالتخمير السَّائل.

رقم المعاملة	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	نشاط تخثُّر الحليب MCA (SU/mL)	نشاط التخثُّر النَّوعي (SU/mg)	النشاط الحالّ للبروتين PA (PU/mL)	النشاط الحالّ النَّوعي (PU/mg)	نشاط التخثّر/ النشاط الحالّ 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

يُعَدّ عائد وجودة الأنزيم مؤشِّرات الاستجابة لأمثلة ظروف عملية إنتاج البروتياز، ما يقابل الحصول على أعلى محتوى بروتيني في المستخلص الأنزيمي، وأعلى نشاط لتخثُّر الحليب، مع أقل ظهور محتمل للنشاط الحالّ للبروتين، إذ تُمثِّل الأخيرتان المؤشِّرات المُحدِّدة لجودة البروتياز. وبناءً على ذلك فقد أُجريت منهجية الاستجابة السَّطحيَّة باستخدام تقنية الأمثلة متعدِّدة الاستجابة (Multi-response Optimization)، باختيار نشاط التخثُّر النَّوعيّ (spMCA)، ونسبة MCA/PA، كمتغيِّرات استجابة مُعبِّرة عن باقي المؤشِّرات المدروسة، بما يُحقِّق أعلى قيمة لكلٍ من المؤشِّرين معاً.

وقد أعطت نتيجة التحليل الإحصائي للنتائج معادلتين من الدرجة الثانية تُبيِّن العلاقة بين مؤشِّرات الاستجابة والعوامل المُرمَّزة (المعادلتين 1، و2).

(1): $spMCA= - 4498 + 9.36\ X_1 + 83.6\ X_2 + 401\ X_3 + 59.7\ X_4 + 62.6\ X_5 - 0.0506\ X_1^2 - 0.961\ X_2^2 - 25.49\ X_3^2 - 0.72\ X_4^2 - 2.148\ X_5^2 + 0.0384\ X_1*X_2 - 0.006\ X_1*X_3 - 0.0341\ X_1*X_4 - 0.0308\ X_1*X_5 - 1.99\ X_2*X_3 + 0.138\ X_2*X_4 - 0.196\ X_2*X_5 - 0.48\ X_3*X_4 + 0.26\ X_3*X_5 - 0.256\ X_4*X_5$

(2): $MCA/PA = -3915 + 9\ X_1 + 94.9\ X_2 + 357\ X_3 + 36.9\ X_4 + 17.1\ X_5 - 0.0562\ X_1^2 - 1.101\ X_2^2 - 22.52\ X_3^3 - 0.362\ X_4^2 - 1.898\ X_5^2 + 0.0555\ X_1*X_2 - 0.009\ X_1*X_3 - 0.0644\ X_1*X_4 + 0.0942\ X_1*X_5 - 1.84\ X_2*X_3 - 0.001\ X_2*X_4 + 0.130\ X_2*X_5 - 0.62\ X_3*X_4 + 1.74\ X_3*X_5 + 0.034\ X_4*X_5$

بحيث X_1، X_2، X_3، X_4، X_5 هي زمن التخمير، ودرجة الحرارة، ودرجة الـ pH، وتركيز الكربون، وتركيز النتروجين على التَّوالي. ويُبيِّن الجدولان 13، و15 نتائج تحليل التباين لدلالات العوامل المؤثِّرة وتفاعلها لكلٍ من معادلة نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة MCA/PA على التَّوالي. وقد كانت قيم الاحتماليّة (*P*) الخاصّة بمعادلتي الانحدار لكلٍ من نشاط التخثُّر ونسبة MCA/PA أقل من 0.05، ما يشير إلى الأثر المعنوي للعوامل المُستقلّة كَكُل (المُتغيِّرات المدروسة) في العوامل التابعة (مُتغيِّرات الاستجابة).

ويُبيِّن الجدول 13 أنَّ قيم الاحتماليّة لكلٍ من الزمن، ودرجة الحرارة، والـ pH أقل من 0.05، وبالتالي هناك تأثير خَطِّيّ معنوي لهذه المتغيِّرات في نشاط التخثُّر النَّوعيّ. كما كان لتربيع هذه العوامل أثر معنوي في نشاط التخثُّر النَّوعيّ، إذ كانت قيم الاحتماليّة الخاصّة بهذه المتغيِّرات أقل من 0.05، ما يشير إلى التأثير الشَّديد لهذه العوامل في نشاط التخثُّر النَّوعيّ.

وكانت قيم الاحتماليّة للكربون، والنتروجين، أكبر من 0.05، ما يعني أنه ليس لهذين العاملين تأثير خَطِّيّ معنوي في نشاط التخثُّر النَّوعيّ، بينما كانت قيم الاحتماليّة لمربع كلٍ من العاملين أقل من 0.05، ما يشير إلى الأثر المعنوي لتربيع هذين العاملين في نشاط التخثُّر النَّوعيّ، لذا تأخذ العلاقة ما بين كلٍ من هذين العاملين ونشاط التخثُّر النَّوعيّ شكلاً مُنحنياً. ولم يظهر أثر معنوي لتفاعل المتغيِّرات المُستقلّة فيما بينها في نشاط التخثُّر النَّوعيّ.

ويبيِّن الجدول 15 أنَّ هناك تأثيراً خَطِّيّاً معنوياً لكلٍ من الزمن، ودرجة الحرارة، والـ pH في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين. كما كان لتربيع هذه العوامل تأثير معنوي في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين، ما يشير إلى التأثير الشَّديد لهذه العوامل في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين. ولم يكن للنتروجين تأثير خَطِّيّ معنوي في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين، ومن جهة أخرى كان لتربيع النتروجين تأثير معنوي في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين، لذا تأخذ العلاقة ما بين هذا العامل ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين شكلاً مُنحنياً. ولم يكن للكربون تأثير خَطِّيّ معنوي، كما لم يكن لتربيع هذا العامل أثر معنوي في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين، ما يشير إلى عدم التأثير المعنوي لهذا العامل في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين. ولم يظهر أيّ أثر معنوي لتفاعل المتغيِّرات المُستقلّة فيما بينها في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين.

وكانت قيم معامل التحديد (R^2) الخاصّة بمعادلتي الانحدار لكلٍ من نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين 90%، و90.54% على التَّوالي، ما يعني أنَّ العوامل المُستقلّة مسؤولة عن 90%، و90.54% من التباين في العوامل التابعة هذه. وكانت قيم الانحراف المعياري لكلٍ من نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين 33.59 و30.72 على التَّوالي، وتشير قيم الانحراف المعياري المنخفضة هذه إلى قرب توزُّع القيم المُقاسة من المتوسط. كما كانت قيم الاحتماليّة لنقص التطبيق (Lack-of-Fit) الخاصّة بمعادلتي الانحدار لكلٍ من نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين أكبر من 0.05، ما يؤكِّد كفاءة معادلتي الانحدار في تحديد العلاقة بين العوامل المُستقلّة والعوامل التابعة.

ويمكن اختزال معادلتي الانحدار لكلٍ من نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين، بحذف المتغيِّر الأقل معنوية، وإعادة تحليل الانحدار، وصولاً إلى أقل عدد من المتغيِّرات غير المعنوية، مع الحفاظ على التَّسلسل الهرمي لمعادلة الانحدار (أي إبقاء العوامل الخَطِّيّة غير المعنوية، إن كان لتربيع هذه العوامل أو تفاعلها أثر معنوي في المعادلة) (Crawley, 2007, 327; Minitab Inc, n.d, para 5). وقد أعطت عملية الاختزال المعادلتين الآتيتين:

$$sp\ MCA = -4044 + 9.20\ X_1 + 80.0\ X_2 + 304.3\ X_3 + 57.7\ X_4 + 43.63\ X_5 - 0.0506\ X_1^2 - 0.961\ X_2^2 - 25.49\ X_3^2 - 0.720\ X_4^2 - 2.148\ X_5^2 \quad (3).$$

$$MCA/PA = -2566 + 8.41\ X_1 + 76.5\ X_2 + 230.3\ X_3 + 33.49\ X_5 - 0.0483\ X_1^2 - 0.920\ X_2^2 - 17.99\ X_3^2 - 1.615\ X_5^2 \quad (4).$$

بحيث إنَّ X_1، X_2، X_3، X_4، X_5 هي زمن التخمير، ودرجة الحرارة، ودرجة الـ pH، وتركيز المصدر الكربوني، وتركيز المصدر النتروجيني على التَّوالي.

ويُبيِّن الجدولان 17 و19 تحليل التباين لمعادلتي الانحدار المُختزَلة لكلٍ من نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين. كما يُبيِّن الجدولان 18 و20 تأثير العوامل في نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين على التَّوالي وفق معادلتي الانحدار المُختزَلتين. وقد كانت قيم معامل التحديد الخاصّة بمعادلتي الانحدار المُختزَلة لكلٍ من نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين 87.34%، و84.94% على التَّوالي، ما يعني أنَّ العوامل المُستقلّة مسؤولة عن 87.34%، و84.94% من التباين في العوامل التابعة وفق هذه المعادلة. وكانت قيم الانحراف المعياري لكلٍ من نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين 31.34 و31.17 على التَّوالي. وتشير قيم الانحراف المعياري المنخفضة هذه إلى قرب توزُّع القيم المُقاسة من المتوسط. كما كانت قيم الاحتماليّة لنقص التطبيق الخاصّة بمعادلة الانحدار المُختزَلة لنشاط التخثُّر النَّوعيّ أكبر من 0.05، ما يؤكِّد كفاءة معادلة الانحدار هذه في تحديد العلاقة بين العوامل المُستقلّة، والعوامل التابعة.

الجدول 13: تحليل التباين لمعادلة الانحدار لنشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ للبروتياز المُنتَج بالتخمير السائل.

المصدر	درجة الحرية DF	مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj SS	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj MS	مؤشِّر فيشر F-Value	قيم الاحتماليّة *P*-Value
الانحدار	21	223435	10639.7	9.43	0.000
المُكرَّرات	1	15976	15976.2	14.16	0.001
التأثير الخَطيّ	5	191698	38339.5	33.98	0.000
الزمن	1	83772	83772.0	74.25	0.000
الحرارة	1	9866	9865.7	8.74	0.007
pH	1	97739	97739.5	86.63	0.000
الكربون	1	30	30.3	0.03	0.871
النتروجين	1	290	290.1	0.26	0.617
تأثير تربيع 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
الزمن*pH	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
الحرارة*pH	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
الكربون*pH	1	187	187.4	0.17	0.688
النتروجين*pH	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 14: تأثير العوامل المدروسة في نشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ للبروتياز المُنتَج بالتخمير السائل.

العامل	التأثير	معامل الانحدار	الخطأ المعياري للمعامل	قيم T	قيم الاحتماليّة *P*-Value	معامل تضخم التباين VIF
الثابت	-	282.8	27.7	10.21	0.000	
المُكرَّرات						
1		29.56	7.86	3.76	0.001	1.91
الزمن	183.1	91.5	10.6	8.62	0.000	1.00
الحرارة	62.8	31.4	10.6	2.96	0.007	1.00
pH	197.7	98.9	10.6	9.31	0.000	1.00
الكربون	3.5	1.7	10.6	0.16	0.871	1.00
النتروجين	10.8	5.4	10.6	0.51	0.617	1.00
الزمن*الزمن	-233.3	-116.6	33.6	-3.47	0.002	1.73
الحرارة*الحرارة	-192.1	-96.1	33.6	-2.86	0.009	1.73
pH*pH	-203.9	-102.0	33.6	-3.04	0.006	1.73
الكربون*الكربون	-143.9	-72.0	33.6	-2.14	0.043	1.73
النتروجين*النتروجين	-274.9	-137.5	33.6	-4.09	0.000	1.73
الزمن*الحرارة	36.9	18.5	23.8	0.78	0.445	1.00
الزمن*pH	-1.1	-0.6	23.8	-0.02	0.981	1.00
الزمن*الكربون	-32.7	-16.3	23.8	-0.69	0.498	1.00
الزمن*النتروجين	-23.7	-11.8	23.8	-0.50	0.623	1.00
الحرارة*pH	-79.7	-39.8	23.8	-1.68	0.108	1.00
الحرارة*الكربون	27.6	13.8	23.8	0.58	0.567	1.00
الحرارة*النتروجين	-31.4	-15.7	23.8	-0.66	0.516	1.00
الكربون*pH	-19.4	-9.7	23.8	-0.41	0.688	1.00
النتروجين*pH	8.5	4.2	23.8	0.18	0.860	1.00
الكربون* النتروجين	-41.0	-20.5	23.8	-0.86	0.397	1.00

الجدول 15: تحليل التباين لمعادلة الانحدار لنسبة MCA/PA للبروتياز المُنتَج بالتخمير السائل.

المصدر	درجة الحرية DF	مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj SS	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj MS	مؤشِّر فيشر F-Value	قيم الاحتماليّة *P*-Value
الانحدار	21	198641	9459	10.02	0.000
المُكرَّرات	1	13205	13205	13.99	0.001
التأثير الخَطِّيّ	5	159423	31885	33.78	0.000
الزمن	1	48245	48245	51.11	0.000
الحرارة	1	8407	8407	8.91	0.007
pH	1	101650	101650	107.70	0.000
الكربون	1	207	207	0.22	0.644
النتروجين	1	914	914	0.97	0.336
تأثير تربيع العوامل	5	26954	5391	5.71	0.002
الزمن*الزمن	1	16753	16753	17.75	0.000
الحرارة*الحرارة	1	12113	12113	12.83	0.002
pH*pH	1	8111	8111	8.59	0.008
الكربون*الكربون	1	1310	1310	1.39	0.251
النتروجين*النتروجين	1	14750	14750	15.63	0.001
التفاعل ثنائي الاتجاه	10	10755	1076	1.14	0.379
الزمن*الحرارة	1	1419	1419	1.50	0.233
الزمن*pH	1	1	1	0.00	0.970
الزمن*الكربون	1	1914	1914	2.03	0.168
الزمن*النتروجين	1	2618	2618	2.77	0.110
الحرارة*pH	1	2712	2712	2.87	0.104
الحرارة*الكربون	1	0	0	0.00	0.996
الحرارة*النتروجين	1	217	217	0.23	0.637
الكربون*pH	1	311	311	0.33	0.572
النتروجين*pH	1	1548	1548	1.64	0.214
الكربون* النتروجين	1	15	15	0.02	0.902
الخطأ	22	20765	944	-	-
نقص التطبيق	21	20764	989	1014.97	0.025
الخطأ النقي	1	1	1	-	-
المجموع	43	219406	-	-	-

الجدول 16: تأثير المتغيّرات المدروسة في نسبة MCA/PA للبروتياز المُنتَج بالتخمير السائل.

العامل	التأثير	معامل الانحدار	الخطأ المعياري للمعامل	قيم T	قيم الاحتماليّة *P*-Value	معامل تضخم التباين VIF
الثابت	–	274.4	25.3	10.83	0.000	
المُكرَّرات						
1		26.87	7.18	3.74	0.001	1.91
الزمن	138.92	69.46	9.72	7.15	0.000	1.00
الحرارة	57.99	29.00	9.72	2.98	0.007	1.00
pH	201.64	100.82	9.72	10.38	0.000	1.00
الكربون	9.09	4.55	9.72	0.47	0.644	1.00
النتروجين	19.12	9.56	9.72	0.98	0.336	1.00
الزمن*الزمن	-258.9	-129.4	30.7	-4.21	0.000	1.73
الحرارة*الحرارة	-220.1	-110.1	30.7	-3.58	0.002	1.73
pH*pH	-180.1	-90.1	30.7	-2.93	0.008	1.73
الكربون*الكربون	-72.4	-36.2	30.7	-1.18	0.251	1.73
النتروجين*النتروجين	-242.9	-121.5	30.7	-3.95	0.001	1.73
الزمن*الحرارة	53.3	26.6	21.7	1.23	0.233	1.00
الزمن*pH	-1.7	-0.8	21.7	-0.04	0.970	1.00
الزمن*الكربون	-61.9	-30.9	21.7	-1.42	0.168	1.00
الزمن*النتروجين	72.4	36.2	21.7	1.67	0.110	1.00
الحرارة*pH	-73.6	-36.8	21.7	-1.70	0.104	1.00
الحرارة*الكربون	-0.2	-0.1	21.7	-0.01	0.996	1.00
الحرارة*النتروجين	20.8	10.4	21.7	0.48	0.637	1.00
الكربون*pH	-25.0	-12.5	21.7	-0.57	0.572	1.00
النتروجين*pH	55.6	27.8	21.7	1.28	0.214	1.00
الكربون* النتروجين	5.4	2.7	21.7	0.12	0.902	1.00

الجدول 17: تحليل التباين لمعادلة الانحدار المُختزَلة لنشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ للبروتياز المُنتَج بالتخمير السائل.

المصدر	درجة الحرية DF	مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj SS	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj MS	مؤشِّر فيشر F-Value	قيم الاحتماليّة *P*-Value
الانحدار	11	216827	19711.6	20.07	0.000
المُكرَّرات	1	15976	15976.2	16.27	0.000
التأثير الخَطِّيّ	5	191698	38339.5	39.04	0.000
الزمن	1	83772	83772	85.29	0.000
الحرارة	1	9866	9865.7	10.04	0.003
pH	1	97739	97739.5	99.51	0.000
الكربون	1	30	30.3	0.03	0.862
النتروجين	1	290	290.1	0.30	0.591
تأثير تربيع العوامل	5	23048	4609.6	4.69	0.003
الزمن*الزمن	1	13604	13603.6	13.85	0.001
الحرارة*الحرارة	1	9230	9230.3	9.40	0.004
pH*pH	1	10394	10394.2	10.58	0.003
الكربون*الكربون	1	5178	5178.2	5.27	0.028
النتروجين	1	18893	18892.8	19.24	0.000
الخطأ	32	31430	982.2	-	-
نقص التطبيق	31	31403	1013.0	38.38	0.127
الخطأ النقي	1	26	26.4	-	-
المجموع	43	248257	-	-	-

الجدول 18: تأثير المتغيّرات في نشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ للبروتياز المُنتَج بالتخمير السائل، وفق المعادلة المُختزَلة.

العامل	التأثير	معامل الانحدار	الخطأ المعياري للمعامل	قيم T	قيم الاحتماليّة *P*-Value	معامل تضخم التباين VIF
الثابت	-	282.8	25.8	10.94	0.000	-
المُكرَّرات						
1		29.56	7.33	4.03	0.000	1.91
الزمن	183.05	91.53	9.91	9.24	0.000	1.00
الحرارة	62.82	31.41	9.91	3.17	0.003	1.00
pH	197.73	98.86	9.91	9.98	0.000	1.00
الكربون	3.48	1.74	9.91	0.18	0.862	1.00
النتروجين	10.77	5.39	9.91	0.54	0.591	1.00
الزمن*الزمن	-233.3	-116.6	31.3	-3.72	0.001	1.73
الحرارة*الحرارة	-192.1	-96.1	31.3	-3.07	0.004	1.73
pH*pH	-230.9	-102.0	31.3	-3.25	0.003	1.73
الكربون*الكربون	-143.9	-72.0	31.3	-2.30	0.028	1.73
النتروجين * النتروجين	-274.9	-137.5	31.3	-4.39	0.000	1.73

الجدول 19: تحليل التباين لمعادلة الانحدار المُختزَلة لنسبة MCA/PA للبروتياز المُنتَج بالتخمير السائل.

المصدر	درجة الحرية DF	مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj SS	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj MS	مؤشِّر فيشر F-Value	قيم الاحتماليّة *P*-Value
الانحدار	9	186369	20708	21.31	0.000
المُكرَّرات	1	12787	12787	13.16	0.001
التأثير الخطِّيّ	4	159216	39804	40.96	0.000
الزمن	1	48245	48245	49.65	0.000
الحرارة	1	8407	8407	8.65	0.006
pH	1	101650	101650	104.61	0.000
النتروجين	1	914	914	0.94	0.339
تأثير ترييع العوامل	4	25645	6411	6.60	0.000
الزمن*الزمن	1	16528	16528	17.01	0.000
الحرارة*الحرارة	1	11277	11277	11.61	0.002
pH*pH	1	6906	6906	7.11	0.012
النتروجين*النتروجين	1	14243	14243	14.66	0.001
الخطأ	34	33036	972	-	-
نقص التطبيق	33	33035	1001	1027.61	0.025
الخطأ النقي	1	1	1	-	-
المجموع	43	219406	-	-	-

الجدول 20: تأثير المتغيِّرات في نسبة MCA/PA للبروتياز المُنتَج بالتخمير السائل، وفق المعادلة المُختزَلة.

العامل	التأثير	معامل الانحدار	الخطأ المعياري للمعامل	قيم T	قيم الاحتماليّة *P*-Value	معامل تضخم التباين VIF
الثابت		251.8	16.8	15.02	0.000	
المُكرَّرات						
1		22.35	6.16	3.63	0.001	1.36
الزمن	138.92	69.46	9.86	7.05	0.000	1.00
الحرارة	57.99	29.00	9.86	2.94	0.006	1.00
pH	201.64	100.82	9.86	10.23	0.000	1.00
النتروجين	19.12	9.56	9.86	0.97	0.339	1.00
الزمن*الزمن	-222.7	-111.3	27	-4.12	0.000	1.30
الحرارة*الحرارة	-183.9	-92.0	27	-3.41	0.002	1.30
pH*pH	-143.9	-72.0	27	-2.67	0.012	1.30
النتروجين*النتروجين	-206.7	-103.4	27	-3.83	0.001	1.30

تأثير زمن التخمير: كان إنتاج الأنزيم في اليوم الأوَّل من التحضين منخفضاً، كما كان النشاط الأنزيمي لا يُذكر، رُبَّما بسبب عدم كفاية الوقت لإنبات الأبواغ الفطرية. وازداد إنتاج الأنزيم ونشاطه في الأيام التالية. وقد أشارت نتائج التحليل الإحصائي إلى الوصول للعملية الأمثل لإنتاج الأنزيم بعد 89.94 ساعة من التحضين. ويُعزى ذلك إلى الزمن اللّازم لنموّ المزرعة والوصول لطور الثَّبات، إذ يزداد إنتاج البروتياز في نهاية الطور اللوغاريتمي وبداية طور الثَّبات (Alvarez *et al*., 2006, 629; Sharma and Singh, 2016, 41). وقد أشار Escobar و Barnett (1995، 697f) إلى وصول مزارع الفطر *Rhizomucor miehei* إلى طور الثَّبات خلال 90–120 ساعة في ظروف نموّ مشابهة.

انخفض إنتاج الإنزيم ونشاطه بعد اليوم الرابع من التحضين، رُبَّما بسبب استنفاد المُغذِّيات، أو تخريب الأنزيم بفعل الحرارة المتولِّدة عن الاستقلاب، أو التَّثبيط بفعل تراكم نواتج الاستقلاب الثانويّة، أو تراكم الحموض العضويَّة، وبالتالي انخفاض درجة الحموضة. وقد يعود ذلك إلى ما يعرف بالتَّثبيط الاسترجاعي (Feedback Repression)، إذ يؤدِّي التَّراكم الزائد للمنتج (الأنزيم) إلى تثبيط تخليقه بالتَّناسب مع درجة التَّراكم (Escobar and Barnett, 1993, 1012). نتائج مقاربة توصَّل إليها Beyenal وزملاؤه (1999، 529)، و Escobar و Barnett (1993، 1012f).

تأثير درجة الحرارة: انخفض إنتاج الأنزيم ونشاطه، كما كان النموّ الفطري ضعيفاً عند درجة حرارة 30℃. يُعَدّ الفطر *Rhizomucor miehei* من الأنواع المُحبّة للحرارة المرتفعة (thermophilic). ومن المُتوقَّع تحسُّن النموّ عند درجات الحرارة الأكثر ارتفاعاً، ما ينعكس على تخليق الأنزيمات، حيث لوحظ أعلى نشاط للأنزيم عند درجة حرارة 40℃. وانخفض نشاط الأنزيم عند المستويات الأعلى لدرجة الحرارة، وقد يعود ذلك إلى تجاوز الحرارة المثالية للنموّ، أو تخريب الأنزيم جزئياً في وسط التخمير. نتائج مشابهة توصَّل إليها Ayhan وزملاؤه (2001، 157).

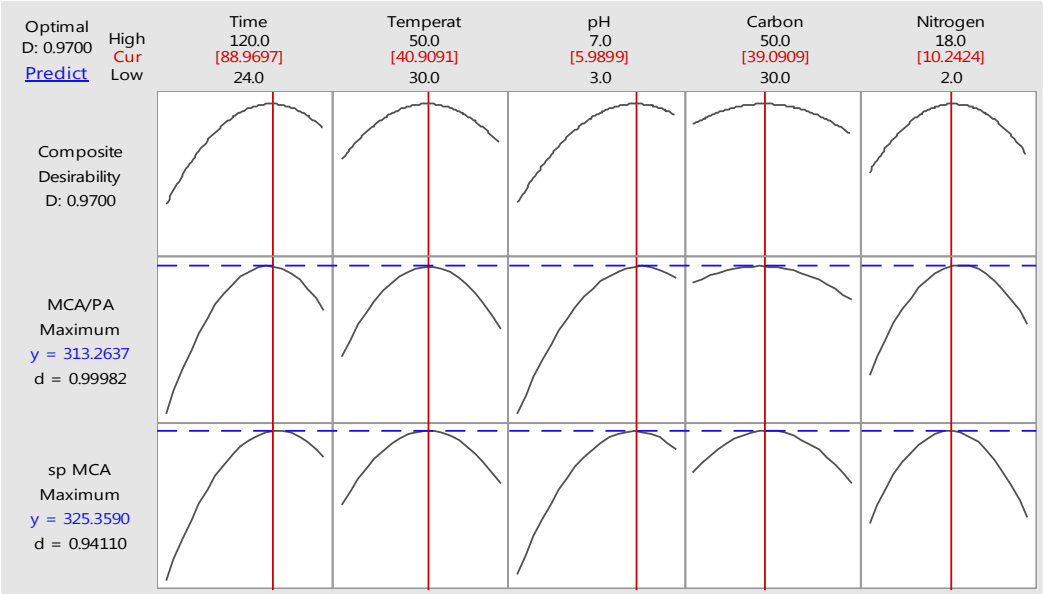
تأثير الرقم الهيدروجيني: تثبَّط إنتاج البروتياز، وكان النموّ الفطري لا يُذكَر عند قيم الـ pH المنخفضة (3)، وتبدو القيم المنخفضة للـ pH غير ملائمة لإتاحة بعض المُغذِّيات وعوامل النموّ الضروريّة لنمو هذا النَّوع وإنتاجه للأنزيمات، كما قد تكون هذه القيم غير مناسبة لبعض الأنشطة الاستقلابية للفطر ونشاط أنزيماته الخارجيّة، ما ينعكس بدوره على تخليق البروتياز. ازداد النموّ والنشاط الإنزيم تدريجيّاً بارتفاع الرقم الهيدروجيني، وصولاً إلى قيم الاستجابة المثلى عند pH 5.99. وانخفض إنتاج البروتياز ونشاطه عند قيم الـ pH الأعلى (7)، ويعزى ذلك أيضاً إلى تأثُّر

نشاط الأنزيمات ودرجة إتاحة بعض العناصر بانخفاض تراكيز أيونات الهيدروجين في وسط التخمير. نتائج مشابهة توصَّل إليها Silveira وزملاؤه (2005، 935)، وAyhan وزملاؤه (2001، 157f).

تأثير تركيز الكربون: كان التركيز الأمثل لإضافة الجلوكوز هو 39.09 g/L، وقد أعطت التراكيز الأخرى قيماً أدنى للمؤشِّرات المدروسة. ويعود انخفاض إنتاج البروتياز ونشاطه في المعاملات ذات التراكيز المنخفضة للجلوكوز في وسط التخمير إلى عدم كفاية هذه التراكيز للوصول للكتلة الخلويَّة المطلوبة وإنتاج الأنزيمات. أمّا انخفاض إنتاج البروتياز المرافق لتراكيز الجلوكوز الأكثر ارتفاعاً، فيعود إلى حدوث الكبح بنواتج هدم الكربون. ويختلف التركيز الأمثل لإضافة الجلوكوز عن التراكيز الَّتي أشار إليها Ayhan وزملاؤه (2001، 156f)، وAmer وزملاؤه (2015، 1074)، وSilveira وزملاؤه (2005، 933).

تأثير تركيز الكازئين: تشير النتائج إلى تحقُّق القيم المثلى لمؤشِّرات الاستجابة عند إضافة الكازئين بتركيز 10.24 g/L، وتظهر قيم أدنى للمؤشِّرات عند التراكيز الأخرى. ويعود الانخفاض المرافق للتراكيز الدنيا من الكازئين إلى عدم كفايتها لتحفيز إنتاج البروتياز ونشاطه، أمّا انخفاض الإنتاج المرافق للتراكيز المرتفعة فيعود إلى الكبح بنواتج هدم النتروجين. وتقارب الإضافة المثلى للكازئين النسبة "9 g/L"، الَّتي أشار إليها De Lima وزملاؤه (2008، 579f).

ويُبيِّن الشكل 9 الظروف المثلى لإنتاج البروتياز بما يُحقِّق، الحصول على أعلى قيم لكلٍ من نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين. إذ تمثَّلت هذه الظروف في التحضين عند درجة حرارة 40.9 ℃، لمُدَّة 89.94 ساعة، وضَبط درجة الحموضة الابتدائية عند 5.99، وإضافة الجلوكوز والكازئين بالتراكيز 39.09 g/L، و10.24 g/L على التَّوالي. وقد أعطت عملية التخمير 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، ونشاط تخثُّر الحليب، والنشاط التخثُّر النَّوعيّ، والنشاط الحالّ للبروتين النَّوعيّ، ونسبة MCA/PA على التَّوالي. وقد كانت قيم نشاط التخثُّر النَّوعيّ ونسبة MCA/PA مقاربة للقيم المتوقَّعة وفق معادلتي الانحدار عند تطبيق الظروف المثلى للإنتاج، وهي 325.36±20.30 SU/mg و313.26±18.6 على التَّوالي.



الشكل 9: أمثلة إنتاج البروتياز بالتخمير السائل (متعدِّدة الاستجابة). تُمثِّل الأعمدة تأثير العوامل المُستقلّة كلاً على حدة في عوامل الاستجابة (الصفوف). تُمثِّل الخطوط الحمراء العمودية القيم المثالية للعوامل المُستقلّة الَّتي تُحقِّق القيم المرغوبة لعوامل الاستجابة. وتُمثِّل الخطوط الزرقاء الأفقية القيم المتوقَّعة لعوامل الاستجابة عند تطبيق القيم المثلى للعوامل المُستقلّة. وتشير الأرقام في الصف العلوي إلى مجال القيم لكل عامل وقيمته المثالية (مدرجة باللون الأحمر). ويشير الرمز (Y) في العمود الأيسر إلى القيم المثلى لعوامل الاستجابة (مدرجة باللون الأزرق)، (D): هي الرغبة المركبة لجميع المؤشِّرات، (d): الرغبة المنفصلة لكل مؤشِّر على حدة، ($0 \leq di \leq 1$): حيث إنَّ القيم الأعلى لمؤشِّر الرغبة هي القيم المُفضَّلة، إذ تُمثِّل (1) تحقيق الرغبة المثالية.

4-3- أمثلة التخمير الصّلب:

4-3-1- دراسة تركيب وسط التخمير الصّلب:

4-3-1-1- غربلة الركائز: استُخدِمَت نخالة القمح كركازة أساسيّة وأُجرِيَ الاستبدال الجزئي لدقيق القمح، ومسحوق الذُّرة، ومسحوق فول الصويا بنخالة القمح كلاً على حدة بنسب 10-40%، ولم يُضَف مصدر نتروجيني آخر في هذه المرحلة. رُطِّبت الأوساط بنسبة 60%، وأُنجِزَ الاستنبات لمُدَّة 6 أيام وعند درجة حرارة 37℃. ويُبيِّن الجدول 21 اختلاف المحتوى والنشاط الأنزيمي للمستخلص الأنزيمي المُنتَج باختلاف تركيب وسط التخمير. وتظهر الفروق المعنوية في قيم المؤشِّرات المدروسة للأنزيم المُنتَج باستخدام وسط نخالة القمح بدون إضافة مقارنة بأوساط التخمير الأخرى. وقد أعطت الأوساط المُدَعَّمة بالذُّرة قيماً أقل منها في وسط نخالة القمح تَبِعها الأوساط المدعمة بدقيق القمح وفول الصويا على التَّوالي. وكان هناك انخفاض تدريجي في جميع المؤشِّرات وظهرت الفروق المعنوية بشكل واضح بزيادة نسبة الاستبدال.

ويُعزى التباين في الإنتاج الأنزيمي في الأوساط المختلفة إلى اختلاف الطبيعة الفيزيائيَّة والكيمائيّة للركائز، ومن أهم العوامل الفيزيائيَّة حجم جزيئات الركازة، والمساحة السَّطحيَّة الَّتي تتعرَّض لفعل الأحياء الدقيقة، وحجم المسامّ. إذ تُوفِّر الجزيئات ذات الحجم الأصغر مساحة سطحية أكبر للنشاط الميكروبي، إلا أنَّ الجزيئات بالغة الصغر قد تؤدي إلى تكتُّل الركازة، ما قد يؤثِّر في التهوية والتنفس الميكروبي، وبالتالي ضَعف النموّ (Krishna, 2005, 6). كما أنَّ الأعداد الكبيرة من الجسيمات الدقيقة ستملأ الفراغات البينيّة ضمن عدد من الجزيئات الكبيرة (Chisti, 2014, 758)، وهذا ما يُفسِّر تراجع الإنتاج والنشاط الأنزيمي بإضافة دقيق القمح وزيادة نسبة الاستبدال. وإنَّ قدرة جزيئات نخالة القمح على البقاء مُتفكِّكة تحت ظروف الرطوبة المرتفعة تُوفِّر مساحة سطحية واسعة للتفاعل، ما يجعلها إحدى الركائز شائعة الاستخدام في التخمُّرات الصّلبة (Pandey *et al*., 2000, 1156).

أمّا الخواصّ الكيميائيَّة للركائز المؤثِّرة في إنتاج البروتياز، فتعود إلى تركيب الركائز سواءً كانت بسيطة أم مُعقَّدة ودرجة إتاحتها، بالإضافة إلى نوع ونسب المواد العضويَّة المكوِّنة للركازة، ودرجة احتواء الركازة على المُغذِّيات. وقد أُشير إلى انخفاض إنتاج البروتياز من *Aspergillus niger* و*Penicillium camemberti* بانخفاض نسبة الكربون/النتروجين (C/N) في وسط التخمير

الصّلب (Aguilar *et al*., 2002, 411; Boratyński *et al*., 2018, 5). وتصل نسب C/N في الركائز المستخدمة إلى ما يقارب 39.1/1.26، و44.7/2.20، و50.70/2.28، و45.40/6.71 لكلٍ من دقيق القمح، ونخالة القمح، والذُّرة، وفول الصويا على التَّوالي (Dai *et al*., 2014, 73; Sipos *et al*., 2005, 404ff). وهذا ما يُفسِّر انخفاض إنتاج البروتياز بالتوازي مع نسب إضافة مسحوق فول الصويا.

تؤثِّر التراكيز المرتفعة من السكريات سهلة الاستقلاب بشكل سلبيّ في إنتاج البروتياز بالرّغم من تحفيزها للنموّ (Mamo *et al*., 2020, 577; Lario *et al*., 2020). ورُبَّما أدّى المحتوى العالي من السُّكَّريّات المُختزَلة الناتجة عن حلمهة النشاء في دقيق القمح والذُّرة إلى حدوث الكبح بنواتج هدم الكربون. وقد ظهر تأثير هذه الآليّة بشكل أقل منه في التخمير بالحالة السائلة، وهذا يوافق نتائج العديد من الأبحاث حول محدوديّة ظهور الكبح بنواتج هدم الكربون في نظام التخمير بالحالة الصّلبة (Nandakumar *et al*., 1999, 380).

وقد يُعزى انخفاض النشاط الأنزيمي بإضافة مسحوق الذُّرة وفول الصويا إلى وجود مُثبِّطات البروتياز مثل السيستاتين في الذُّرة (Abe *et al*., 1992, 933)، ومُثبِّطات بومان بيرك (Bowman-Birk) في فول الصويا (Losso, 2008, 94). ويعود الإنتاج المرتفع للبروتياز باستخدام نخالة القمح إلى احتوائها على الكمِّيَّات الكافية والنسبة المعتدلة من الكربون والنتروجين (C/N) والعناصر المعدنية الَّتي تحتاجها الكائنات الحية الدقيقة للنموّ وإنتاج الأنزيمات. وهذه النتائج تُشابه ما توصَّل إليه Khademi وزملاؤه (2013، 117f) حول تراجع إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei*، بإضافة دقيق الذُّرة ودقيق القمح إلى نخالة القمح في وسط التخمير. وتخالف ما توصَّل إليه Thakur وزملاؤه (1990a، 18) حول تحسُّن إنتاج البروتياز بإضافة دقيق القمح إلى نخالة القمح في وسط التخمير الصّلب. واعتماداً على هذه النتائج، فقد تمَّ اختيار نخالة القمح من دون استبدال كركازة في الخطوات اللّاحقة من الدراسة.

الجدول 21: تأثير تركيب وسط التخمير الصّلب في إنتاج البروتياز من فطر *Rhizomucor miehei*.

تركيب وسط التخمير	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	نشاط تخثُّر الحليب (SU/mL)	نشاط التخثُّر النَّوعيّ (SU/mg)	النشاط البروتيوليتي (PU/mL)	نشاط التخثُّر/ النشاط البروتيوليتي
نخالة القمح بدون استبدال	1.44 ± 0.04^{a}	364.6 ± 30.94^{a}	253.19 ± 14.33^{a}	1.2 ± 0.06^{a}	301.81 ± 9.30^{a}
مسحوق الذُّرة المستبدل بنخالة القمح					
%10	1.36 ± 0.04^{b}	314.66 ± 9.24^{b}	231.36 ± 0.05^{b}	1.44 ± 0.13^{ab}	220.03 ± 12.63^{b}
%20	1.32 ± 0.01^{b}	296.44 ± 11.4^{bc}	213.15 ± 6.77^{b}	1.38 ± 0.10^{ac}	216 ± 7.41^{b}
%30	1.16 ± 0.01^{c}	275.8 ± 5.72^{cde}	237.75 ± 3.14^{ab}	1.61 ± 0.17^{bcd}	172.19 ± 13.37^{c}
%40	1.14 ± 0.01^{cd}	265.09 ± 6.03^{dh}	232.27 ± 3.86^{b}	1.21 ± 0.10^{a}	219.99 ± 14.02^{b}
دقيق القمح المستبدل بنخالة القمح					
%10	1.44 ± 0.03^{a}	295.33 ± 11.48^{be}	205.09 ± 3.63^{c}	2.08 ± 0.25^{be}	142.16 ± 10.72^{d}
%20	1.18 ± 0.01^{c}	221.23 ± 12.71^{fg}	187.09 ± 8.87^{e}	1.28 ± 0.05^{ad}	172.92 ± 6.45^{c}
%30	1.1 ± 0.01^{de}	206.89 ± 3.57^{gi}	188.12 ± 2.44^{e}	2.64 ± 0.20^{f}	78.64 ± 5.01^{ef}
%40	1.08 ± 0.01^{e}	205.13 ± 14.55^{gi}	189.52 ± 11.88^{ce}	1.5 ± 0.17^{ad}	136.84 ± 7.52^{d}
مسحوق صويا مستبدل بنخالة القمح					
%10	1.52 ± 0.02^{f}	237.95 ± 9.9^{hf}	156.54 ± 4.93^{f}	2.47 ± 0.22^{f}	96.24 ± 4.83^{f}
%20	1.58 ± 0.01^{g}	198.2 ± 7.31^{gi}	125.44 ± 4^{g}	2.72 ± 0.24^{f}	72.99 ± 3.82^{e}
%30	1.78 ± 0.004^{h}	192 ± 6.78^{ij}	108.18 ± 3.57^{h}	2.71 ± 0.10^{f}	71.01 ± 0.19^{e}
%40	1.52 ± 0.003^{f}	169.04 ± 7.37^{j}	111.21 ± 4.65^{gh}	1.9 ± 0.08^{de}	88.94 ± 0.94^{ef}

* القيم في العمود الواحد الَّتي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.01.

4-3-1-2- غربلة المصادر النتروجينية:

أُضيف الكازئين، ومستخلص الخميرة، والببتون، كلّ على حدة إلى نخالة القمح بنسب 1-5%، رُطِّبَ وسط التخمير بنسبة 60%، وأنجز التخمير لمُدَّة 5 أيام عند درجة حرارة 37 ℃. ويُبيِّن الجدول 22 تأثير المصادر النتروجينية المختلفة في إنتاج البروتياز مقارنة مع الشاهد من دون إضافة، حيث كان لجميع المصادر أثر إيجابيّ في إنتاج البروتياز ضمن المدى المثالي للإضافة. كما تتَّضح قدرة الفطر على استهلاك المصادر النتروجينية المختلفة. وازداد المحتوى الأنزيمي بشكل غير معنوي في جميع معاملات إضافة مستخلص الخميرة والببتون، وكانت الفروق واضحة عند إضافة الكازئين بالنسب 1-4%. كما ظهرت الفروق المعنوية بشكل واضح في كلٍ من نشاط تخثُّر الحليب والنشاط النَّوعيّ ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط البروتيوليتي عند إضافة المصادر النتروجينية المختلفة. وقد ازدادت هذه المؤشِّرات بشكل معنوي عند نسب إضافة 1% لمستخلص الخميرة، كما ازداد النشاط الكُلِّيّ لتخثُّر الحليب والنشاط النَّوعيّ بشكل معنوي عند نسب الإضافة 1-5% لكلٍ من الببتون، والكازئين مقارنة بالشاهد بدون إضافة. وظهر الأثر المعنوي لإضافة الكازئين في النسبة MCA/PA عند الإضافات 1% و2%. وكانت النسب المثلى لإضافة الببتون والكازئين 1%، و1-2% على التَّوالي. أخذت قيم هذه المؤشِّرات بالانخفاض بالتوازي مع نسبة الإضافة. وكان لإضافة مستخلص الخميرة 2% أثر سلبيّ في الإنتاج الأنزيمي مقارنةً مع الشاهد، وظهرت الفروق المعنوية بشكل واضح بزيادة نسبة الإضافة. وازداد النشاط البروتيوليتي بشكل معنوي ابتداءً من نسبة إضافة 3% لمستخلص الخميرة، كما ازداد بإضافة الكازئين والببتون بجميع التراكيز، ما أثَّر سلباً في النسبة النهائيّة للنشاط الأنزيمي (MCA/PA). وتظهر أهمِّيَّة الكازئين في إنتاج االبروتياز، إذ أعطت إضافة الكازئين بنسبة 1% أعلى قيمة للنسبة MCA/PA حيث بلغت 591.13. كما تميَّز المستخلص الأنزيمي المُنتَج بنشاط تخثُّر 827.58 SU/mL ونشاط نوعيّ 371.11 SU/mg، وهذه القيم تفوق المؤشِّرات الحاصلة عند إضافة المصادر النتروجينية الأخرى. كما أعطت إضافة الكازئين بنسبة 2% أعلى قيمة لنشاط تخثُّر الحليب 857.14 SU/mL والنشاط النَّوعيّ للأنزيم 377.59 SU/mg مقارنة بباقي المعاملات، لكن ترافق ذلك بازدياد النشاط البروتيوليتي، وانخفاض نسبي لنسبة MCA/PA، إذ بلغت 529.51.

الجدول 22: تأثير النتروجين في إنتاج البروتياز من *Rhizomucor miehei* بالتخمير الصلب.

المصدر النتروجيني	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	نشاط تخثُّر الحليب (SU/mL)	نشاط التخثُّر النَّوعيّ (SU/mg)	النشاط البروتيوليتي (PU/mL)	نشاط التخثُّر/ النشاط البروتيوليتي
نخالة القمح بلا إضافة	2.11 ± 0.01^{ab}	444 ± 19.50^{a}	210.43 ± 7.96^{a}	0.92 ± 0.06^{a}	481.7 ± 11.27^{a}
مستخلص الخميرة					
%1	2.11 ± 0.02^{a}	555.42 ± 23.43^{b}	263.23 ± 8.65^{b}	0.94 ± 0.06^{a}	591.45 ± 14.46^{b}
%2	2.19 ± 0.04^{bcd}	424.14 ± 15.61^{a}	193.67 ± 4.03^{ac}	0.94 ± 0.06^{a}	450.42 ± 19.29^{ac}
%3	2.13 ± 0.04^{ab}	370.28 ± 9.39^{c}	173.84 ± 1.88^{c}	1.33 ± 0.07^{b}	279.48 ± 8.03^{d}
%4	2.13 ± 0.05^{ab}	324.32 ± 22.60^{d}	152.26 ± 7.82^{d}	1.38 ± 0.08^{b}	243.92 ± 5.81^{e}
%5	2.10 ± 0.04^{a}	231.75 ± 20.41^{e}	110.36 ± 7.83^{e}	1.41 ± 0.10^{b}	160.89 ± 7.40^{f}
ببتون					
%1	2.11 ± 0.03^{ab}	571.42 ± 19.51^{b}	270.82 ± 7.09^{bf}	1.46 ± 0.10^{b}	392.04 ± 15.20^{g}
%2	2.13 ± 0.03^{ab}	648.64 ± 27.44^{fg}	304.53 ± 8.61^{gh}	2.34 ± 0.10^{dc}	278.75 ± 14.31^{d}
%3	2.14 ± 0.04^{ab}	666.66 ± 24.57^{f}	311.52 ± 6.72^{g}	2.46 ± 0.20^{d}	272.23 ± 24.91^{d}
%4	2.12 ± 0.04^{ab}	613.89 ± 20.42^{g}	289.57 ± 4.87^{fhkm}	1.92 ± 0.30^{e}	320.51 ± 15.35^{h}
%5	2.08 ± 0.04^{a}	571.42 ± 18.35^{b}	274.72 ± 3.90^{bk}	1.30 ± 0.16^{b}	438.79 ± 9.88^{c}
كازئين					
%1	2.23 ± 0.04^{c}	827.58 ± 20.25^{h}	371.11 ± 3.59^{n}	1.40 ± 0.07^{b}	591.46 ± 23.51^{b}
%2	2.27 ± 0.06^{c}	857.14 ± 20.81^{h}	377.59 ± 1.91^{n}	1.62 ± 0.09^{be}	527.76 ± 20.62^{i}
%3	2.38 ± 0.05^{e}	666.66 ± 23.61^{f}	280.11 ± 4.63^{g}	2.02 ± 0.10^{ce}	328.87 ± 11.84^{h}
%4	2.24 ± 0.03^{cd}	666.66 ± 19.11^{f}	297.62 ± 4.25^{g}	5.26 ± 0.27^{f}	127.27 ± 3.96^{j}
%5	2.15 ± 0.03^{ad}	648.64 ± 19.42^{fg}	301.69 ± 4.95^{gm}	5.98 ± 0.32^{g}	108.62 ± 2.49^{j}

* القيم في العمود الواحد الَّتي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.01.

ويعود تفوُّق الكازئين في زيادة نشاط التخثُّر إلى تحفيز إفراز البروتياز ونشاطه بوجود الركازة المُستهدَفة في وسط التخمير. ويعود انخفاض إنتاج البروتياز ونشاطه المرافق للتراكيز المرتفعة من المصدر النتروجيني إلى الكبح بنواتج هدم النتروجين. كما تختلف التراكيز المُثلى للإضافة من مصدر نتروجيني لآخر تبعاً لاختلاف عتبة حدوث الأثر التَّثبيطي أو التَّحفيزيّ. وبناءً على هذه النتائج، تمَّ اختيار الكازئين كمصدر للنتروجين عند مستويات الإضافة 0.5، 1، 1.5، 2، 2.5% ضمن معاملات التصميم الإحصائي في الخطوة اللاحقة.

4-3-2- أمثلة ظروف التخمير الصّلب باستخدام منهجية الاستجابة السَّطحيَّة:

يُبيِّن الجدول 23 تباين تأثير ظروف التخمير في المؤشِّرات الأنزيمية المُقاسة للمعاملات المختلفة، إذ تحقَّقَت أعلى القيم لنشاط تخثُّر الكُلِّيّ، والمحتوى البروتيني، ونشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة MCA/PA من خلال المعاملات 47، و43، و43، و29 على التَّوالي، بينما ظهرت أقل قيمة للنشاط الحالّ للبروتين للمستخلص الأنزيمي، وأقل نشاط نوعيّ حال للبروتين عند المعاملة 17. وبشكلٍ عامّ فقد أظهرت المعاملات 6، و7، و16، و43، و45، و47 قيماً مرغوبة لجميع المؤشِّرات المُقاسة. وقد أجريت عملية الأمثلة متعدِّدة الاستجابة، بما يُحقِّق أعلى قيمة لنشاط التخثُّر النَّوعيّ، مع الأخذ بعين الاعتبار القيمة المرتفعة لنسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين. وقد أعطت نتيجة التحليل الإحصائي للنتائج معادلتين من الدرجة الثانية تُبين العلاقة بين مؤشِّرات الاستجابة، والعوامل المُرمَّزة (المعادلتين 5، و6).

$$spMCA = -4180 + 3X_5 - 27.4\,X_4 + 349\,X_3 + 169.3\,X_2 + 15.94\,X_1 - 31.7\,X_5^2 + 0.279\,X_4 - 12.3\,X_3^2 - 2.104\,X_2^2 - 0.0966\,X_1^2 - 0.80\,X_5*X_4 - 2.8\,X_5*X_3 + 2.81\,X_5*X_2 + 0.944\,X_5*X_1 - 2.68\,X_4*X_3 + 0.190\,X_4*X_2 + 0.0355\,X_4*X_1 + 0.10\,X_3*X_2 + 0.299\,X_3*X_1 - 0.1449\,X_2*X_1 \quad (5).$$

$$MCA/PA = -3457 + 283\,X_5 - 2\,X_4 + 314\,X_3 + 101.7\,X_2 + 12.23\,X_1 - 19.6\,X_5^2 + 0.029\,X_4^2 - 12.5\,X_3^2 - 0.958\,X_2^2 - 0.0520\,X_1^2 - 2.46\,X_5*X_4 + 13.0\,X_5*X_3 - 2.22\,X_5*X_2 - 0.5\,X_5*X_1 - 0.14\,X_4*X_3 + 0.061\,X_4*X_2 + 0.0441\,X_4*X_1 - 3.16\,X_3*X_2 - 0.409\,X_3*X_1 - 0.097\,X_2*X_1 \quad (6).$$

بحيث X_1، X_2، X_3، X_4، X_5 هي زمن التخمير، ودرجة الحرارة، ودرجة الـ pH، ونسبة الرطوبة، وتركيز النتروجين على التَّوالي. ويُبيِّن الجدولان 24، و26 نتائج تحليل التباين لدلالات العوامل المؤثِّرة وتفاعلها لكلٍ من معادلة نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة MCA/PA على التَّوالي.

الجدول 23: النتائج التجريبيَّة للتصميم الإحصائي الخاصّ بالتخمير الصّلب.

رقم المعاملة	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	نشاط تخثُّر الحليب MCA (SU/mL)	نشاط التخثُّر النَّوعي (SU/mg)	النشاط الحالّ للبروتين PA (PU/mL)	النشاط الحالّ النَّوعي (PU/mg)	نشاط التخثّر/ النشاط الحالّ للبروتين (MCA/PA)
1	0.67	40.00	59.61	0.62	0.92	64.52
2	2.11	66.67	31.60	0.92	0.44	72.46
3	2.01	41.18	20.49	0.78	0.39	52.79
4	2.22	54.42	24.46	0.82	0.37	66.36
5	2.34	475.11	203.32	1.92	0.82	247.45
6	3.58	1333.33	372.44	5.18	1.45	257.45
7	4.01	1372.55	342.50	5.26	1.31	261.15
8	3.31	936.45	282.92	5.69	1.72	164.65
9	1.85	15.38	8.30	0.79	0.43	19.49
10	3.05	405.80	133.05	2.19	0.72	185.20
11	3.35	545.17	162.74	2.77	0.83	196.67
12	3.55	868.70	244.55	4.03	1.13	215.83
13	3.47	666.67	192.11	4.09	1.18	163.18
14	3.96	1014.49	256.01	4.57	1.15	221.82
15	3.18	800.00	251.64	5.19	1.63	154.22
16	3.67	1372.55	374.40	4.92	1.34	279.02
17	1.30	20.00	15.34	0.15	0.12	133.33
18	1.45	44.79	30.84	0.32	0.22	139.98
19	1.68	205.88	122.21	1.30	0.77	158.37
20	3.10	535.51	172.55	2.82	0.91	189.56
21	2.82	307.69	109.29	2.36	0.84	130.24
22	4.42	1296.30	292.99	5.56	1.26	233.04
23	3.99	1372.55	344.00	4.79	1.20	286.45
24	3.87	857.14	221.48	5.55	1.43	154.44
25	2.06	190.22	92.48	1.30	0.63	145.80
26	2.40	331.91	138.39	2.27	0.95	146.08
27	4.23	750.00	177.47	4.18	0.99	179.30
28	3.06	441.18	144.10	2.15	0.70	205.06
29	3.39	486.11	143.56	1.23	0.36	396.83
30	3.83	750.00	195.76	2.17	0.57	344.83
31	3.62	897.44	248.02	2.96	0.82	303.13
32	3.79	1043.48	275.32	4.29	1.13	243.26
33	3.79	800.00	211.13	2.57	0.68	311.00
34	2.81	827.59	294.25	3.90	1.39	212.43
35	3.37	923.08	273.96	3.35	1.00	275.20
36	3.46	1122.99	324.93	5.37	1.55	209.23
37	3.81	1090.91	286.42	3.99	1.05	273.23
38	0.71	0	0.00	0.35	0.50	0.00
39	3.12	297.12	95.31	1.35	0.43	219.61
40	1.27	11.76	9.25	0.22	0.17	53.48
41	3.55	393.44	110.70	1.84	0.52	214.35
42	0.90	28.57	31.75	0.19	0.21	150.38
43	3.54	1453.29	410.84	6.95	1.96	209.15
44	3.14	990.61	315.68	6.24	1.99	158.87
45	3.39	1521.74	448.28	4.70	1.99	323.88
46	2.27	257.35	113.37	2.52	1.11	102.04
47	4.24	1544.12	363.96	4.85	1.14	318.18

الجدول 24: تحليل التباين لمعادلة الانحدار لنشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ للبروتياز المُنتَج بالتخمير الصّلب.

المصدر	درجة الحرية DF	مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj SS	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj MS	مؤشِّر فيشر F-Value	قيم الاحتماليّة *P*-Value
الانحدار	21	595702	28367	6.94	0.000
المُكرَّرات	1	477	477	0.12	0.736
التأثير الخَطّيّ	5	142855	28571	6.99	0.000
الكازئين	1	1305	1305	0.32	0.577
الرطوبة	1	230	230	0.06	0.814
pH	1	15532	15532	3.80	0.063
الحرارة	1	24552	24552	6.01	0.022
الزمن	1	101236	101236	24.77	0.000
تأثير تربيع العوامل	5	198436	39687	9.71	0.000
الكازئين*الكازئين	1	1829	1829	0.45	0.510
الرطوبة*الرطوبة	1	22750	22750	5.57	0.026
pH*pH	1	4387	4387	1.07	0.310
الحرارة*الحرارة	1	80744	80744	19.76	0.000
الزمن*الزمن	1	90479	90479	22.14	0.000
التفاعل ثنائي الاتجاه	10	45021	4502	1.10	0.310
الكازئين*الرطوبة	1	510	510	0.12	0.727
الكازئين*pH	1	65	65	0.02	0.901
الكازئين*الحرارة	1	1584	1584	0.39	0.539
الكازئين*الزمن	1	4109	4109	1.01	0.326
الرطوبة*pH	1	22905	22905	5.60	0.026
الرطوبة*الحرارة	1	2876	2876	0.70	0.409
الرطوبة*الزمن	1	2325	2325	0.57	0.458
الحرارة*pH	1	8	8	0.00	0.965
الزمن*pH	1	968	968	0.24	0.631
الحرارة* الزمن	1	9673	9673	2.37	0.136
الخطأ	25	102166	4087		
نقص التطبيق	21	95141	4531	2.58	0.185
الخطأ النقي	4	7025	1756		
المجموع	46	697867			

الجدول 25: تأثير العوامل المدروسة في نشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ للبروتياز المُنتَج بالتخمير الصّلب.

العامل	التأثير	معامل الانحدار	الخطأ المعياري للمعامل	قيم T	قيم الاحتماليّة *P*-Value	معامل تضخم التباين VIF
الثابت		-249.8	92.7	-2.69	0.012	
المُكرَّرات						
1		3.9	11.4	0.34	0.736	1.01
الكازئين	-76.9	-38.5	68.1	-0.57	0.577	11.33
الرطوبة	-32.3	-16.2	68.1	-0.24	0.814	11.33
pH	265.3	132.7	68.1	1.95	0.063	11.33
الحرارة	333.6	166.8	68.1	2.45	0.022	11.33
الزمن	57.05	28.52	5.73	4.98	0.000	46.30
الكازئين*الكازئين	-63.3	-31.7	47.3	-0.67	0.510	1.03
الرطوبة*الرطوبة	223.3	111.7	47.3	2.36	0.026	1.03
pH*pH	-98.1	-49.0	47.3	-1.04	0.310	1.03
الحرارة*الحرارة	-420.7	-210.4	47.3	-4.45	0.000	1.03
الزمن*الزمن	-0.7732	-0.3866	-0.0822	-4.71	0.000	46.32
الكازئين*الرطوبة	-31.9	-16.0	45.2	-0.35	0.727	1.00
الكازئين*pH	-11.4	-5.7	45.2	-0.13	0.901	1.00
الكازئين*الحرارة	56.3	28.1	45.2	0.62	0.539	1.00
الكازئين*الزمن	3.78	1.89	1.88	1.00	0.326	11.33
الرطوبة*pH	-214.0	-107.0	45.2	-2.37	0.026	1.00
الرطوبة*الحرارة	75.8	37.9	45.2	0.84	0.409	1.00
الرطوبة*الزمن	2.84	1.42	1.88	0.75	0.458	11.33
الحرارة*pH	4.0	2.0	45.2	0.04	0.965	1.00
الزمن*pH	1.83	0.92	1.88	0.49	0.631	11.33
الحرارة* الزمن	-5.8	-2.9	1.88	-1.54	0.136	11.33

الجدول 26: تحليل التباين لمعادلة الانحدار لنسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين للبروتياز المُنتَج بالتخمير الصّلب.

المصدر	درجة الحرية DF	مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj SS	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj MS	مؤشِّر فيشر F-Value	قيم الاحتماليّة *P*-Value
الانحدار	21	206978	9856.1	1.63	0.120
المُكرَّرات	1	5507	5506.9	0.91	0.349
التأثير الخَطِّيّ	5	59713	11942.6	1.98	0.117
الكازئين	1	2318	2317.8	0.38	0.541
الرطوبة	1	22	22.2	0.00	0.952
pH	1	18782	18781.7	3.11	0.090
الحرارة	1	7748	7748.0	1.28	0.268
الزمن	1	30844	30843.6	5.11	0.033
تأثير تربيع العوامل	5	43398	8679.6	1.44	0.246
الكازئين*الكازئين	1	698	698.0	0.12	0.737
الرطوبة*الرطوبة	1	250	250.0	0.04	0.840
pH*pH	1	4545	4544.9	0.75	0.394
الحرارة*الحرارة	1	16732	16732.3	2.77	0.108
الزمن*الزمن	1	26218	26218.1	4.34	0.048
التفاعل ثنائي الاتجاه	10	27716	2771.6	0.46	0.901
الكازئين*الرطوبة	1	4834	4833.8	0.80	0.379
الكازئين*pH	1	1344	1344.0	0.22	0.641
الكازئين*الحرارة	1	984	984.3	0.16	0.690
الكازئين*الزمن	1	1157	1157.1	0.19	0.665
الرطوبة*pH	1	62	62.2	0.01	0.920
الرطوبة*الحرارة	1	300	300.0	0.05	0.825
الرطوبة*الزمن	1	3588	3588.0	0.59	0.448
الحرارة*pH	1	7988	7988.4	1.32	0.261
الزمن*pH	1	3089	3088.8	0.51	0.481
الحرارة* الزمن	1	4369	4368.9	0.72	0.403
الخطأ	25	150943	6037.7		
نقص التطبيق	21	143167	6817.5	3.51	0.116
الخطأ النقي	4	7776	1943.9		
المجموع	46	357921			

الجدول 27: تأثير المتغيِّرات المدروسة في نسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين للبروتياز المُنتَج بالتخمير الصَلب.

العامل	التأثير	معامل الانحدار	الخطأ المعياري للمعامل	قيم T	قيم الاحتماليّة *P*-Value	معامل تضخم التباين VIF
الثابت		-53	113	-0.47	0.645	
المُكرَّرات						
1		13.3	13.9	0.96	0.349	1.01
الكازئين	102.5	51.2	82.7	0.62	0.541	11.33
الرطوبة	-10.0	-5.0	82.7	-0.06	0.952	11.33
pH	291.8	145.9	82.7	1.76	0.090	11.33
الحرارة	187.4	93.7	82.7	1.13	0.268	11.33
الزمن	31.49	15.74	6.97	2.26	0.033	46.30
الكازئين*الكازئين	-39.1	-19.6	57.5	-0.34	0.737	1.03
الرطوبة*الرطوبة	23.4	11.7	57.5	0.20	0.840	1.03
pH*pH	-99.8	-49.9	57.5	-0.87	0.394	1.03
الحرارة*الحرارة	-191.5	-95.8	57.5	-1.66	0.108	1.03
الزمن*الزمن	-0.4162	-0.2081	0.0999	-2.08	0.048	46.32
الكازئين*الرطوبة	-98.3	-49.2	54.9	-0.89	0.379	1.00
الكازئين*pH	51.8	25.9	54.9	0.47	0.641	1.00
الكازئين*الحرارة	-44.4	-22.2	54.9	-0.40	0.690	1.00
الكازئين*الزمن	-2.00	-1.00	2.29	-0.44	0.665	11.33
الرطوبة*pH	-11.2	-5.6	54.9	-0.10	0.920	1.00
الرطوبة*الحرارة	24.5	12.2	54.9	0.22	0.825	1.00
الرطوبة*الزمن	3.53	1.76	2.29	0.77	0.448	11.33
الحرارة*pH	-126.4	-63.2	54.9	-1.15	0.261	1.00
الزمن*pH	-3.27	-1.64	2.29	-0.72	0.481	11.33
الحرارة* الزمن	-3.89	-1.95	2.29	-0.85	0.403	11.33

كانت قيم الاحتماليّة الخاصّة بمعادلة الانحدار لنشاط التخثُّر النَّوعيّ أقل من 0.05، ما يشير إلى الأثر المعنوي للعوامل المُستقلّة ككُل (المتغيِّرات المدروسة) في العوامل التابعة (مُتغيِّرات الاستجابة). ويُبيِّن الجدول 24 معنوية التأثير الخَطِّيّ والتربيعي لكلٍ من الزمن والحرارة، ما يشير إلى التَّأثير الشَّديد لهذه العوامل في نشاط التخثُّر النَّوعيّ.

ولم يكن للرطوبة تأثير خَطِّيّ معنوي في نشاط التخثُّر النَّوعيّ، إذ كانت قيم الاحتماليّة لعامل الرطوبة أكبر من 0.05، بينما ظهر الأثر المعنوي لتربيع هذا العامل في نشاط التخثُّر النَّوعيّ. وقد كانت قيم الاحتماليّة الخاصّة بمربع هذا العامل أقل من 0.05، لذا تأخذ العلاقة ما بين عامل الرطوبة ونشاط التخثُّر النَّوعيّ شكلاً مُنحنياً.

لم يكن للـ pH، أو الكازئين تأثير خَطِّيّ معنوي، كما لم يكن لتربيع هذين العاملين تأثير معنوي في نشاط التخثُّر النَّوعيّ، إذ كانت قيم الاحتماليّة الخاصّة بكلٍ من هذه المتغيِّرات أكبر من 0.05. ما يعني عدم تأثير هذه العوامل في نشاط التخثُّر النَّوعيّ. بينما ظهر أثر معنوي لتفاعل الـ pH والرطوبة، إذ كانت قيم الاحتماليّة الخاصّة بتفاعل هذين العاملين أقل من 0.05 ما يشير إلى اعتماد تأثير أحد هذين العاملين في نشاط التخثُّر النَّوعيّ على قيمة العامل الآخر، ولم يكن للتفاعلات الأخرى فيما بين المتغيِّرات المُستقلّة أي أثر معنوي في نشاط التخثُّر النَّوعيّ. وكانت قيم معامل التحديد الخاصّة بمعادلة الانحدار لنشاط التخثُّر النَّوعيّ 85.36%، ما يعني أنَّ العوامل المُستقلّة مسؤولة عن 85.36% من التباين في نشاط التخثُّر النَّوعيّ.

وكانت قيم الانحراف المعياري لكلٍ من نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين 63.92 و77.70 على التَّوالي، وتعكس هذه القيم قَدراً كبيراً من الاختلاف بين المعاملات.

كانت قيم الاحتماليّة لنقص التطبيق الخاصّة بمعادلة الانحدار لنشاط التخثُّر النَّوعيّ أكبر من 0.05، ما يؤكِّد كفاءة معادلة الانحدار في تحديد العلاقة بين العوامل المُستقلّة والعوامل التابعة. يمكن اختزال معادلة الانحدار لنشاط التخثُّر النَّوعيّ بالشكل الآتي:

$$sp\ MCA = -4332 - 11\ X_5 - 24.9\ X_4 + 349\ X_3 + 169.8\ X_2 + 18.08\ X_1 - 31.7\ X_5^2 + 0.279\ X_4^2 - 12.3\ X_3^2 - 2.104\ X_2^2 - 0.0966\ X_1^2 - 0.80\ X_5*X_4 + 2.81\ X_5*X_2 + 0.944\ X_5*X_1 - 2.68\ X_4*X_3 + 0.190\ X_3*X_2 + 0.229\ X_3*X_1 - 0.1449\ X_2*X_1$$

بحيث X_1، X_2، X_3، X_4، X_5 هي زمن التخمير، ودرجة الحرارة، ودرجة الـ pH، ونسبة الرطوبة، وتركيز النتروجين على التَّوالي.

ويُبَيِّن الجدولان 28 و29 تحليل التباين لمعادلة الانحدار المُختزَلة لنشاط التخثُّر النَّوعيّ، وتأثير العوامل في نشاط التخثُّر النَّوعيّ وفق المعادلة المُختزَلة على التَّوالي. وقد كانت قيم معامل

التحديد الخاصّة بمعادلة الانحدار المُختَزَلة 85.02%، ما يعني أنَّ العوامل المُستقلّة مسؤولة عن 85.02% من التباين في العوامل التابعة وفق هذه المعادلة. وكانت قيم الانحراف المعياري لنشاط التخثُّر النَّوعيّ 61.11، وتشير هذه القيمة إلى اختلاف توزع القيم المُقاسة.

كانت قيم الاحتماليّة الخاصّة بمعادلة الانحدار لنسبة MCA/PA أكبر من 0.05، ما يشير إلى عدم معنوية تأثير المتغيِّرات المدروسة كَكُل في هذه النسبة. ويُبيِّن الجدول 26 معنوية التأثير الخَطِّيّ والتربيعي لعامل الزمن، ما يشير إلى التأثير الشَّديد لهذا العامل في نسبة MCA/PA، ولم يكن لباقي العوامل أو لتفاعلها أثر معنوي في نسبة MCA/PA.

كانت قيم معامل التحديد الخاصّة بمعادلة الانحدار لنسبة نشاط التخثُّر/النشاط الحالّ للبروتين 57.83%، ما يعني أنَّ العوامل المُستقلّة مسؤولة عن 57.83% فقط من التباين في نسبة MCA/PA.

وتُعزى القيم المنخفضة لمعامل التحديد، وعدم معنوية المعادلة الكُلِّيّة لنسبة MCA/PA إلى ظهور بعض القيم لـ MCA/PA في بعض المعاملات، الَّتي تعكس نسبة غير معبِّرة عن قيم نشاط التخثُّر، والنشاط الحالّ للبروتين منفصلة. إذ قد تنتُج بعض القيم المرتفعة لـ MCA/PA في الأنزيم ذو القيم المعتدلة أو المنخفضة لنشاط التخثُّر والمرافقة لقيم شديدة الانخفاض للنشاط الحالّ للبروتين، كما قد تنتُج بعض القيم المنخفضة لـ MCA/PA في الأنزيم ذو القيم المرتفعة لنشاط التخثُّر والمرافقة لقيم مرتفعة للنشاط الحالّ للبروتين. ما يشير إلى ضرورة اعتماد نشاط التخثُّر النَّوعيّ إلى جانب هذه النسبة كمعيار لاختيار الأنزيم المُخثِّر.

الجدول 28: تحليل التباين لمعادلة الانحدار المُختزَلة لنشاط تخثُّر الحليب النَّوعيّ للبروتياز المُنتَج بالتخمير الصّلب.

المصدر	درجة الحرية DF	مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj SS	متوسط مجموع مربع الانحرافات عن المتوسط Adj MS	مؤشِّر فيشر F-Value	قيم الاحتماليّة *P*-Value
الانحدار	18	593305	32961	8.83	0.000
المُكرَّرات	1	477	477	0.13	0.724
التأثير الخَطّيّ	5	153419	30684	8.22	0.000
الكازئين	1	1305	1305	0.35	0.559
الرطوبة	1	10794	10794	2.89	0.100
pH	1	15532	15532	4.16	0.051
الحرارة	1	24552	24552	6.57	0.016
الزمن	1	101236	101236	27.11	0.000
تأثير تربيع العوامل	5	198436	39687	10.63	0.000
الكازئين*الكازئين	1	1829	1829	0.49	0.490
الرطوبة*الرطوبة	1	22750	22750	6.09	0.020
pH*pH	1	4387	4387	1.17	0.288
الحرارة*الحرارة	1	80744	80744	21.62	0.000
الزمن*الزمن	1	90479	90479	24.23	0.000
التفاعل ثنائي الاتجاه	7	42624	6089	1.63	0.168
الكازئين*الرطوبة	1	510	510	0.14	0.714
الكازئين*الحرارة	1	1584	1584	0.42	0.520
الكازئين*الزمن	1	4109	4109	1.10	0.303
الرطوبة*pH	1	22905	22905	6.13	0.020
الرطوبة*الحرارة	1	2876	2876	0.77	0.388
الزمن*pH	1	968	968	0.26	0.615
الحرارة* الزمن	1	9673	9673	2.59	0.119
الخطأ	28	104563	3734	-	-
نقص التطبيق	24	97538	4064	2.31	0.216
الخطأ النقي	4	7025	1756	-	-
المجموع	46	697867	-	-	-

الجدول 29: تأثير المتغيِّرات في نشاط تخثُّر الحليب النَّوعي (وفق المعادلة المُختزَلة) للبروتياز المُنتَج بالتخمير الصَلب.

العامل	التأثير	معامل الانحدار	الخطأ المعياري للمعامل	قيم T	قيم الاحتماليّة *P*-Value	معامل تضخم التباين VIF
الثابت		-249.8	88.6	-2.82	0.009	
المُكرَّرات						
1		3.9	10.9	0.36	0.724	1.01
الكازئين	-76.9	-38.5	65.1	-0.59	0.559	11.33
الرطوبة	65.7	32.9	19.3	1.70	0.100	1.00
pH	265.3	132.7	65.1	2.04	0.051	11.33
الحرارة	333.6	166.8	65.1	2.56	0.016	11.33
الزمن	57.05	28.52	5.48	5.21	0.000	46.30
الكازئين*الكازئين	-63.3	-31.7	45.2	-0.70	0.490	1.03
الرطوبة*الرطوبة	223.3	111.7	45.2	2.47	0.020	1.03
pH*pH	-98.1	-49.0	45.2	-1.08	0.288	1.03
الحرارة*الحرارة	-420.7	-210.4	45.2	-4.65	0.000	1.03
الزمن*الزمن	-0.7732	-0.3866	0.0785	-4.92	0.000	46.32
الكازئين*الرطوبة	-31.9	-16.0	43.2	-0.37	0.714	1.00
الكازئين*الحرارة	56.3	28.1	43.2	0.65	0.520	1.00
الكازئين*الزمن	3.78	1.89	1.80	1.05	0.303	11.33
الرطوبة*pH	-214.0	-107.0	43.2	-2.48	0.020	1.00
الرطوبة*الحرارة	75.8	37.9	43.2	0.88	0.388	1.00
الزمن*pH	1.83	0.92	1.80	0.51	0.615	11.33
الحرارة* الزمن	-5.80	-2.90	1.80	-1.61	0.119	11.33

– **تأثير المحتوى الرطوبي:** ارتبطت القيم المُفضَّلة لعوامل الاستجابة بالمحتوى الرطوبي المرتفع ضمن المستويات المدروسة، ويُفسَّر ذلك بارتفاع انحلاليّة المُغذِّيات، والدرجة المرتفعة لانتفاخ جزيئات نخالة القمح ما يؤدِّي إلى ازدياد السطح المُعرَّض للنشاط الميكروبي. وقد بلغت القيمة المثلى للمحتوى الرطوبي 80%. وتختلف هذه القيمة عن النسبة "50%" الَّتي أشار إليها Foda وزملاؤه (2012، 582)، و Khademi وزملاؤه (2013، 120).

– **تأثير الـ pH:** أدَّت القيمة 3 للـ pH إلى تثبيط إنتاج الأنزيم، كما كان النموّ الفطري لا يُذكر، لعدم مناسبة هذه القيمة للنموّ وإنتاج الأنزيمات. وازداد إنتاج البروتياز ونشاطه في الدَّرجات الأعلى للـ pH، وصولاً إلى القيم المثلى للمؤشِّرات المدروسة عند pH 6.3. نتائج مشابهة أشار إليها Ayhan وزملاؤه (2001، 157f).

– **تأثير زمن التحضين:** لم يظهر أيّ إنتاج للبروتياز بعد اليوم الأوَّل من التحضين، كما كان النموّ الفطري ضعيفاً، لعدم كفاية الوقت للإنبات. وازداد الإنتاج والنشاط الأنزيمي بعد 48 ساعة من التحضين، وتشير نتائج التحليل الاحصائي إلى بلوغ المؤشِّرات المدروسة للقيم المثلى بعد 81.21 ساعة من التحضين، ويعود ذلك للوقت اللازم للنموّ والوصول إلى طور الثَّبات. وتختلف هذه المُدَّة عن المُدَّة (48 hrs) الَّتي أشار إليها Araújo وزملاؤه (2015، 248)، والمُدَّة (110 hrs) الَّتي أشار إليها Khademi وزملاؤه (2013، 117). وانخفض إنتاج البروتياز ونشاطه بعد 96 ساعة من التحضين، رُبَّما بسبب استنفاد المُغذِّيات وتراكم الحموض العضويَّة وانخفاض درجة الحموضة. وقد يعود ذلك إلى حدوث التَّثبيط الاسترجاعي. نتائج مقاربة توصَّل إليها Thakur وزملاؤه (1990b، 413)، و Foda وزملاؤه (2012، 584)، و Fileto-Pérez وزملاؤه (2020، 380).

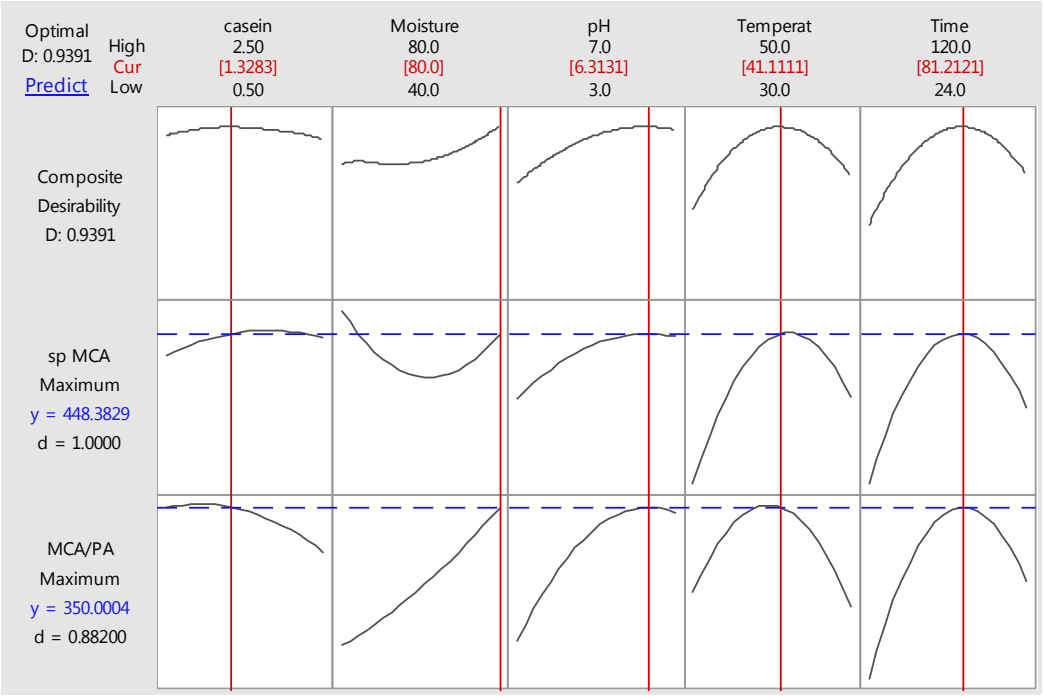
– **تأثير درجة الحرارة:** لم يُلحظ أي إنتاج للأنزيم، كما كان النموّ الفطري لا يُذكر عند درجة حرارة 30℃. ويعود ذلك إلى حاجة الفطر المُحِبّ للحرارة إلى درجات أكثر ارتفاعاً لتحقيق النموّ الأمثل، ما ينعكس على تخليق الأنزيمات. وقد لوحظ أعلى نشاط للأنزيم عند درجة الحرارة 40℃. انخفض نشاط الأنزيم عند المستويات الأعلى لدرجة الحرارة. ويعود ذلك إلى تبخُّر الرطوبة في وسط التخمير، أو تخريب جزئي مُحتَمل للأنزيم في وسط التخمير. نتائج مشابهة

توصَّل إليها Thakur وزملاؤه (1990a، 17f)، وFoda وزملاؤه (2012، 582f)، وKhademi وزملاؤه (2013، 119).

– **تأثير تركيز الكازئين:** لم يكن للكازئين أثر معنوي في نشاط التخثُّر النَّوعيّ ونسبة MCA/PA، رُبَّما بسبب ضبط مستويات الكازئين ضمن المعاملات بالقرب من النسب المثالية. وتشير النتائج إلى تحقُّق القيم المثلى لمؤشِّرات الاستجابة عند إضافة الكازئين بنسبة 1.33%، وتظهر قيم أدنى للمؤشِّرات عند التراكيز الأخرى للإضافة. تُقارب الإضافة المثلى للكازئين النسبة (1.5%) الَّتي أشار إليها Khademi وزملاؤه (2013، 119)، وتختلف تماماً عن النسبة (250%) الَّتي أشار إليها Fileto-Pérez وزملاؤه (2020، 380f).

ويُبيِّن الشكل 10 الظروف المثلى لإنتاج البروتياز بالتخمير الصّلب بما يُحقِّق الحصول على أعلى قيم لكلٍ من نشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة MCA/PA. إذ تمثَّلت هذه الظروف في التحضين عند درجة حرارة 41.1 ℃، لمُدَّة 81.21 ساعة، وضَبط درجة الحموضة الابتدائية عند 6.31، وإضافة الكازئين بنسبة 1.33%. وقد أعطت عملية التخمير عند الظروف آنفة الذكر مستخلصاً أنزيمياً بقيم 5.11 mg/mL، و2258.13 SU/mL، و441.90 SU/mg، و 5.81 PU/mL، و1.14 PU/mg، و388.66 لكلٍ من المحتوى الأنزيمي، ونشاط تخثُّر الحليب، ونشاط التخثُّر النَّوعيّ، والنشاط الحالّ للبروتين، والنشاط الحالّ للبروتين النَّوعيّ، ونسبة MCA/PA على التَّوالي. وقد كانت قيم نشاط التخثُّر النَّوعيّ ونسبة MCA/PA مقاربة للقيم المتوقَّعة وفق معادلتي الانحدار وهي 448.38 و355.00 على التَّوالي.

هذا وقد تفوَّقَت المؤشِّرات المدروسة للبروتياز المُنتَج باستخدام التخمير الصّلب عن تلك الظاهرة باستخدام التخمير السائل تحت الظروف المُثلى للإنتاج، وبناءً على ذلك فقد استُخدِمت طريقة التخمير الصّلب في الخطوات اللّاحقة من الدراسة.



الشكل 10: أمثلة إنتاج البروتياز بالتخمير الصّلب (متعدِّدة الاستجابة). وتُمثِّل الأعمدة تأثير العوامل المستقلّة كلّ على حدة في عوامل الاستجابة (الصفوف). وتُمثِّل الخطوط الحمراء العمودية القيم المثالية للعوامل المستقلّة الَّتي تُحقِّق القيم المرغوبة لعوامل الاستجابة. وتُمثِّل الخطوط الزرقاء الأفقية القيم المتوقَّعة لعوامل الاستجابة عند تطبيق القيم المثلى للعوامل المستقلّة. وتشير الأرقام في الصف العلوي إلى مجال القيم لكل عامل وقيمته المثالية (مدرجة باللون الأحمر). ويشير الرمز (Y) في العمود الأيسر إلى القيم المثلى لعوامل الاستجابة (مدرجة باللون الأزرق)، (D): هي الرغبة المركبة لجميع المؤشِّرات، (d): الرغبة المنفصلة لكل مؤشِّر على حدة، (0≤di≤1): حيث إنَّ القيم الأعلى لمؤشِّر الرغبة هي القيم المفضَّلة، إذ تُمثِّل (1) تحقيق الرغبة المثالية.

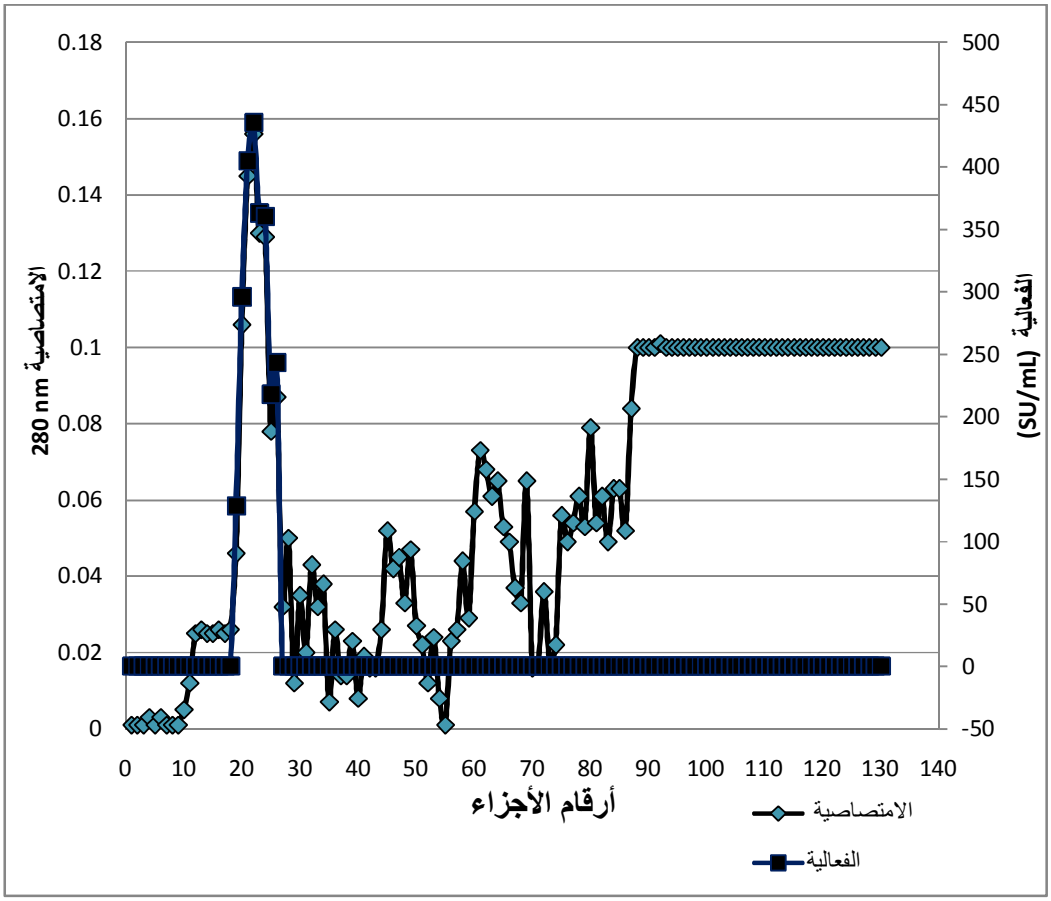
4-4- التنقية الجزئيَّة:

تمَّ العمل على تنقية المستخلص الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* Rm4 المُنتَج باستخدام التخمير الصّلب تحت الظروف المثلى للإنتاج. ويُبيِّن الجدول 30 ملخصاً لخطوات التنقية. وقد أدَّى ترسيب البروتياز بسلفات الأمونيوم إلى ارتفاع الفعاليّة النَّوعيّة بمقدار 5.92 أضعاف، تُقارب هذه النسبة تلك الَّتي أشار إليها Amer وزملاؤه (2015، 1075) "5.31" عند ترسيب بروتياز *Rhizomucor miehei* بسلفات الأمونيوم، وتَفوق هذه النسبة درجة التنقية "3.9" الَّتي أشار إليها Kazemi-Vaysari (2002، 102) وزملاؤه عند استخدام سلفات الأمونيوم عند نسب إشباع مختلفة (20-80%). كما أدَّى فصل الراسب الناتج على عمود الترشيح إلى ازدياد الفعاليّة النَّوعيّة للبروتياز وانخفاض في المحتوى البروتيني، ويعود ذلك لاستبعاد البروتينات ذات الأوزان الجزيئيّة المُغايرة في المُحضَّر الأنزيمي خلال مراحل التنقية. ويُبيِّن الشكل 11 قيم

الامتصاصية الضَّوئيَّة والفعاليّة الأنزيمية لأجزاء العينة الُمجمَّعة من أنبوب التنقية. وقد ظهرت عِدَّة قِمَم بروتينية، وقِمَّة فعاليّة واحدة، وأظهرت الأجزاء 19–26 أعلى امتصاصية للضوء عند طول موجة 280 nm، كما أظهرت هذه الأجزاء ارتفاع في الفعاليّة الأنزيمية، إذ بلغت الفعاليّة الأنزيمية أقصاها (404.99 SU/mL) في الجزء 22 للقِمَّة البروتينية، بما يُحقِّق تطابق قِمَّتي البروتين والفعاليّة الأنزيمية. وقد أعطى جَمع هذه الأجزاء مُحضَّراً أنزيمياً بدرجة نقاوة تعادل 8.5 أضعاف بالمقارنة مع المُحضَّر الأنزيمي الخام، وبحصيلة أنزيمية مقدارها 4.9%. ويعود تَشكُّل القمم البروتينية الأخرى إلى وجود بروتينات أُخرى في المُحضَّر الأنزيمي.

الجدول 30: مراحل التنقية للبروتياز المنتَج من *Rhizomucor miehei*.

خطوات التنقية	الحجم (mL)	الفعاليّة الإنزيمية (SU/mL)	الفعاليّة الكُلِّيّة (SU)	تركيز البروتين (mg/mL)	الفعاليّة النَّوعيّة (SU/mg)	معامل التنقية	المردود %
الأنزيم الخام	68	2258.13	153552.84	5.11	441.90	1	100
الترسيب بسلفات الأمونيوم	10	13548.78	135487.8	5.18	2617.21	5.92	88.24
التنقية بهالم Sephadex G-100	8	282.27	2258.13	0.08	3756.18	8.50	4.9



الشكل 11: قيم الامتصاصية الضَّوئيَّة والفعاليّة الأنزيمية لأجزاء العينة الناتجة عن ترشيح بروتياز *Rhizomucor miehei* Rm4 (المرسَّب بسلفات الأمونيوم)، باستخدام عمود Sephadex-G 100 (بأبعاد 30 cm × 2.6، والموازن بدارئ فوسفات 0.02 M; pH 6، بمعدَّل جريان 1 mL/min).

4-5- معاملات التطفير:

4-5-1- التطفير باستخدام الأشعّة فوق البنفسجيَّة:

يُبَيِّن الجدول 31 إنتاج البروتياز بوساطة العزلات المُعرَّضة للأشعّة فوق البنفسجيَّة بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة. بدءاً من 25 معاملة بالأشعّة فوق البنفسجيَّة، أظهرت 19 معاملة تغيُّرات معنوية في فعالية البروتياز، وقد أظهر حوالي 79% من الطفرات المُحدَثة زيادة في نشاط تخثُّر الحليب، ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ للبروتين، بينما أظهرت باقي المعاملات انخفاضاً في هذه المؤشِّرات. فقد لوحظ ازدياد في قيم المؤشِّرات للمعاملة (15 cm, 25 sec) UV15*25، لكن لم يظهر اختلاف معنوي بالمقارنة مع الشاهد. ولوحظ ازدياد معنوي في قيم المؤشِّرات في المعاملات UV5*15، وUV5*20، وUV5*25، وUV10*5، وUV10*10، وUV 10*20،

و5*UV15، و15*UV15، و20*UV15، و5*UV20، و20*UV20، و25*UV20، و10*UV25، و25*UV25. وقد أدَّت المعاملة (10 cm, 25 sec) 25*UV10 إلى ظهور طفرة متفوِّقة على باقي العزلات (المعاملة بالأشعّة فوق البنفسجيَّة) في إنتاج البروتياز وفق جميع المؤشِّرات، إذ أظهر المستخلص الأنزيمي المُنتَج بوساطة هذه الطفرة تحسُّناً بمقدار 1.75، 3.43، 1.96، 1.44 ضِعفاً في المحتوى الأنزيمي، ونشاط تخثُّر الحليب الكُلِّيّ، ونشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ للبروتين، على التَّوالي بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة. اختلف ظهور أثر الأشعّة فوق البنفسجيَّة في قيم المؤشِّرات للمعاملتين 15*UV25، و15*UV20، إذ ازدادت قيم بعض المؤشِّرات، بينما انخفض البعض الآخر. وأدّت المعاملتين 5*UV5 و10*UV5 إلى انخفاض قيم المؤشِّرات الأنزيمية فيما عدا المحتوى البروتيني للمستخلص الأنزيمي المُنتَج بوساطة العزلة 10*UV5، لكن لم تكن هذه الاختلافات معنوية بالمقارنة مع الشاهد. بينما ظهر انخفاض معنوي واضح في قيم المؤشِّرات في المعاملات 10*UV20، و5*UV25، و10*UV15، وانخفض نشاط التخثُّر الكُلِّيّ إلى أدنى قيمة في المعاملة 20*UV25، كما سُجِّلَت أدنى قيمة لنشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة MCA/PA في المعاملة 10*UV15. أشار Tajik وزملاؤه (2014، 1,3,5) إلى تحسُّن نشاط تخثُّر الحليب الكُلِّيّ، والنَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ للبروتين في البروتياز المُنتَج بوساطة طفرة مُحدَثة في ذات الفطر باستخدام الجرعة الإشعاعيّة (280 nm, 20 cm, 52 sec). كما أشار Mattern وزملاؤه (1992، 336–332) إلى استحداث طفرات منقوصة البروتياز (Protease-deficient mutants) في فطر *Aspergillus niger* بوساطة الأشعّة فوق البنفسجيَّة. يخضع إفراز البروتياز للعديد من الآليّات والجينات المُنظِّمة (Snyman *et al*., 2019, 5519). ويعود اختلاف تأثير الأشعّة فوق البنفسجيَّة في تحسين أو تثبيط إنتاج البروتياز إلى اختلاف الأثر الحاصل على مستوى الـ DNA تبعاً لطبيعة وعدد القواعد النتروجينية المتأثِّرة، واختلاف عمليّات الإصلاح. رُبَّما أدّى تكوين المُنتَجات الضَّوئيَّة إلى حذف أو استبدال أو تضاعف شيفرة واحدة أو أكثر للبروتين المُشفِّر للبروتياز، أو الجينات المُنظِّمة لتخليقه، وبالتالي حدوث طفرات إيجابيّة أو سلبيّة. ويعود غياب الأثر المُطفِّر للأشعّة فوق البنفسجيَّة في إنتاج البروتياز في بعض المعاملات إلى نشاط أنزيم DNA photolyases، الَّذي يمكنه استعادة البنية الأصليّة للدنا حتى في الظلام (Vechtomova *et al*., 2021, 6).

من المعروف أنَّ حدوث الطفرة يعتمد على إحداث الضَّرر في الحمض النووي. وقد أشارت بعض الدراسات إلى ازدياد مُعدَّل حدوث الطفرات بازدياد جرعة المطفر. إذ أشار Zhang وزملاؤه (2016، 405f) إلى حدوث أعلى مُعدَّل إيجابي لحدوث طفرات إنتاج البروتياز في *Rhizomucor miehei* عند التعريض للأشعّة فوق البنفسجيَّة لمُدَّة 90 sec حيث كان مُعدَّل القتل 87.57%. كما أشار الباحثون في دراسة سابقة إلى حدوث أعلى مُعدَّل إيجابي لحدوث الطفرات في *Aspergillus oryzae* (5.41%) عند التعريض للأشعّة فوق البنفسجيَّة لمُدَّة 15 min حيث كان مُعدَّل القتل 81.90% (Zhang *et al*., 2014, 315). واعتمد Tajik وزملاؤه (2014، 5f) أعلى مُعدَّل للقتل لأمثلة جرعة الأشعّة فوق البنفسجيَّة لإحداث الطفرات في *Rhizomucor miehei*. ومن جهة أخرى، افترض باحثون آخرون خلاف ذلك، فقد أشار Shibai وزملاؤه (2017، 2) إلى عدم ارتباط مُعدَّل تراكم الطفرات المحدثة بالأشعّة فوق البنفسجيَّة بجرعة المطفِّر. وتشير النتائج في هذه الدراسة (الجدول 31) إلى عدم ارتباط حدوث الطفرة سواءً كانت إيجابيّة أو سلبيّة بجرعة المطفِّر. إذ لم تتغيَّر قيم المؤشِّرات بالضَّرورة بازدياد الجرعة الإشعاعيّة سواءً بزيادة مُدَّة التشعيع و / أو تخفيض المسافة من المصدر الإشعاعي. فعلى سبيل المثال، لم تتحسَّن قيم المؤشِّرات في الطفرة UV5*25 عنها في الطفرة UV10*25 عند تخفيض المسافة عن المصدر الإشعاعي. ولم تكن قيم المؤشِّرات في الطفرات UV5*20 وUV5*25 أعلى منها في الطفرة UV5*15 عند زيادة مُدَّة التشعيع. كما لم يُلحظ وجود طفرات في بعض المعاملات ذات المستوى الأعلى من الجرعة الإشعاعيّة. وتشير هذه النتائج إلى إمكانيّة حدوث الطفرة عند تجاوز جرعة المُطفِّر لعتبة مُعيَّنة كافية لإحداث الضَّرر في الحمض النَّوويّ، ولا يرتبط حدوث الطفرة بجرعة المُطفِّر عند تجاوز هذه العتبة. وهذا يخالف ما أشار إليه Zhang وزملاؤه (2016، 405f).

الجدول 31: إنتاج البروتياز بوساطة العزلات المعاملة بالأشعّة فوق البنفسجيَّة بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة.

المعاملة	رمز المعاملة	المحتوى البروتيني (mg/mL)	نشاط التخثُّر (SU/mL)	نشاط التخثُّر النَّوعيّ (SU/mg)	النشاط الحالّ للبروتين (PU/mL)	النشاط الحالّ النَّوعيّ (SU/mg)	نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ
الشاهد	B	4.87_{ab}	2190.85_{ak}	449.75_{abg}	5.69_{ade}	1.17_{a}	385.82_{abc}
UV							
5cm*5sec	UV5*5	4.90_{a}	2082.89_{ak}	425.04_{ag}	5.78_{ade}	1.18_{a}	362.15_{abe}
5cm*10sec	UV5*10	4.71_{abc}	2062.15_{ak}	437.81_{abg}	5.70_{ade}	1.21_{a}	363.67_{abe}
5cm*15sec	UV5*15	6.52_{d}	5506.47_{b}	997.49_{c}	10.40_{bc}	1.60_{a}	539.27_{ac}
5cm*20sec	UV5*20	5.32_{ae}	4422.29_{c}	844.55_{c}	8.43_{abe}	1.58_{a}	544.20_{ac}
5cm*25sec	UV5*25	5.16_{af}	3681.56_{di}	713.42_{e}	6.43_{abde}	1.24_{a}	574.97_{cg}
10cm*5sec	UV10*5	5.10_{af}	2975.54_{e}	583.41_{fh}	5.93_{ade}	1.16_{a}	503.47_{acd}
10cm*10sec	UV10*10	5.11_{af}	3471.47_{di}	679.42_{e}	6.33_{abde}	1.24_{a}	550.98_{ac}
10cm*15sec	UV10*15	3.70_{gh}	1519.07_{f}	410.69_{gjl}	5.13_{ade}	1.39_{a}	296.92_{be}
10cm*20sec	UV10*20	5.97_{de}	4922.93_{j}	824.61_{c}	8.92_{abef}	1.49_{a}	567.69_{cfg}
10cm*25sec	UV10*25	8.54_{i}	7514.71_{h}	880.46_{c}	13.90_{c}	1.63_{a}	554.56_{ac}
15cm*5sec	UV15*5	5.17_{af}	3776.79_{i}	730.44_{e}	6.84_{abde}	1.32_{a}	552.92_{ac}
15cm*10sec	UV15*10	3.42_{g}	1207.45_{fg}	353.03_{j}	4.90_{de}	1.43_{a}	246.38_{bh}
15cm*15sec	UV15*15	5.69_{efj}	4880.61_{j}	857.75_{c}	9.18_{abf}	1.61_{a}	554.84_{ac}
15cm*20sec	UV15*20	6.36_{dj}	5538.29_{b}	870.80_{c}	10.30_{bc}	1.62_{a}	553.88_{ac}
15cm*25sec	UV15*25	4.87_{ab}	2325.20_{a}	477.47_{akl}	6.20_{abde}	1.27_{a}	377.92_{abc}
20cm*5sec	UV20*5	4.98_{a}	2959.47_{e}	594.20_{f}	6.55_{abde}	1.31_{a}	455.55_{aecdi}
20cm*10sec	UV20*10	3.64_{gh}	1585.97_{fl}	435.66_{ag}	5.18_{ade}	1.42_{a}	308.59_{bde}
20cm*15sec	UV20*15	4.21_{bh}	2198.48_{ak}	522.16_{kh}	5.67_{ade}	1.34_{a}	392.56_{abc}
20cm*20sec	UV20*20	5.09_{af}	3388.59_{d}	665.65_{e}	6.23_{abde}	1.22_{a}	549.94_{ac}
20cm*25sec	UV20*25	8.45_{i}	7341.95_{h}	868.87c	12.97_{cf}	1.53_{a}	579.71_{c}
25cm*5sec	UV25*5	3.97_{gh}	1937.56_{kl}	488.65_{ak}	5.15_{ade}	1.30_{a}	380.18_{abc}
25cm*10sec	UV25*10	4.75_{abc}	2769.65_{e}	583.07_{fh}	6.11_{ade}	1.29_{a}	458.46_{acei}
25cm*15sec	UV25*15	4.11_{ch}	2077.25_{ak}	505.38_{bk}	5.66_{ade}	1.38_{a}	369.13_{afehi}
25cm*20sec	UV25*20	2.64_{k}	1074.44_{g}	406.93_{gj}	3.71_{d}	1.40_{a}	292.88_{bi}
25cm*25sec	UV25*25	4.69_{abc}	2753.24_{e}	587.00_{fh}	6.23_{abde}	1.33_{a}	446.23_{abc}

* القيم في العمود الواحد الَّتي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.01.

4-5-2- التطفير باستخدام الأمواج الميكرويّة:

يُبَيِّن الجدول 32 عائد ونشاط البروتياز المُنتَج بوساطة العزلات المُعرَّضة للأمواج الميكرويّة بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة. وقد أُجريت المعاملات لفترات تصل إلى 210 sec، إذ لم يمكن السَّيطرة على الأثر الحراري للأمواج الميكرويّة لفترات أطول. ويُبيِّن التحليل الإحصائي للنتائج ظهور الاختلافات المعنوية في جميع المعاملات بالمقارنة مع الشاهد، إذ كانت الأمواج الميكرويّة قادرة على إحداث الطفرات في جميع المعاملات، ما يؤكِّد دور الأثر غير الحراري للأمواج الميكرويّة في إحداث الطفرات فوق المستوى التلقائيّ لحدوث الطفرة. فقد أدَّت أربع معاملات إلى ظهور طفرات مرتفعة الإنتاج للبروتياز، وكانت الطفرة MW_{150} هي الفائقة في جميع المؤشِّرات. وقد أظهر المستخلص الأنزيمي المُنتَج بوساطة هذه الطفرة تحسُّناً بمقدار 1.86، 3.68، 1.98، 2.18 ضِعفاً في كلٍ من المحتوى الأنزيمي، ونشاط تخثُّر الحليب الكُلِّيّ، ونشاط التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ للبروتين، على التَّوالي بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة. وقد لوحظ ظهور كلٍ من الطفرات الإيجابيّة والسَّلبيّة في المعاملات، إذ انخفض إنتاج البروتياز في الطفرة MW180 بمقدار 23.11% بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة. وكان مُعدَّل حدوث الطفرات الإيجابيّة هو الأعلى. وقد أشار Li وزملاؤه (2010، 194) إلى الحصول على طفرات فائقة الإنتاج للسيلولاز من فطر *Trichoderma viride* محدثة بوساطة الأمواج الميكرويّة بجرعات تشعيع مماثلة (2450 MHz; 15-195 sec).

يرتبط التَّأثير غير الحراري للأمواج الميكرويّة بالعديد من التغيُّرات داخل الخليّة. فقد أشار Grünefeld و Richert (2006، 815) إلى ارتفاع مُعدَّل استقلاب الـ DNA بفعل التَّعريض للأمواج الميكرويّة، وتطلُّب توليفات الحمض النووي بمساعدة الميكروويف مُعدَّلات أقل من الفوسفوراميدات، و / أو فترات اقتران أقل من تلك الَّتي تحدث في الظروف الطبيعيَّة. كما أكَّد Shaw وزملاؤه (2021، 7) أنَّ التَّعرُّض للأمواج الميكرويّة يُحفِّز إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعليّة (ROS) داخل الخلايا. رُبَّما تضاعفت الجينات المُرمِّزة للبروتياز أو حُذفت بعض القواعد خلال الاستقلاب السريع لـ DNA النَّاجم عن التعريض للأمواج الميكرويّة، ما أدَّى إلى ظهور فعالية مرتفعة للبروتياز وأخرى منخفضة ضمن المعاملات. ولرُبَّما أدَّت الأمواج الميكرويّة إلى تسريع الأيونات واصطدامها بباقي الجزيئات، أو أنَّها سبَّبت تدوير ثنائيّات القطب وانتظامها

بشكل متناوب وبسرعة عالية، وبالتالي فقد أدَّى المجال الكهربائي الناتج إلى تغيير في بنية الـ DNA الثانويّة والثالثيّة (Sato *et al*., 1996, 145-150)، ما يترتب على ذلك ظهور صفات جديدة في الخلايا المُعرَّضة للأمواج. هذا ولم يرتبط مُعدَّل ظهور الطفرات (إيجابية أو سلبية) بمُدَّة التعرّض، خلافاً لما أشار إليه Li وزملاؤه (2010، 198) حول ازدياد مُعدَّل حدوث الطفرات الإيجابية بازدياد مُدَّة التعرُّض للأمواج الميكرويّة.

الجدول 32: إنتاج البروتياز بوساطة العزلات المعاملة بالأمواج الميكرويّة بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة.

المعاملة	رمز المعاملة	المحتوى البروتيني (mg/mL)	نشاط التخثُّر (SU/mL)	نشاط التخثُّر النَّوعيّ (SU/mg)	النشاط الحالّ للبروتين (PU/mL)	النشاط الحالّ النَّوعيّ (SU/mg)	نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ
الشاهد	B	4.87_{ab}	2190.85_{ak}	449.75_{abg}	5.69_{ade}	1.17_{a}	385.82_{abc}
الأمواج الميكرويّة							
90 sec	MW90	5.11_{a}	3642.37_{b}	712.75_{bc}	6.74_{a}	1.32_{a}	543.03_{b}
120 sec	MW120	5.02_{a}	3479.17_{b}	693.08_{b}	6.47_{a}	1.29_{a}	539.10_{b}
150 sec	MW150	9.06_{b}	8063.19_{c}	890.15_{d}	9.62_{b}	1.06_{b}	838.51_{c}
180 sec	MW180	3.92_{c}	1684.51_{d}	429.78_{a}	5.11_{a}	1.30_{a}	333.98_{a}
210 sec	MW210	5.19_{a}	3874.38_{b}	746.48_{c}	6.95_{a}	1.34_{a}	558.16_{b}

* القيم في العمود الواحد الَّتي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.01.

4-5-3- التطفير باستخدام إيثيل سلفونات الميثان:

يُبَيِّن الجدول 33 إنتاج البروتياز بوساطة العزلات المُعاملة بإيثيل سلفونات الميثان بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة. أدّت المعاملات إلى ظهور 24 طفرة ذات نشاط منخفض للبروتياز، و5 طفرات ذات نشاط مرتفع، ولم ينتج عن المعاملة المتبقِّية أثر معنوي في إنتاج البروتياز بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة. إذ أدَّت المعاملة (EMS_{20*10} (20µg; 10 min إلى ازدياد قيم بعض المؤشِّرات المُقاسة وانخفاض بعضها الآخر لكن لم يظهر اختلاف معنوي في هذه القيم بالمقارنة مع الشاهد، بينما أدَّت المعاملات EMS_{20*20}، وEMS_{35*30}، وEMS_{65*20}، وEMS_{65*30} إلى ازدياد قيم جميع المؤشِّرات مع ظهور اختلاف معنوي في البعض منها. وأدَّت المعاملة EMS_{35*20} إلى ظهور طفرة فائقة لجميع المعاملات إذ أظهر المستخلص الأنزيمي المُنتَج بوساطة هذه الطفرة تحسُّناً بمقدار 1.53، 1.46، 1.40 ضِعفاً في كلٍ من نشاط تخثُّر الحليب الكُلِّيّ، ونشاط

التخثُّر النَّوعيّ، ونسبة نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ للبروتين، على التَّوالي بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة. وقد أدَّت بقية المعاملات إلى ظهور طفرات سلبية في إنتاج البروتياز حيث انخفضت قيم جميع المؤشِّرات بشكل معنوي بالمقارنة مع الشاهد، وقد سُجِّلت أعلى نسبة للانخفاض في نشاط التخثُّر الكُلِّيّ في المستخلص الأنزيمي الناتج عن الطفرة EMS_{65*40}، إذ انخفض بمقدار 59.13% بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة. وقد أشار kumar (2015، 8) إلى ظهور أثر سلبيّ مُشابِه في إنتاج الأنزيمات في فطر *Aspergillus terreus* بفعل المعاملة بـ EMS. كما أشار Lai وزملاؤه (2004، 625) إلى ظهور كلٍ من الأثر الإيجابيّ والسَّلبيّ للتطفير في نشاط البروتياز في الطفرات المُحدَثة بوساطة EMS. وقد عزا Ribeiro وزملاؤه (2013، 326) التحسن في إفراز الأنزيمات في الطفرات المُحدَثة بوساطة EMS في *Ashbya gossypii* إلى تأثير التَّطفير في المسارات الاستقلابية للأنزيم. رُبَّما أدّى الاستبدال المتكافئ للقواعد النتروجينية بفعل EMS إلى تحوير الجينات المُنظِّمة للبروتياز، ما أدّى إلى تحفيز أو تثبيط إنتاج البروتياز. ولرُبَّما أدّى الاستبدال المتكافئ إلى حذف قاعدة أو أكثر من الحمض النووي، ما أدّى إلى تحوير البروتياز أو فقده لنشاطه. هذا وقد كانت نسبة حدوث الطفرات السَّلبية في المعاملات الخاصّة بـ EMS أعلى منها في معاملات التطفير الأخرى. وهذا يوافق ما أشار إليه Radha وزملاؤه (2012، 1525) حول تفوُّق نسبة التحسُّن في إنتاج البروتياز في الطفرات المُحدَثة بوساطة الأشعّة فوق البنفسجيَّة عنها في الطفرات المُحدَثة بوساطة EMS. وكما هو الحالّ في معاملات الأمواج الميكرويّة والأشعّة فوق البنفسجيَّة، لم يكن حدوث الطفرات مرتبطاً بجرعة المُطفِّر.

الجدول 33: إنتاج البروتياز بوساطة العزلات المعاملة بإيثيل سلفونات الميثان بالمقارنة مع العزلة الطبيعيَّة.

المعاملة	رمز المعاملة	المحتوى البروتيني (mg/mL)	نشاط التخثُّر (SU/mL)	نشاط التخثُّر النَّوعيّ (SU/mg)	النشاط الحالّ للبروتين (PU/mL)	النشاط الحالّ النَّوعيّ (SU/mg)	نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ
الشاهد	B	4.87_{ab}	2190.85_{ak}	449.75_{abg}	5.69_{ade}	1.17_{a}	385.82_{abc}
EMS							
20µ * 10m	EMS_{20*10}	4.90_{a}	2128.70_{ab}	434.42_{abd}	5.20_{abc}	1.06_{ab}	413.11_{hcj}
20µ * 20m	EMS_{20*20}	5.30_{b}	2435.82_{c}	459.56_{ad}	5.43_{abc}	1.02_{a}	449.73_{abhc}
20µ * 30m	EMS_{20*30}	3.22_{c}	895.31_{d}	278.03_{cn}	3.91_{b}	1.21_{ab}	231.81_{fek}
20µ * 40m	EMS_{20*40}	3.52_{d}	1530.00_{e}	434.63_{abd}	4.80_{abc}	1.36_{ab}	320.25_{deij}
20µ * 50m	EMS_{20*50}	3.43_{d}	1483.64_{e}	432.53_{ab}	4.53_{abc}	1.32_{ab}	329.74_{deij}
20µ * 60m	EMS_{20*60}	3.22_{c}	1400.07_{ef}	434.77_{abd}	4.58_{abc}	1.42_{b}	309.49_{defik}
35µ * 10m	EMS_{35*10}	4.32_{e}	1762.96_{j}	408.06_{bef}	4.95_{abc}	1.15_{ab}	358.00_{dicj}
35µ * 20m	EMS_{35*20}	5.11_{f}	3360.01_{h}	657.45_{g}	6.23_{c}	1.22_{ab}	543.87_{ab}
35µ * 30m	EMS_{35*30}	4.98_{ag}	2448.73_{c}	491.65_{h}	5.33_{abc}	1.07_{ab}	460.57_{abh}
35µ * 40m	EMS_{35*40}	3.52_{d}	962.62_{d}	273.82_{c}	4.19_{ab}	1.19_{ab}	231.52_{fke}
35µ * 50m	EMS_{35*50}	3.72_{h}	1194.10_{g}	321.41_{im}	4.32_{ab}	1.16_{ab}	278.42_{eki}
35µ * 60m	EMS_{35*60}	3.90_{ip}	1292.32_{fgk}	331.33_{im}	4.45_{ab}	1.14_{ab}	291.62_{dei}
50µ * 10m	EMS_{50*10}	3.61_{dh}	1550.07_{e}	429.94_{ab}	5.17_{abc}	1.43_{b}	301.40_{dei}
50µ * 20m	EMS_{50*20}	4.70_{jk}	1983.34_{blm}	421.99_{abe}	5.25_{abc}	1.12_{ab}	380.17_{bcd}
50µ * 30m	EMS_{50*30}	4.82_{aj}	2016.03_{al}	418.25_{befj}	5.21_{abc}	1.08_{ab}	389.50_{bcj}
50µ * 40m	EMS_{50*40}	3.84_{hip}	1211.45_{g}	315.45_{im}	4.37_{abc}	1.14_{ab}	279.29_{fei}
50µ *50m	EMS_{50*50}	4.06_{lo}	1883.09_{jln}	464.49_{dh}	4.93_{abc}	1.21_{ab}	384.40_{djch}
50µ * 60m	EMS_{50*60}	3.95_{il}	1748.57_{j}	442.66_{adj}	4.82_{abc}	1.22_{ab}	365.49_{dicj}
65µ *10m	EMS_{65*10}	4.15_{o}	2046.10_{aln}	493.00_{h}	5.12_{abc}	1.23_{ab}	401.35_{chdj}
65µ *20m	EMS_{65*20}	4.63_{kmn}	2576.84_{co}	556.49_{k}	5.68_{abc}	1.23_{ab}	455.75_{bch}
65µ * 30m	EMS_{65*30}	5.04_{fg}	2681.69_{o}	532.52_{k}	5.71_{ac}	1.13_{ab}	473.93_{abh}
65µ * 40m	EMS_{65*40}	3.52_{d}	895.30_{d}	254.33_{c}	4.06_{ab}	1.15_{ab}	221.24_{f}
65µ * 50m	EMS_{65*50}	4.64_{kmn}	1813.34_{jmip}	390.77_{e}	5.05_{abc}	1.09_{ab}	365.22_{djci}
65µ * 60m	EMS_{65*60}	4.69_{km}	1894.53_{jlp}	403.90_{be}	5.32_{abc}	1.13_{ab}	357.80_{dji}
80µ * 10m	EMS_{80*10}	4.71_{jm}	1958.40_{lin}	415.77_{belj}	5.21_{abc}	1.11_{ab}	377.73_{hcd}
80µ * 20m	EMS_{80*20}	3.65_{h}	983.70_{d}	269.49_{c}	4.25_{ab}	1.16_{ab}	232.83_{fke}
80µ * 30m	EMS_{80*30}	4.52_{n}	1983.34_{bnp}	438.81_{adfl}	5.19_{abc}	1.15_{ab}	385.17_{bcd}
80µ * 40m	EMS_{80*40}	3.83_{ip}	1177.34_{g}	307.38_{mn}	4.28_{ab}	1.12_{ab}	277.13_{fe}
80µ * 50m	EMS_{80*50}	4.53_{n}	1847.55_{jlp}	407.83_{bel}	4.98_{abc}	1.10_{ab}	373.06_{hcdk}
80µ * 60m	EMS_{80*60}	4.1_{1o}	1420.90_{ek}	345.70_{i}	5.20_{abc}	1.26_{ab}	274.52_{efki}

* القيم في العمود الواحد الَّتي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.01.

4-5-4- الثَّبات الوراثي للطفرات المغربلة:

تمَّ اختيار الطفرات UV_{10*25}، وEMS_{35*20}، وMW_{150} لاختبار ثباتيّة التغيُّر الوراثي بعد ثمانية أجيال بناءً على تفوّقها على باقي العزلات المُعرَّضة لعوامل التطفير ضمن كل مجموعة. ويُبَيِّن الجدول 34 مقارنة لإنتاج البروتياز ما بين الجيل الأوَّل والجيل الثامن للطفرات المغربلة، لم تكن الطفرة UV_{10*25} مستقرَّة، وظهر انخفاض في المؤشِّرات المُقاسة للمستخلص الأنزيمي المُنتَج بوساطة هذه الطفرة بعد 8 أجيال بالمقارنة مع الجيل الأوَّل للطفرة، وبالرّغم من عدم ثباتية الطفرة EMS_{35*20} فقد أظهر الجيل الثامن تغيُّراً إيجابياً في المؤشِّرات المُقاسة. وإنَّ حدوث الطفرات غير المستقرَّة شائع الظهور مع المُطفِّرات الكيميائيَّة والأشعّة فوق البنفسجيَّة (Auerbach, 2013, 445). كانت الطفرة المُحدثة بالأمواج الميكرويّة (MW_{150}) أكثر استقراراً بعد ثمانية أجيال. وقد كانت المؤشِّرات الأنزيمية المُقاسة متماثلة تقريباً في الجيلين الأوَّل والثامن. وبناءً على ذلك، فقد تمَّ اختيار هذه الطفرة للخطوات اللّاحقة من الدراسة.

الجدول 34: ثباتية الطفرات المغربلة في إنتاج البروتياز.

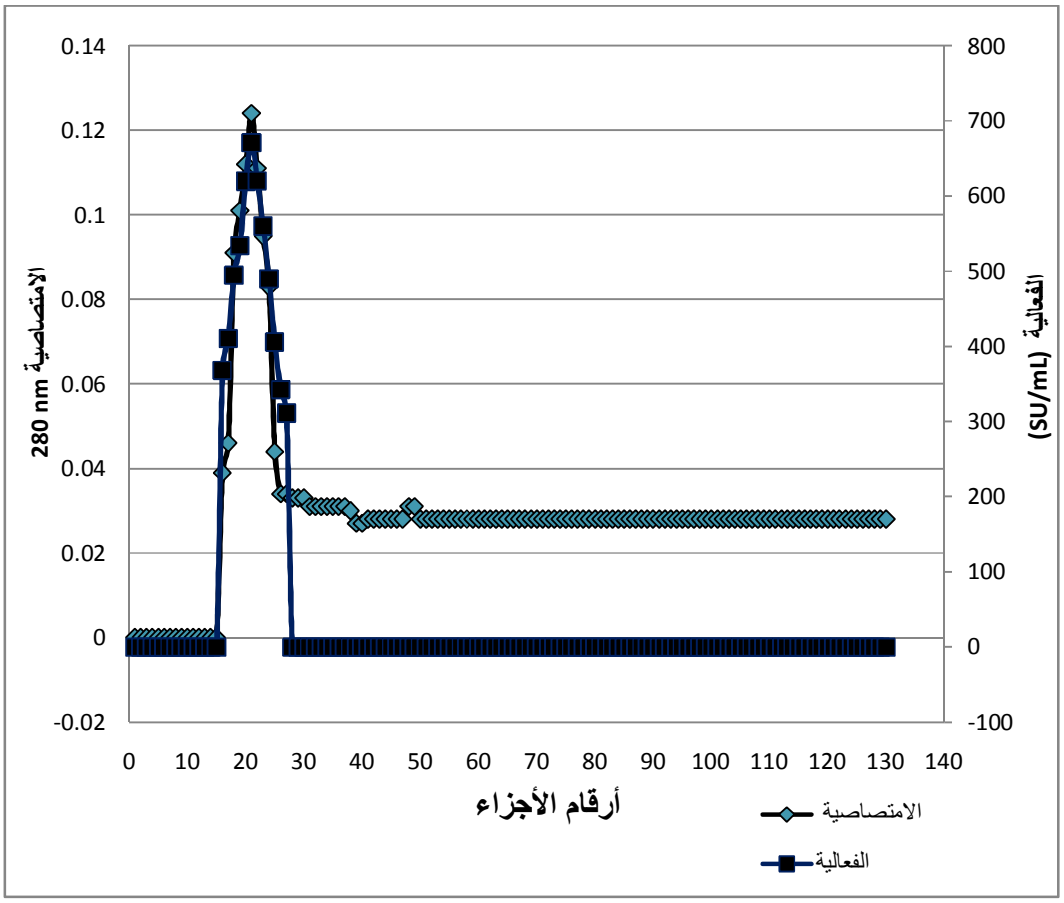
الطفرات	المحتوى البروتيني (mg/mL)	نشاط التخثُّر (SU/mL)	نشاط التخثُّر النَّوعيّ (SU/mg)	النشاط الحالّ للبروتين (PU/mL)	النشاط الحالّ النَّوعيّ (SU/mg)	نشاط التخثُّر/ النشاط الحالّ
الجيل الأوَّل						
MW150	9.06	8063.19	890.15	9.62	1.06	838.51
UV10*25	8.54	7514.71	880.46	13.90	1.63	554.56
EMS35*20	5.11	3360.01	657.45	6.23	1.22	543.87
الجيل الثامن						
MW150	8.25	8022.92	972.48	9.13	1.11	878.74
UV10*25	6.41	5400.00	842.43	9.11	1.42	592.76
EMS35*20	5.22	5016.44	961.00	8.87	1.70	565.55

4-5-5- التنقية الجزئية للبروتياز المُنتَج من العزلة المُطفَّرة *Rhizomucor miehei* MW150:

يُبيِّن الجدول 35 ملخَّصاً لخطوات التنقية لبروتياز *Rhizomucor miehei* MW150، حيث أدَّى ترسيب البروتياز بسلفات الأمونيوم إلى ارتفاع الفعاليّة النوعية للأنزيم بمقدار 5.22 أضعاف. كما أدَّى فصل الراسب الناتج على عمود الترشيح إلى ازدياد الفعاليّة النَّوعيّة للبروتياز وانخفاض في المحتوى البروتيني. ويُبيِّن الشكل 12 قيم الامتصاصية الضَّوئيَّة والفعاليّة الأنزيمية لأجزاء العينة المُسرَّبة من أنبوب التنقية. وقد أظهرت الأجزاء 16-27 أعلى امتصاصية للضوء عند طول موجة 280 nm. كما أظهرت هذه الأجزاء ارتفاع في الفعاليّة الأنزيمية، إذ بلغت الفعاليّة الأنزيمية أقصاها (670 SU/mL) في الجزء 21 للقمّة البروتينية، وقد أعطى جمع هذه الأجزاء مُحضَّراً أنزيمياً بدرجة نقاوة تُعادِل 5.19 أضعاف بالمقارنة مع المُحضَّر الأنزيمي الخام، وبحصيلة أنزيمية مقدارها 4.01%. كما تَظهر الدرجة المرتفعة لنقاوة المُحضَّر الناتج من خلال تطابُق قِمَّتي البروتين والفعاليّة الأنزيمية.

الجدول 35: مراحل التنقية للبروتياز المُنتَج من *Rhizomucor miehei* MW150.

خطوات التنقية	الحجم (mL)	الفعاليّة الأنزيمية (SU/mL)	الفعاليّة الكُلِّيّة (SU)	تركيز البروتين (mg/mL)	الفعاليّة النَّوعيّة (SU/mg)	معامل التنقية	المردود %
الأنزيم الخام	60	8063.19	483791.30	9.06	890.15	1.00	100
الترسيب بسلفات الأمونيوم	10	41766.11	417661.10	8.98	4651.01	5.22	86.33
التنقية بهالم Sephadex G-100	12	485.93	5831.16	0.11	4618.85	5.19	4.01



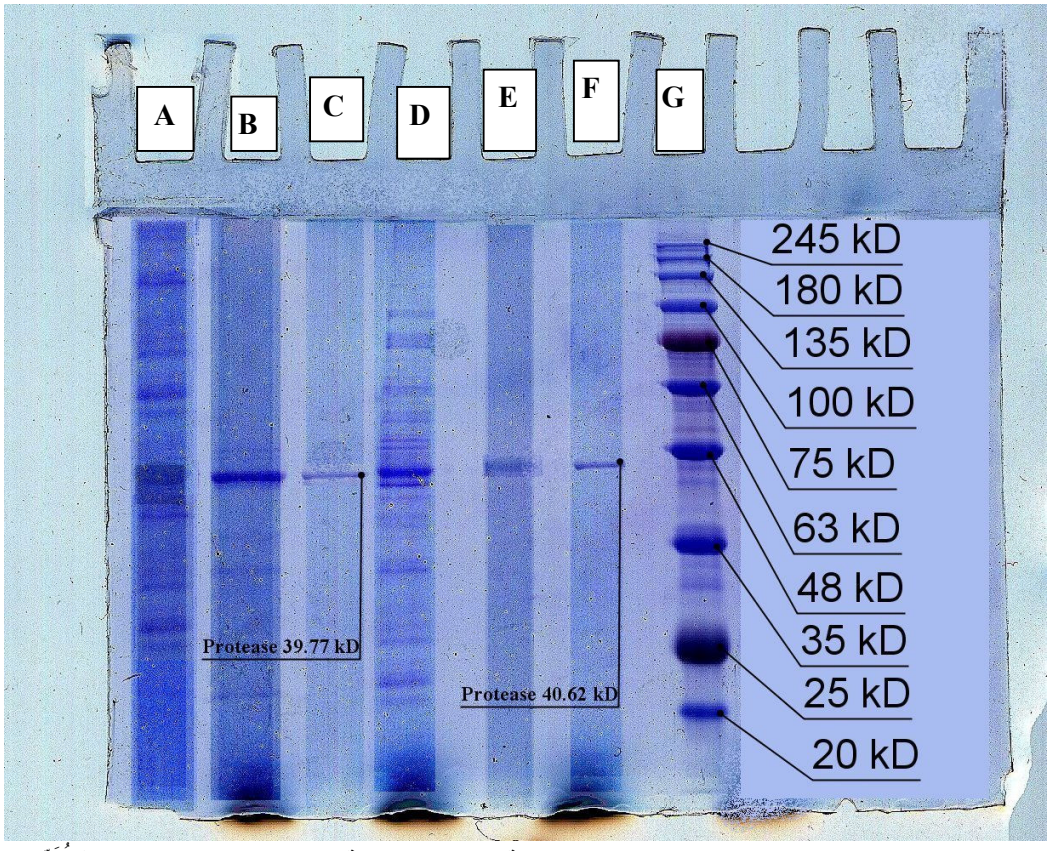
الشكل 12: ترشيح بروتياز MW150 *Rhizomucor miehei* (المرسَّب بسلفات الأمونيوم)، باستخدام عمود Sephadex-G 100 (بأبعاد 30 cm × 2.6، والموازن بدارئ فوسفات 0.02 M; pH 6، بمعدَّل جريان 1 mL/min).

4-6- توصيف البروتياز المُنتَج من العزلتين الطبيعيَّة والمُطفَّرة:

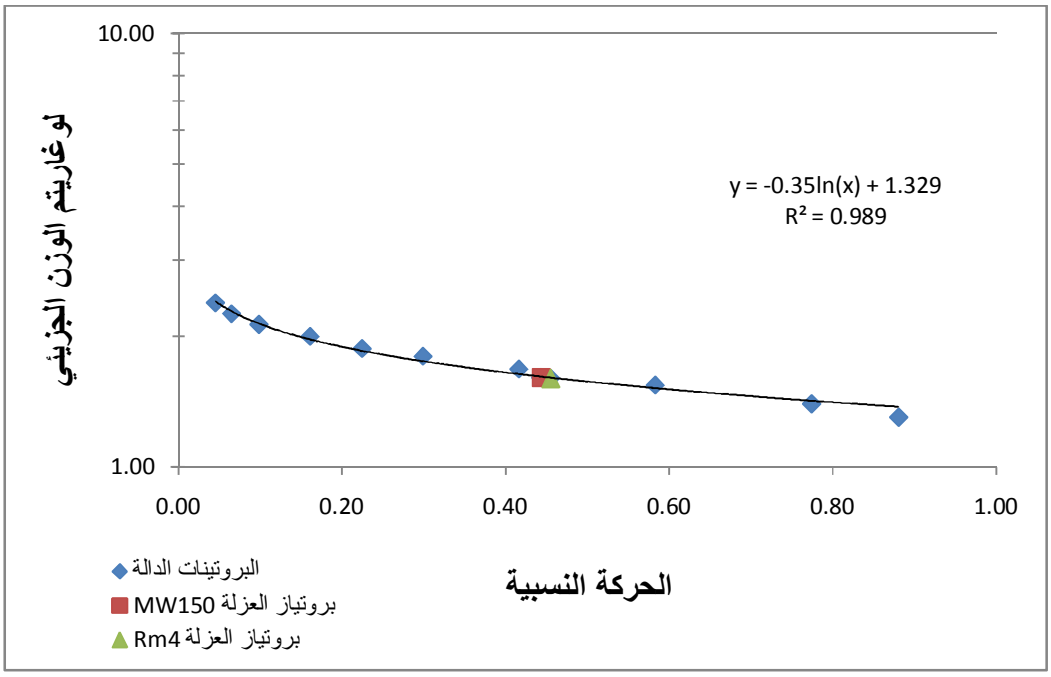
4-6-1- تقدير الوزن الجزيئي:

يُبيِّن الشكل 13 نتائج عملية الرحلان الكهربائي للأجزاء الناتجة عن مراحل التنقية (المسارات A، B، C، D، E، F) بالمقارنة مع هجرة البروتينات الدَّالَّة (المسار G)، فقد أظهر كلٌ من مساري الأنزيم المُنقَّى (C و F) حزمة بروتينية واحدة، ما يُشير إلى نقاوة المُحضَّر الأنزيمي. رُسِمَ المنحني القياسي الَّذي تتمثَّل فيه قيم لوغاريتم الأوزان الجزيئيّة للبروتينات الدَّالَّة مقابل الحركة النسبية لتلك البروتينات (الشكل 14)، وقُدِّرَت الأوزان الجزيئية للحزم البروتينية المطلوبة وفقاً للعلاقة النّاتجة. وبلغ الوزن الجزيئي لبروتياز العزلة Rm4 حوالي 39.77 kDa، كما قُدِّرَ الوزن الجزيئيّ لبروتياز العزلة Mw150 بحوالي 40.62 kDa. يختلف الوزن الجزيئيّ

للبروتياز تبعاً لمصدره، فقد قُدِّرَ الوزن الجزيئيّ للبروتياز من *Bacillus subtilis* بحوالي 15 kDa (Adinarayana *et al*., 2003, 443)، و23 kDa و24 kDa من عزلات *Nesterenkonia halobia* (Gessesse *et al*., 2003, 521)، و32 kDa في *Aspergillus clavatus* (Hajji *et al*., 2007, 793)، و46 kDa في *Aspergillus flavus* (Hossain *et al*., 2006, 163)، و124 kDa في *Aspergillus fumigates* (Wang *et al*., 2005, 662). وقد يختلف الوزن الجزيئيّ وفقاً لطريقة التقدير المُستخدَمة، إذ قُدِّر الوزن الجزيئي لأنزيم Mucorpepsin من فطر *Rhizomucor pusillus* بحوالي 49 kDa باستخدام طريقتي كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي (Sephadex G-100) والرحلان الكهربائي، و46 kDa بالاعتماد على تحليل الحموض الأمينيّة (Abdelouahab *et al*., 2015, 350ff). وتُقارب النتائج ما أشار إليه Da Silva وزملاؤه (2016، 1062f) "37 kDa"، و Preetha و Boopathy (1997، 574) "40.5 kDa".



الشكل 13: الرحلان الكهربائي لعينات البروتين الناتجة عن مراحل التنقية باستخدام SDS-PAGE، إذ يُمثِّل A وD مساري البروتينات في عينة الأنزيم الخام للعزلتين Rm4 وMW150 على التَّوالي، والمسار B وE عينات الأنزيم الناتجة عن الترسيب بسلفات الأمونيوم للعزلتين Rm4 وMW150 على التَّوالي، والمسار C وF عينات البروتين للعزلتين Rm4 وMW150 على التَّوالي بعد التنقية باستخدام هالم Sephadex G-100، والمسار (G) مؤشِّر لبروتينات معروفة الوزن الجزيئي.



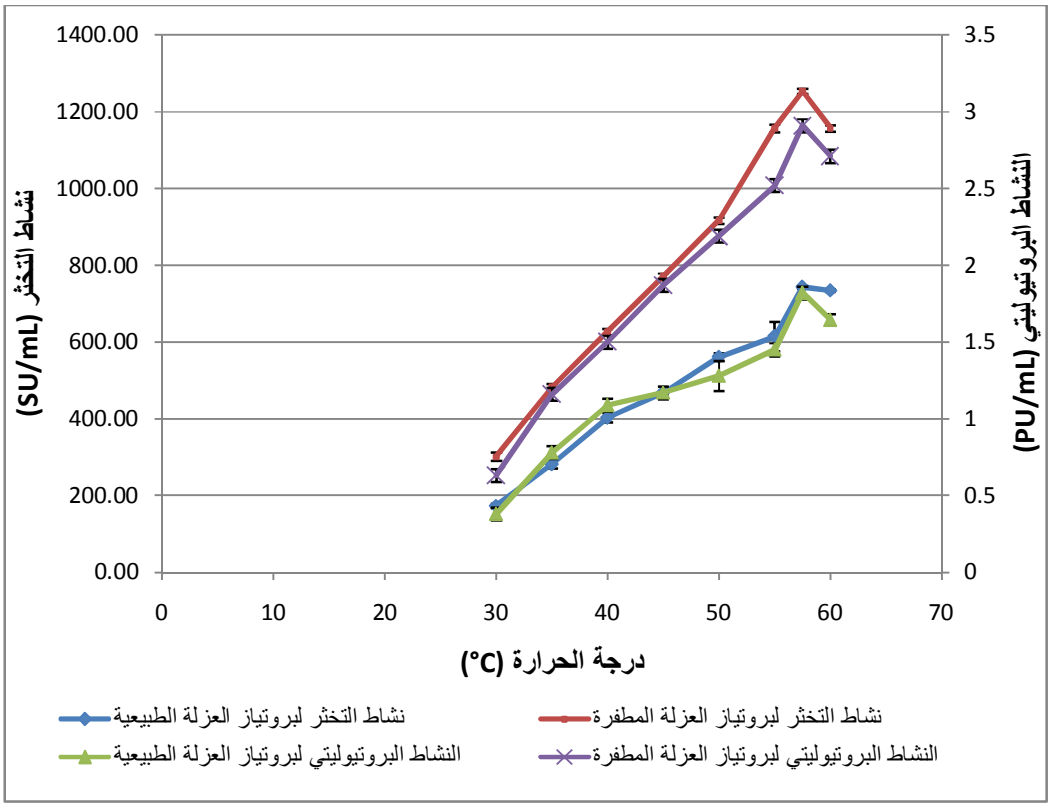
الشكل 14: تحديد الوزن الجزيئي للبروتياز من العزلتين Rm4 وMW150 اعتماداً على المنحني القياسي للوغاريتم الأوزان الجزيئيّة للبروتينات الدَّالَّة مقابل حركتها النسبية بعد الرحلان الكهربائي على هالم SDS-PAGE.

4-6-2- دراسة بعض الخواص الحركيَّة للأنزيم:

4-6-2-1- تأثير درجة الحرارة في فعالية البروتياز:

يُبيِّن الشكل 15 تأثير درجة الحرارة في نشاط التخثُّر للبروتياز المُنتَج بوساطة العزلتين الطبيعيَّة والمطفرة، حيث ازداد نشاط التخثُّر لكلٍ من بروتياز العزلة الطبيعيَّة والمطفرة بشكل معنوي بازدياد درجة الحرارة، كما ازداد النشاط الحالّ للبروتين لكلٍ من بروتياز العزلة الطبيعيَّة والمطفرة بشكل معنوي ضمن المجال 30-57.5 °C فيما عدا التغيُّر الظاهري في النشاط الحالّ للبروتين لبروتياز العزلة الطبيعيَّة عند درجتي الحرارة 40 و50 °C. وقد بلغت الفعاليّة الأنزيمية أقصاها عند درجة حرارة 57.5 °C، ويعود ذلك لازدياد مُعدَّل الحركة الجزيئية بارتفاع درجة الحرارة وبالتالي ازدياد مُعدَّل التفاعل. انخفض نشاط التخثُّر لبروتياز العزلة الطبيعيَّة ظاهرياً عن القيمة الأخيرة وظهر انحفاض معنوي في نشاط التخثُّر لبروتياز العزلة المُطفّرة والنشاط الحالّ للبروتين لكلا العزلتين عند درجة حرارة 60 °C، ويعود ذلك للتّخريب الجزئي لبنية الأنزيم بفعل الحرارة. وتُقارب هذه النتائج ما أشار إليه Khalil Moghaddam وزملاؤه (2008، 151)، و Da Silva

وزملاؤه (2016، 1063f)، وFoda وزملاؤه (2012، 585)، وتختلف عمّا أشار إليه Ataci وزملاؤه (2009، 1756).



الشكل 15: تأثير درجة الحرارة في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei*.

4-6-2-2- الثَّبات الحراري للبروتياز اتجاه درجة الحرارة:

أظهر الأنزيم ثباتيّة عالية اتجاه الارتفاع في درجة الحرارة، إذ لم تتأثَّر الفعاليّة الأنزيمية لبروتياز العزلتين الطبيعيَّة والمُطفَّرة عند التعرُّض لدرجات حرارة تصل إلى 50 °C لمُدَّة 24 hrs. واحتفظ أنزيم العزلة Rm4 بـ 92.28 و86.49% من فعاليته عند التعرُّض لدرجتي الحرارة 40 °C و50 °C على التَّوالي لمُدَّة 48 hrs. كما احتفظ أنزيم العزلة MW150 بـ 93.11 و85.32% عند التعرُّض لنفس الظروف السابقة. كما احتفظ أنزيم العزلة Rm4 بـ 75.69% و62.25%، واحتفظ أنزيم العزلة MW150 بـ 74.1% و61.97% عند التعرُّض لدرجتي الحرارة 60 °C و70 °C لمُدَّة 105 وmin 10 على التَّوالي، بينما تثبَّطت كامل الفعاليّة لكلٍ من الأنزيمين عند التعرُّض لدرجتي الحرارة السابقتين لفترات أطول (الجدول 36). تُبدي الأنزيمات الميكروبية ثباتاً أكبر اتجاه الارتفاع في درجات الحرارة، خاصّةً الأنزيمات المُشتقَّة من الكائنات المحبة للحرارة

المرتفعة. ويعود التَّثبيط التدريجي للأنزيم إلى تشوّه الطبيعة البروتينية اعتماداً على مُدَّة التعرُّض للحرارة (Robinson, 2015, 16f). وتوافق هذه النتائج ما توصَّل إليه Foda وزملاؤه (2012، 586).

الجدول 36: الفعاليّة الأنزيمية المتبقِّية (%) لبروتياز *Rhizomucor miehei* تحت تأثير المعاملة الحراريَّة.

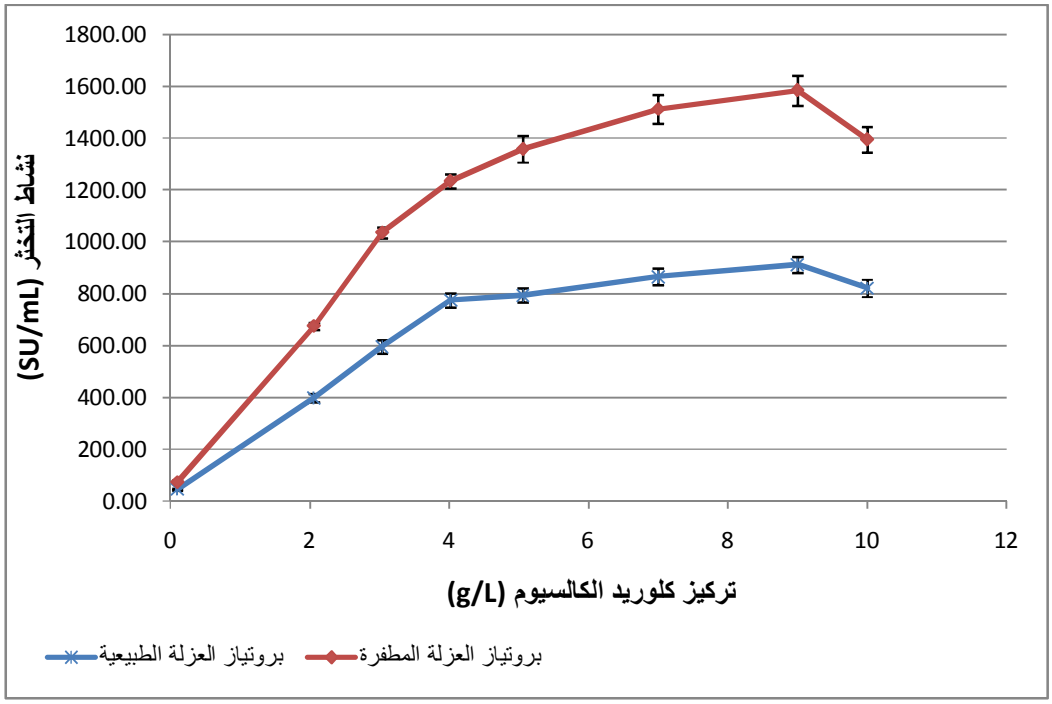
العزلة المُنتِجة	زمن المعاملة (min) / درجة الحرارة (°C)	10	15	60	75	90	105	120	1440	2880
Rm4	40	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	92.28
MW150	40	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	93.11
Rm4	50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	100	86.49
MW150	50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	100	85.32
Rm4	60	ND	ND	87.01	85.7	83.32	75.69	0	ND	ND
MW150	60	ND	ND	87.42	84.12	83.11	74.1	0	ND	ND
Rm4	70	62.25	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MW150	70	61.97	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

* ND: القيمة غير مُقاسة عند المعاملة المذكورة. الفعاليّة المتبقِّية مُقدَّرة كنسبة مئوية من فعالية الأنزيم غير المعامل حرارياً، والمُقاسة عند درجة حرارة 35 °C.

4-6-2-3- تأثير كلوريد الكالسيوم في فعالية الأنزيم:

يُبيِّن الشكل 16 الأثر الإيجابيّ لكلوريد الكالسيوم في فعالية التخثُّر للبروتياز المُنتَج من العزلتين الطبيعيَّة والمُطفَّرة. إذ أظهر كلٌ من المُحضَّرين الأنزيميين حساسيّة مرتفعة اتجاه وجود كلوريد الكالسيوم في وسط التفاعل، إذ ازداد نشاط التخثُّر بازدياد تركيز كلوريد الكالسيوم ليبلغ أقصاه عند تركيز 9 g/L، وبلغ مقدار الزيادة في النشاط 323.48% و326.16% في كلٍ من الأنزيم الطبيعي والمُطفَّر، ثُمَّ انخفض النشاط الأنزيمي لكلٍ من المُحضَّرين عند التركيز الأعلى 10) (g/L. يلعب كلوريد الكالسيوم دوراً هاماً في تعزيز الارتباط بالركازة، وكعامل مُحفِّز للبروتياز،

بالإضافة إلى الأثر غير المباشر في التخفيض النِّسبيّ لقيم الـ pH للحليب (Ahmed *et al*,. 2010, 761). تُشابه هذه النتائج ما توصَّل إليه Preetha وBoopathy (1997، 576)، وFoda وزملاؤه (2012، 586) حول حساسية البروتياز اتجاه كلوريد الكالسيوم، لكن تختلف عن التركيز الأمثل الَّذي أشار إليه الباحثون (44.39 g/L، و5.55 g/L على التَّوالي).

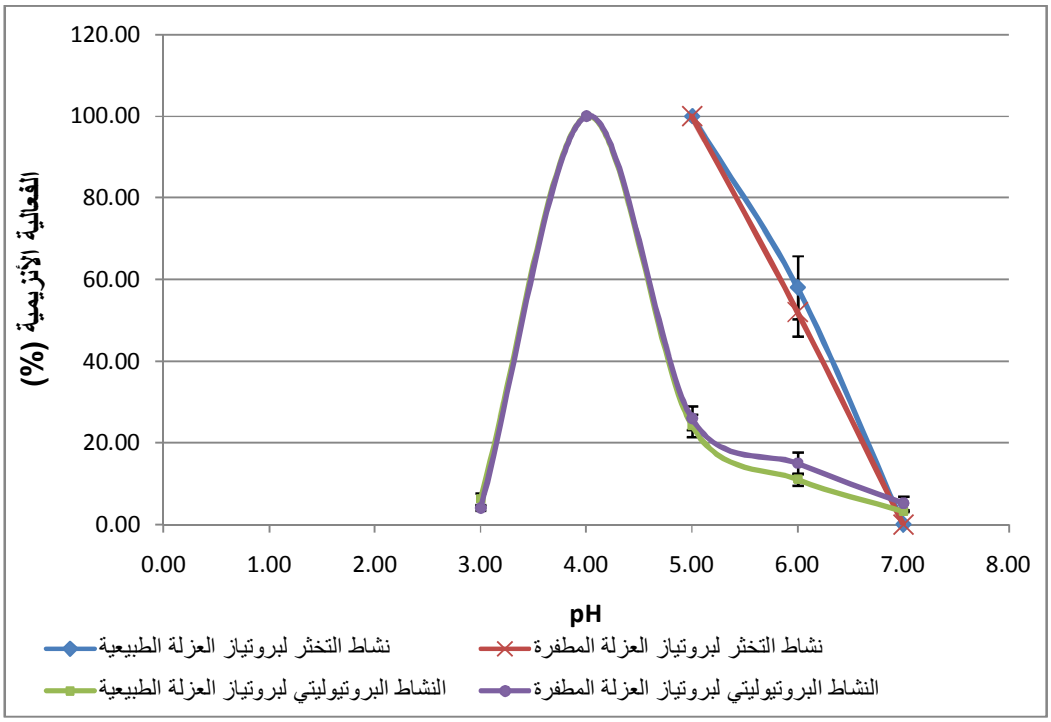


الشكل 16: تأثير كلوريد الكالسيوم في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei*.

4-6-2-4- تأثير الـ pH في فعالية الأنزيم وثباتيته:

يُبيِّن الشكل 17 تأثير الـ pH في فعاليّة البروتياز المُنتَج من العزلتين الطبيعيَّة والمُطفَّرة، حيث تحقَّقَت أعلى قيم لنشاط تخثُّر الحليب عند pH 5، وانخفض النشاط عند pH 6، وكان نشاط التخثُّر معدوماً عند pH 7. بينما تحقَّقَت أعلى قيمة للنشاط الحالّ للبروتين عند pH 4، وانخفض هذا النشاط عند الدَّرجات الأخرى. ويعود انخفاض الفعاليّة الأنزيمية إلى تغيُّر الخواص الأيونيّة للحموض الأمينية في كلٍ من الأنزيم والركازة ما يؤثِّر في مُعدَّل ارتباط الركازة بالمركز الفعَّال في الأنزيم. وتُشابه هذه النتائج ما أشار إليه Preetha وBoopathy (1997، 573)، و Khalil Moghaddam وزملاؤه (2008، 151)، وAmer وزملاؤه (2015، 1076f)، وFoda وزملاؤه (2012، 586)، وتختلف عمّا أشار إليه Da Silva وزملاؤه (2016، 1059).

أظهرت المُحضَّرات الأنزيمية بعد 48 hrs من التحضين عند درجات الـ pH المختلفة فعاليّة مماثلة للفعاليّة المُسجَّلة عند بدء التحضين في كل معاملة. عُدِّلت قيم الـ pH لأجزاء من هذه المُحضَّرات إلى pH 5 و pH 4 ، لقياس نشاط التخثُّر والنشاط لحال للبروتين عند هذه القيم على التَّوالي، وقد أظهرت فعالية مماثلة للمحاليل الأنزيمية المُحضَّرة آنيّاً عند هذه الدَّرجات. ما يشير إلى ثباتيّة الأنزيم اتجاه الـ pH ضمن المجال 7–3. نتائج مشابهة أشار إليها Iwasaki وزملاؤه (1967، 548f) حول ثباتيّة بروتياز *Rhizomucor pusillus* اتجاه الـ pH.

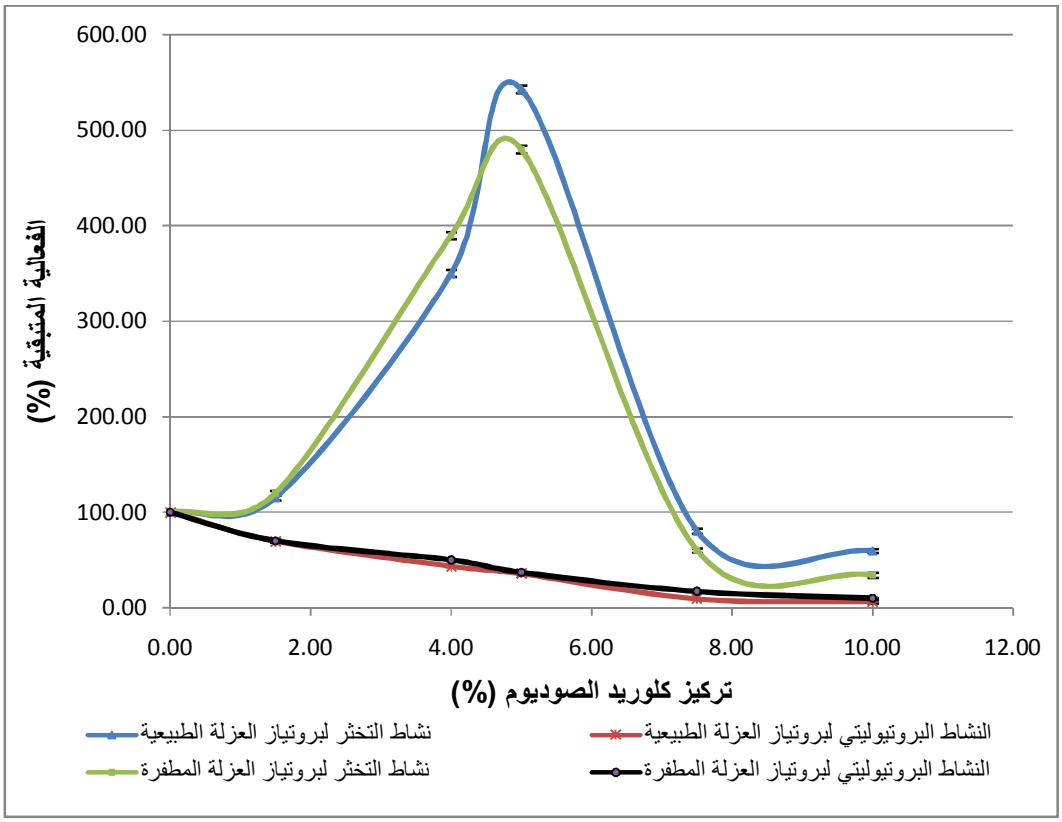


الشكل 17: تأثير الـ pH في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei*.

4–6–2–5– تأثير كلوريد الصوديوم في الفعاليّة الأنزيمية:

تباينَ تأثير كلوريد الصوديوم في كلٍ من نشاط تخثُّر الحليب والنشاط الحالّ للبروتين، إذ ازداد نشاط التخثُّر بازدياد تراكيز كلوريد الصوديوم ليصل أقصاه عند تركيز 5%، ثم انخفض تدريجياً ليصل إلى أدنى قيمة عند تركيز 10%، بينما انخفض النشاط الحالّ للبروتين بإضافة كلوريد الصوديوم بدءاً من نسبة الإضافة 1.5% وازدادت نسبة الانخفاض بازدياد تراكيز كلوريد الصوديوم وصولاً إلى أدنى قيمة عند تركيز 10% (الشكل 18). يختلف تأثير كلوريد الصوديوم في زمن تخثُّر الحليب تبعاً لتركيزه، إذ ينخفض زمن التخثُّر وبالتالي يزداد نشاط التخثُّر عند

التراكيز المنخفضة من كلوريد الصوديوم، بينما يزداد زمن التخثُّر بوجود التراكيز المرتفعة لكلوريد الصوديوم في الحليب (Ramet, 2001, 21). ويعود الأثر الإيجابيّ لكلوريد الصوديوم في تحفيز نشاط التخثُّر للبروتياز إلى دوره في التخفيض النِّسبيّ لكلٍ من pH الحليب والشحنة السَّلبية الكُليّة للميسيل، بالإضافة إلى زيادة مستويات الكالسيوم الأيونية في الحليب (Huppertz and Fox, 2006, 1145; Abdel-Raouf *et al*., 2017., 2209). وقد يعود تثبيط نشاط التخثُّر عند المستويات الأعلى من كلوريد الصوديوم إلى تثبيط هذه التراكيز لتشكيل مُعقَّد البروتياز–كازئين عند المركز الفعّال عن طريق تثبيط التفاعلات الكهروستاتيكية المُتضمَّنة في هذا التفاعل (Abdel-Raouf *et al*., 2017., 2209). أمّا التأثير الانتقائي لكلوريد الصوديوم في قدرة البروتياز على حلمهة الكازئينات المختلفة، فيعود إلى اختلاف تأثيره في لّفّ أو طَّيّ هذه الركائز (Fox and Walley, 1971, 167f). إذ يشير الانخفاض في النشاط الحالّ للبروتين والازدياد المرافق في نشاط التخثُّر عند التراكيز 5%–1.5% إلى عدم تأثير كلوريد الصوديوم في بنية البروتياز أو كازئين كابا، وتأثيره المُحتمَل في كازئينات الميسيل الأخرى (β, αs)، إذ تُشكِّل الأخيرة الركائز الرئيسة المُعرَّضة للنشاط البروتيوليتي (Fox and Walley, 1971, 165-170). وقد تختلف عتبة حدوث تأثير كلوريد الصوديوم في هيكليّة البروتينات المختلفة تبعاً لأنواعها. وتختلف هذه النتائج عمّا توصَّل إليه Preetha وBoopathy (1997، 575) حول ظهور تأثير مُثبِّط لكلوريد الصوديوم لنشاط التخثُّر، وتأثير مُحفِّز للنشاط الحالّ للبروتين. كما تختلف عتبة ظهور الأثر المُثبِّط لكلوريد الصوديوم في نشاط التخثُّر عن العتبة "3%>" الَّتي أشار إليها Foda وزملاؤه (2012، 587).

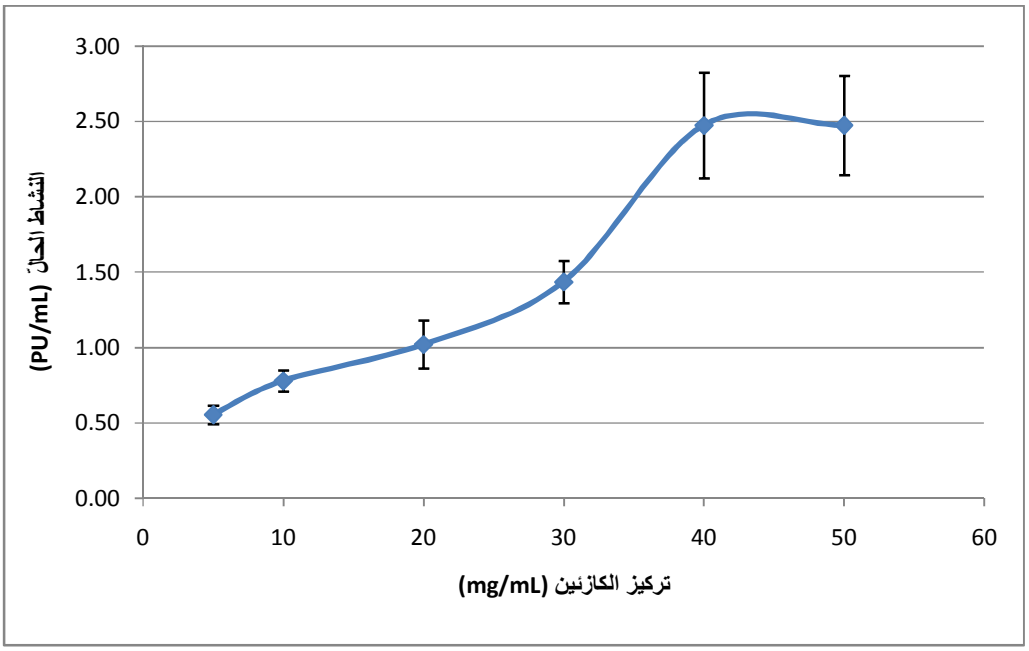


الشكل 18: تأثير كلوريد الصوديوم في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei*.

4-6-2-6- تأثير تركيز الركازة في فعالية البروتياز، وتحديد بعض العوامل الحركيَّة:

4-6-2-6-1- تأثير تركيز الكازئين:

يُبَيِّن الشكل 19 تأثير تركيز الركازة (الكازئين) في الفعاليّة الأنزيمية للبروتياز المُنتَج من العزلة *Rhizomucor miehei* Rm4، حيث ازداد النشاط الحالّ للبروتين بازدياد تركيز الكازئين في وسط التفاعل، وسُجِّلت أعلى فعالية للأنزيم عند استخدام تركيز 4%، ولم يظهر ازدياد ملحوظ في الفعاليّة عند التركيز الأعلى من الركازة، ويعود ذلك إلى إشباع المواقع الفعّالة للأنزيم بالركائز.

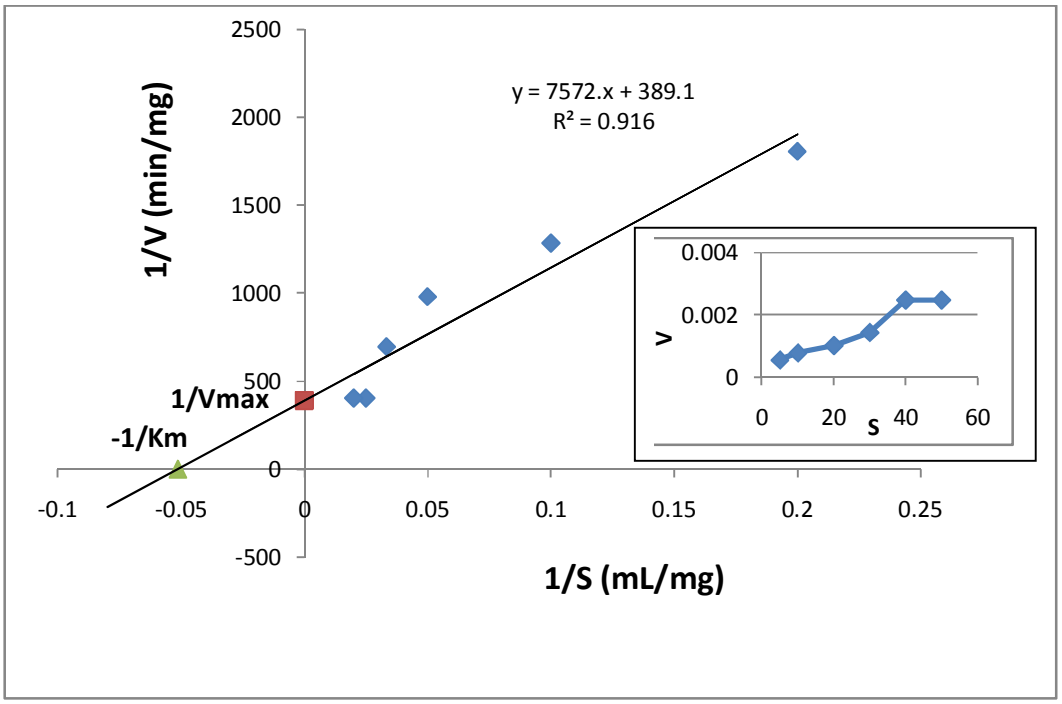


الشكل 19: تأثير تركيز الركازة (الكازئين) في فعالية بروتياز Rm4 *Rhizomucor miehei*.

استُخدِمَت طريقة لاينوفر–بيرك لتقدير الثوابت الحركيَّة للأنزيم، إذ حُدِّدَت العلاقة بين مقلوب تركيز الركازة (1/S) ومقلوب سرعة التفاعل (1/V) كالآتي:

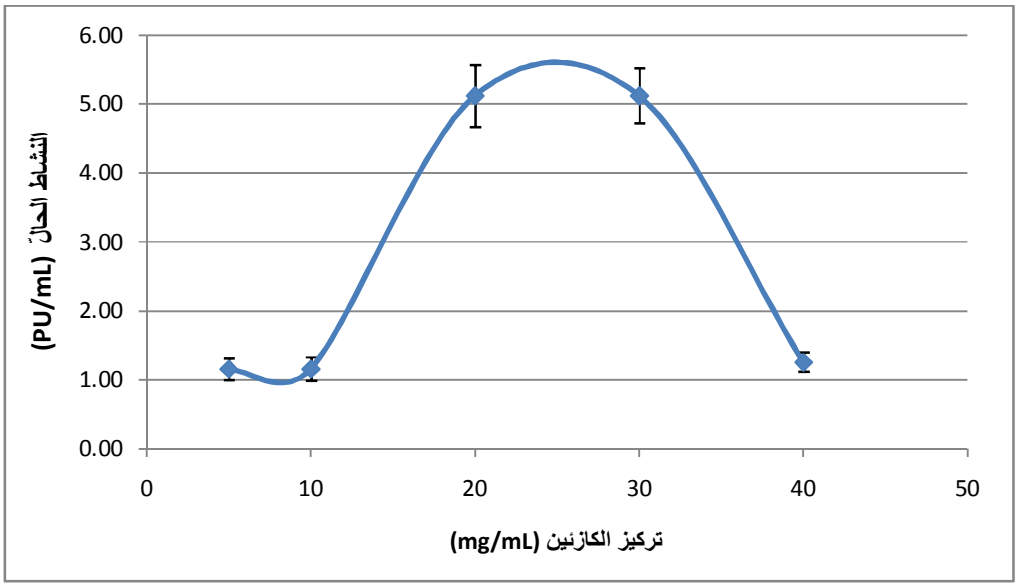
$$1/V_o = (K_m/V_{max})\ (1/[S]) + 1/V_{max}$$

و V_0، و V_{max} هي سرعة التفاعل الابتدائية، والسرعة القصوى على التَّوالي، مُقدَّرة بناءً على كمِّيّة المُنتَج (التيروزين) المُتشكِّلة في الدَّقيقة الواحدة. S هو تركيز الركازة في وسط التفاعل. K_m هو ثابت ميكاليس (الشكل 20). واعتماداً على العلاقة الناتجة، وُجِدَ أنَّ قيمة السرعة القصوى وثابت ميكاليس، كانت مساوية لـ 0.0026 mg/min، و 19.46 mg/mL على التَّوالي.



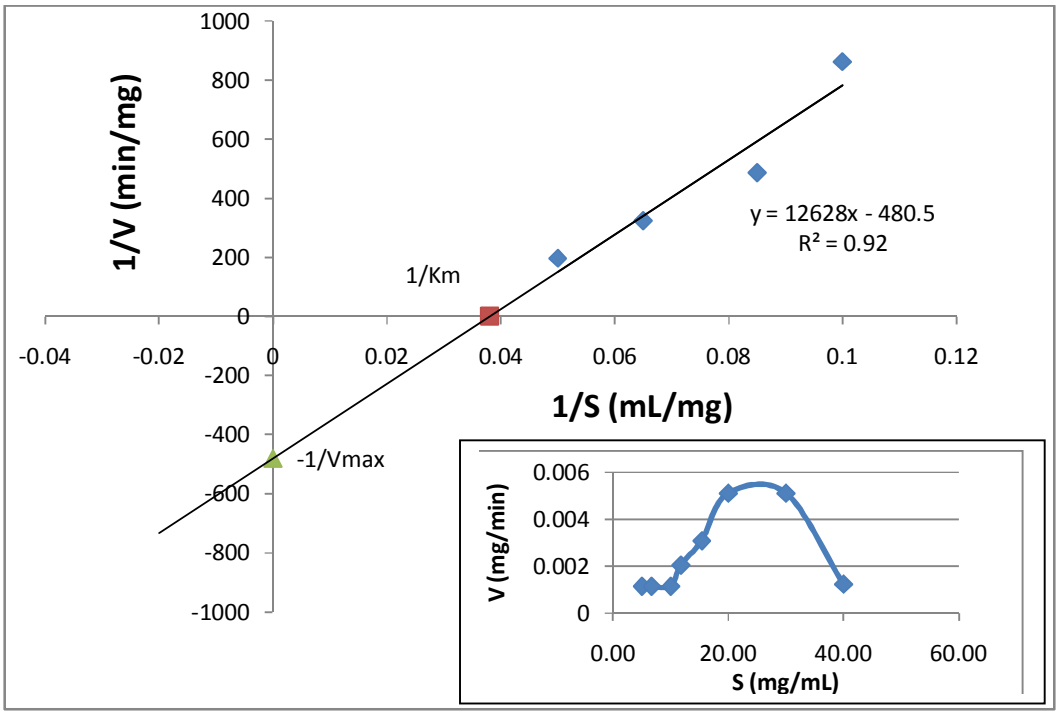
الشكل 20: تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (الكازئين)، وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* Rm4، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر–بيرك، إذ تُمَثِّل V_0 سرعة التفاعل الابتدائية، V_{max} سرعة التفاعل القصوى (mg/min)، S: تركيز الركازة (mg/mL)، K_m: ثابت ميكاليس (mg/mL).

يُبَيِّن الشكل 21 تأثير تركيز الركازة (الكازئين) في الفعاليّة الأنزيمية للبروتياز المُنتَج من العزلة *Rhizomucor miehei* MW150، إذ ازداد النشاط الحالّ للبروتين بازدياد تركيز الكازئين في وسط التفاعل، وسُجِّلت أعلى فعالية للأنزيم عند التراكيز 2% و3%، بينما انخفضت الفعاليّة بشكل ملحوظ عند التركيز الأعلى من الركازة (4%)، ويعود ذلك إلى ما يُعرف بالتَّثبيط بفعل الركازة، وهو ما يخالف حركيَّة ميكاليس–مينتن. وقد فَسَّر Haldane (1965، 84) هذه الظاهرة بامتلاك الأنزيم لموقعين للارتباط بالركازة، يُظهر الموقع الأوَّل أثراً تحفيزياً للتفاعل، بينما يؤدِّي الارتباط بموقع التَّنظيم التفارغي (الموقع الثاني) للأنزيم المرتبط أو غير المرتبط بركازة أخرى إلى الانخفاض أو التَّثبيط الكامل لمُعدَّل التفاعل. وقد يُعزى "التَّثبيط بفعل الركازة" إلى تفاعل جزيئات الركازة الفائضة مع مركبات الأنزيم (عدا مُعقَّد أنزيم–ركازة)، كالتفاعل مع مُعقَّد "مركب وسيط–أنزيم"، أو مُعقَّد "أنزيم–مُنتَج" لتُشَكِّل مُعقَّدات "ركازة–أنزيم–مركب وسيط"، و"ركازة–أنزيم–مُنتَج" على التَّوالي (Kokkonen, 2021, 646).



الشكل 21: تأثير تركيز الركازة (الكازئين) في فعالية بروتياز MW150 *Rhizomucor miehei*.

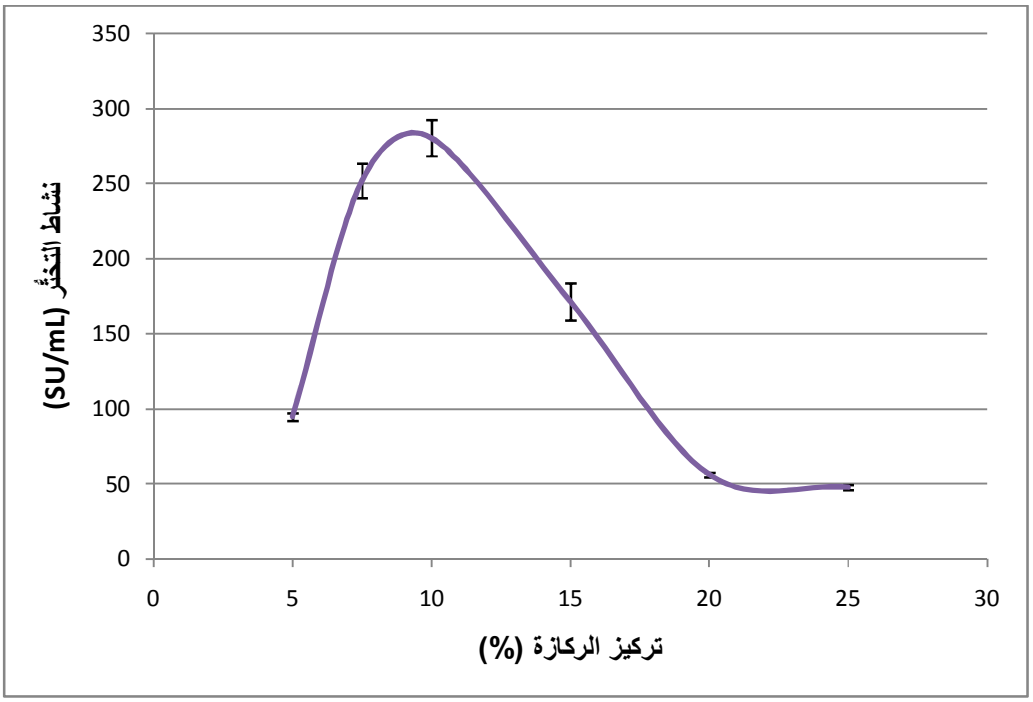
يُبيِّن الشكل 22 ظهور الوظيفة التحفيزية للركازة في سرعة التفاعل الأنزيمي عند التراكيز المنخفضة للركازة، بينما تسود الوظيفة التَّثبيطية للركازة عند التراكيز الأعلى. ويمكن استقراء قيم السرعة القصوى وثابت ميكاليس بتطبيق علاقة لاينوفر–بيرك اتجاه الجزء الخاصّ بالتراكيز المنخفضة للركازة (Bisswanger, 2011,37f)، إذ قُدِّرت قيم K_m، وV_{max} بـ 26.29 mg/mL، و0.0021 mg/min على التَّوالي. وتزيد قيم ثابت ميكاليس لبروتياز العزلات Rm4 وMW150 اتجاه الكازئين عن تلك الَّتي أشار إليها Fernández-Lahore وزملاؤه (1999، 604) "3.71 mg/mL" في بروتياز *Mucor* sp.، الَّتي أشار إليها Wang وزملاؤه (2021، 8) "3.16 mg/mL" لبروتياز *Rhizomucor miehei* المؤشَّب في *Aspergillus niger*. وتشير هذه القيم المرتفعة لثابت ميكاليس (اعتماداً على قياس الفعاليّة التحللية) إلى ألفة أقل لبروتياز *Rhizomucor miehei* اتجاه كازئينات αs وβ كازئين، وبالتالي تحقيق نشاط منخفض لتحلُّل البروتين.



الشكل 22: تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (الكازئين)، وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* MW150، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر–بيرك، إذ تُمَثِّل V_0 سرعة التفاعل الابتدائية، V_{max} سرعة التفاعل القصوى (mg/min)، S: تركيز الركازة (mg/mL)، K_m: ثابت ميكاليس (mg/mL).

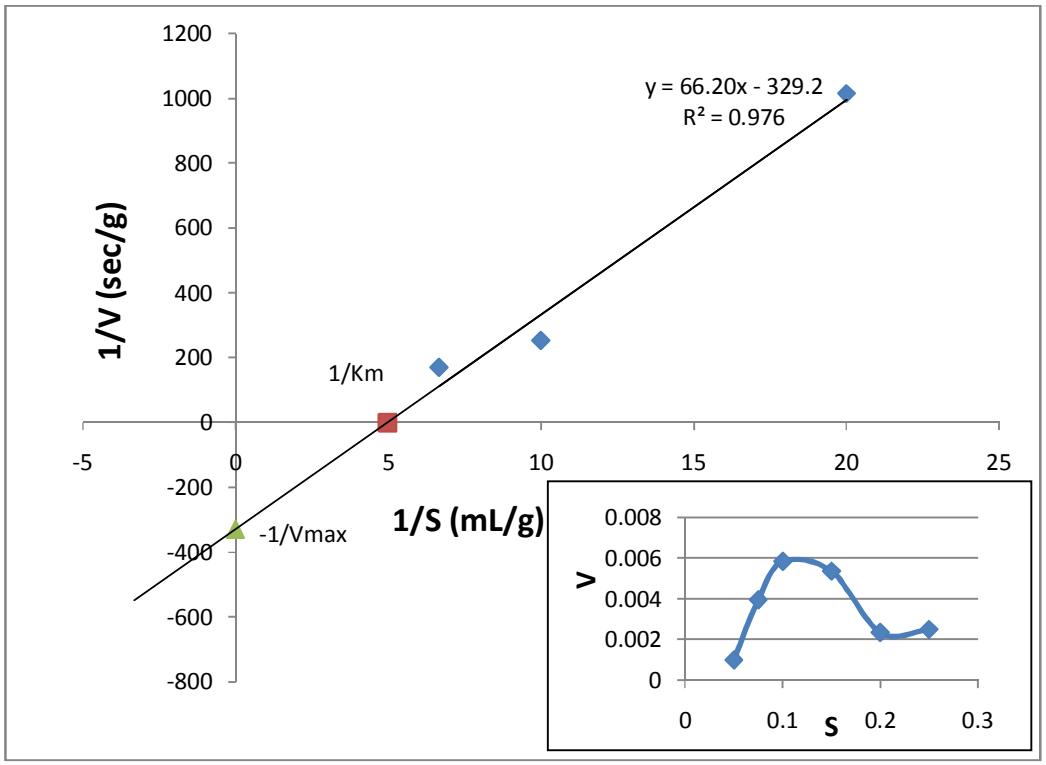
4-6-2-6-2- تأثير تركيز حليب الفرز:

يُبَيِّن الشكل 23 تأثير تركيز حليب الفرز في نشاط تخثُّر الحليب للبروتياز المُنتَج من العزلة *Rhizomucor miehei* Rm4، حيث سُجِّلَ نشاط تخثُّر منخفض عند تركيز 5%. وقد يعود ذلك إلى تشتُّت جزيئات الكازئين في محلول الحليب إثرَ تمديده وإعاقة تشكيل الخثرة، كما قد يُقيِّد انخفاض تركيز الركازة من إظهار كامل الكفاءة الأنزيمية (Ahmed and Helmy, 2012, 73). ازداد نشاط التخثُّر بازدياد تركيز مسحوق الحليب في وسط التفاعل، فقد سُجِّلت أعلى فعالية للأنزيم عند التركيز 10%، بينما انخفضت الفعاليّة بشكل ملحوظ عند التراكيز الأعلى من الركازة، ويعود ذلك إلى التَّثبيط بفعل الركازة، كما قد يعود ذلك إلى ازدياد لزوجة الوسط ما قد يُخفِّض من حركة الأنزيم في وسط التفاعل. توافق هذه النتائج ما توصَّل إليه Amer وزملاؤه (2015، 1077)، وFoda وزملاؤه (2012، 587f).



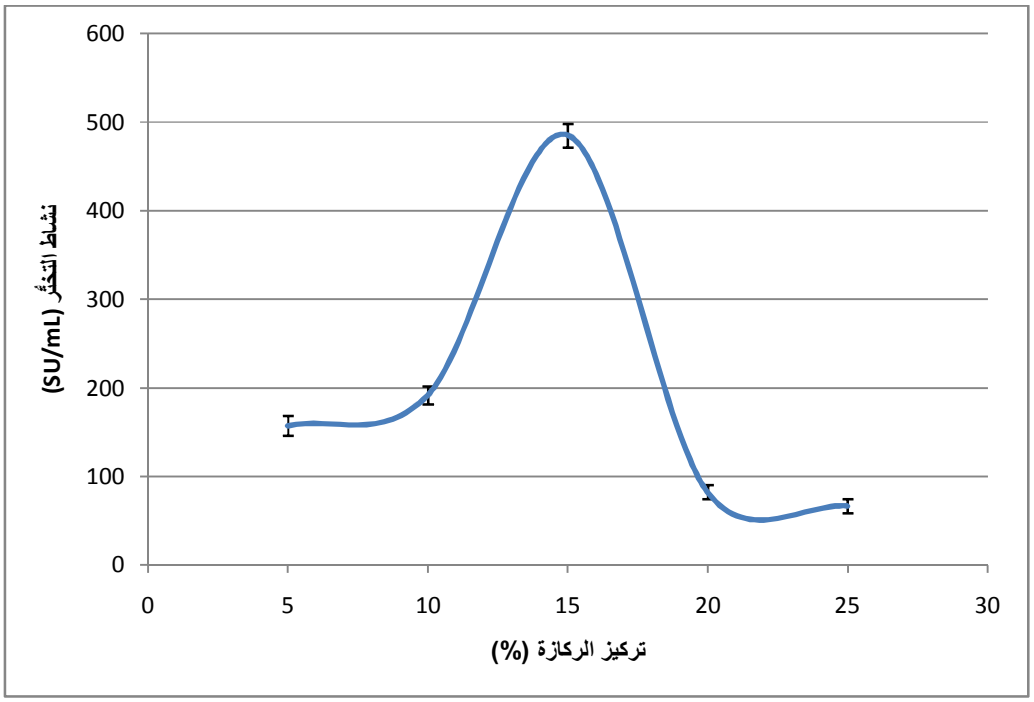
الشكل 23: تأثير تركيز الركازة (حليب الفرز) في فعالية بروتياز Rm4 *Rhizomucor miehei*.

قُدِّرَت سرعة التفاعل بناءً على كمِّيّة الركازة المتفاعلة في كل ثانية (كمِّيّة مسحوق الحليب في وسط التفاعل/ زمن التخثُّر)، ومُثِّلَت العلاقة بين تركيز الركازة وسرعة التفاعل (الشكل 24). قُدِّرت قيم السرعة القصوى وثابت ميكاليس بتطبيق علاقة لاينوفر–بيرك اتجاه الجزء الخاصّ بالتراكيز المنخفضة للركازة (Bisswanger, 2011,37f)، إذ قُدِّرت قيم K_m، وV_{max} بـ 0.201 g/mL، و0.0030 g/sec على التَّوالي.

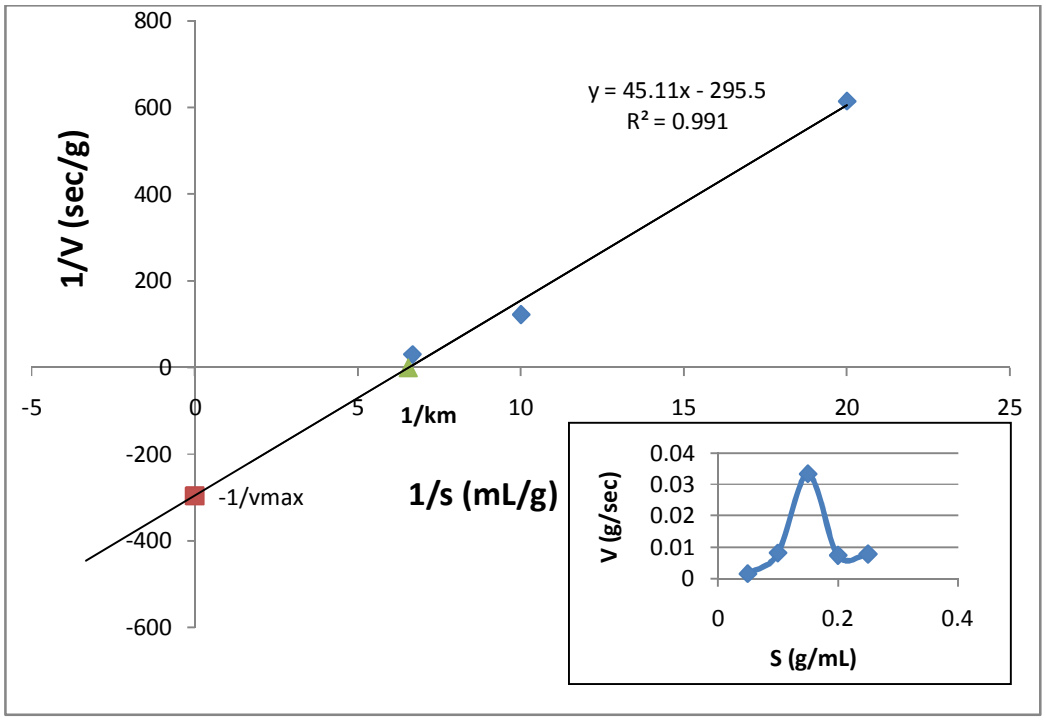


الشكل 24: تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (حليب الفرز)، وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* MW150، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر–بيرك، إذ تُمَثِّل V_0 سرعة التفاعل الابتدائية، V_{max} سرعة التفاعل القصوى (g/sec)، S: تركيز الركازة (g/mL)، K_m: ثابت ميكاليس (g/mL).

يُبَيِّن الشكل 25 تأثير تركيز حليب الفرز في نشاط تخثُّر الحليب للبروتياز المُنتَج من العزلة *Rhizomucor miehei* MW150، إذ ازداد النشاط بازدياد تركيز مسحوق الحليب في وسط التفاعل، وسُجِّلت أعلى فعالية للأنزيم عند التركيز 15%، بينما انخفضت الفعاليّة بشكل ملحوظ عند التراكيز الأعلى من الركازة. وبتطبيق علاقة لاينوفر–بيرك اتجاه الجزء الخاصّ بالتراكيز المنخفضة للركازة، وُجِدَ أنَّ قيم ثابت ميكاليس، والسرعة القصوى مساوية لـ 0.152 g/mL، و0.0034 g/sec على التَّوالي (الشكل 26). وتُشير هذه النتائج إلى الألفة العالية لبروتياز *Rhizomucor miehei* اتجاه كازئين كابا، ما يُفَسِّر ميل الأنزيم لإظهار نشاط التخثُّر بما يفوق نشاطه الحالّ للبروتين. نتائج مشابهة أشار إليها Da Silva وزملاؤه (2016، 1068).



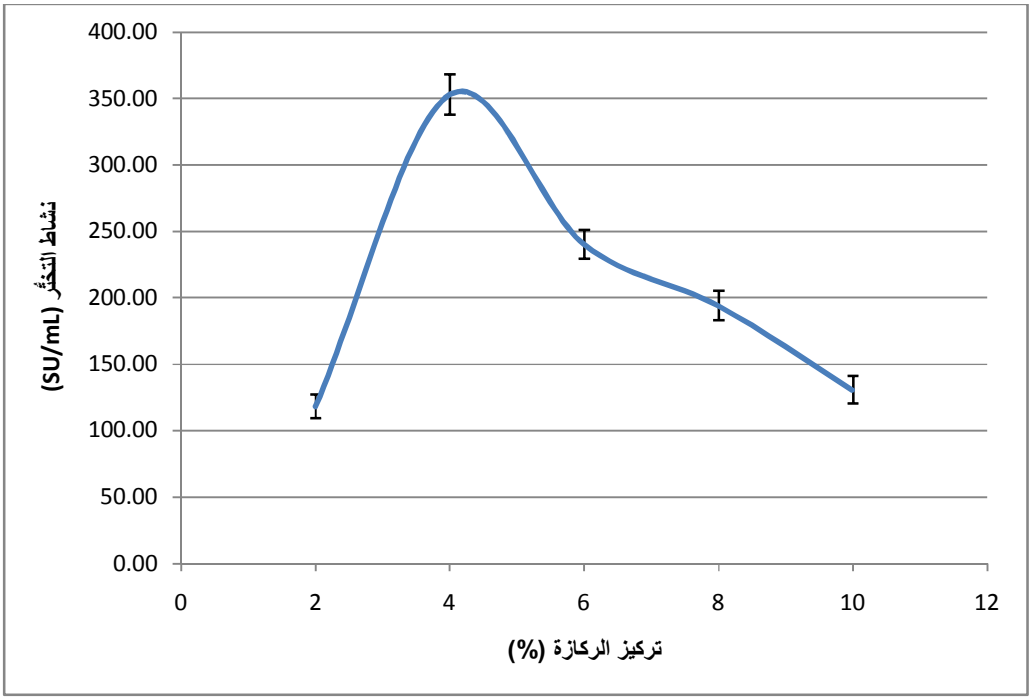
الشكل 25: تأثير تركيز الركازة (حليب الفرز) في فعالية بروتياز MW150 *Rhizomucor miehei*.



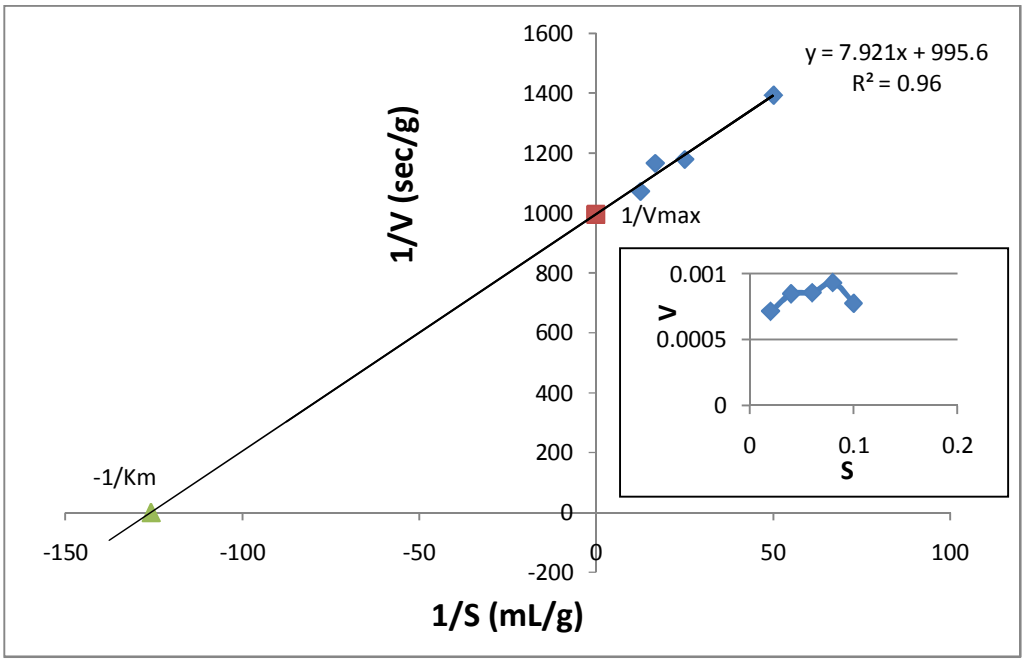
الشكل 26: تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (حليب الفرز)، وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* MW150، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر–بيرك، إذ تُمَثِّل V_0 سرعة التفاعل الابتدائية، V_{max} سرعة التفاعل القصوى (g/sec)، S: تركيز الركازة (g/mL)، K_m: ثابت ميكاليس (g/mL).

4-6-2-6-3- تأثير تركيز الحليب كامل الدَّسم:

يُبَيِّن الشكل 27 تأثير تركيز الحليب كامل الدَّسم في نشاط تخثُّر الحليب للبروتياز المُنتَج من العزلة *Rhizomucor miehei* Rm4، إذ ازداد النشاط بازدياد تركيز مسحوق الحليب في وسط التفاعل، وسُجِّلت أعلى فعالية للأنزيم عند التركيز 4%، وانخفضت الفعاليّة بشكل ملحوظ عند التراكيز الأعلى من الركازة. بينما بلغت سرعة التفاعل أعلى قيمة عند التركيز 8%. وبتطبيق علاقة لاينوفر-بيرك، وُجِدَ أنَّ قيم ثابت ميكاليس، والسرعة القصوى مساوية لـ 0.0080 g/mL، و0.001 g/sec على التَّوالي (الشكل 28).

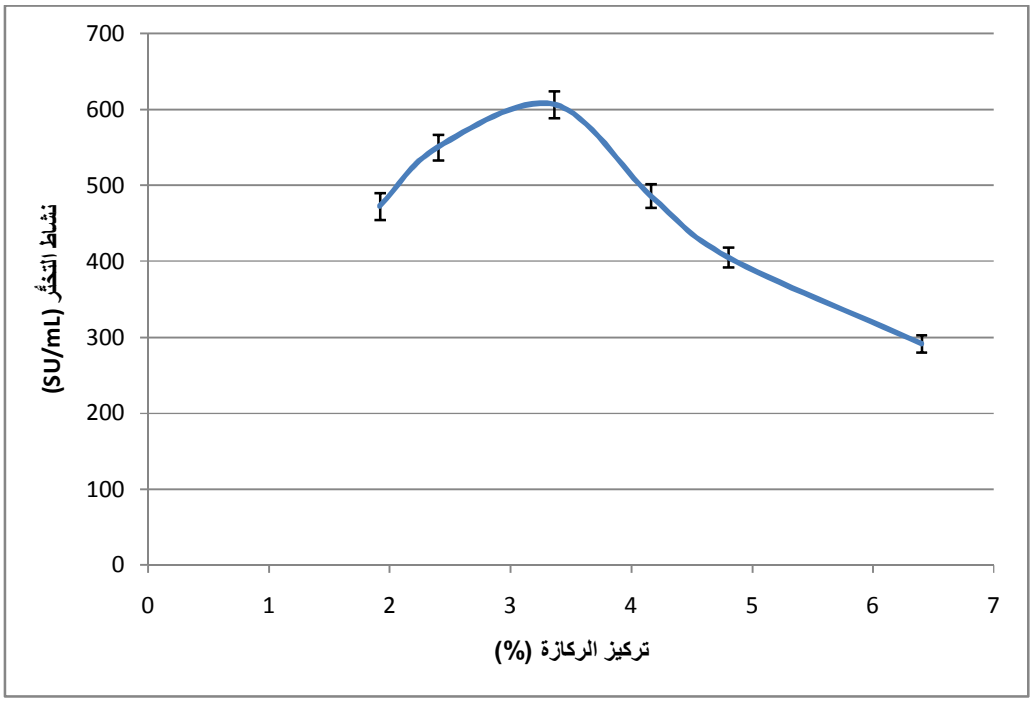


الشكل 27: تأثير تركيز الركازة (الحليب كامل الدَّسم) في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei* Rm4.

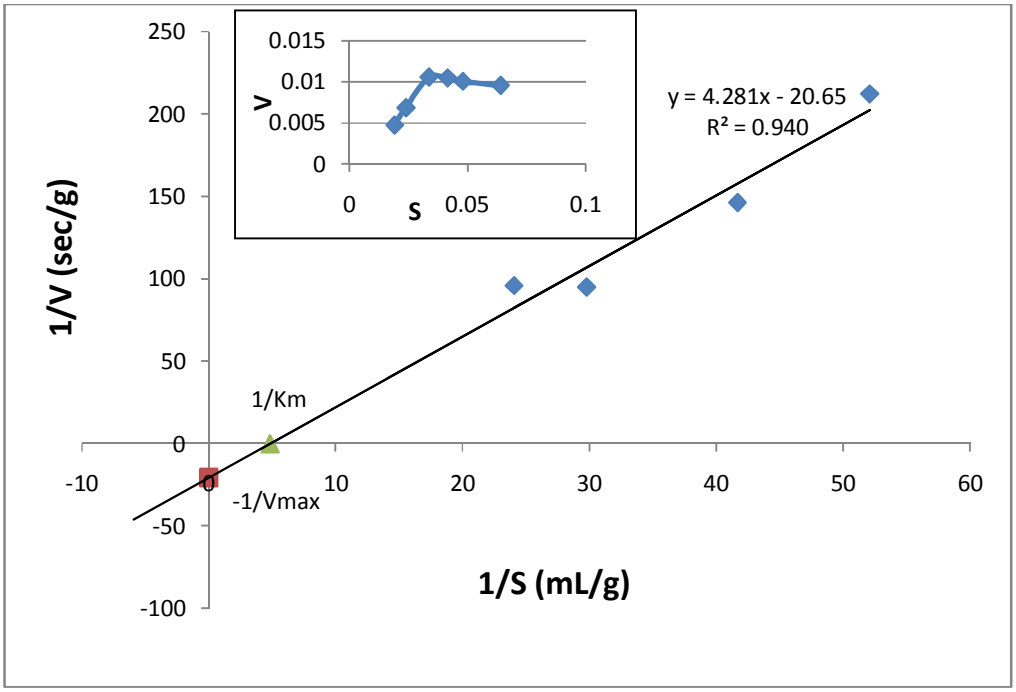


الشكل 28: تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (الحليب كامل الدَّسم)، وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* Rm4، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر–بيرك، إذ تُمَثِّل V_0 سرعة التفاعل الابتدائية، V_{max} سرعة التفاعل القصوى (g/sec)، S: تركيز الركازة (g/mL)، K_m: ثابت ميكاليس (g/mL).

يُبَيِّن الشكل 29 تأثير تركيز الحليب كامل الدَّسم في نشاط تخثُّر الحليب للبروتياز المُنتَج من العزلة *Rhizomucor miehei* MW150، إذ ازداد النشاط بازدياد تركيز مسحوق الحليب في وسط التفاعل، وسُجِّلت أعلى فعالية للأنزيم عند التركيز 3.36%، وانخفضت الفعاليّة بشكل ملحوظ عند التراكيز الأعلى من الركازة، بينما بلغت سرعة التفاعل أعلى قيمة عند التركيز 8%. هذا وقد سُجِّلت فعالية تخثُّرية للبروتياز في كلٍ من العزلتين اتجاه الحليب كامل الدَّسم أعلى منها في حالة الحليب الفرز عند التركيز الأمثل لكل ركازة. وقد يعود ذلك إلى تحفيز الدهون للتفاعلات الكارهة للماء مابين البروتياز والركازة (الكازئين)، ما يزيد من إمكانيّة الوصول ما بين المركز الفعّال للأنزيم والروابط الببتيدية (Zhang *et al.*, 2020, 6). وقد أشار Duranti وزملاؤه (2003، 93) إلى نتائج مشابهة حول انخفاض زمن التخثُّر في الحليب كامل الدَّسم. وبتطبيق علاقة لاينوفر–بيرك، وُجِدَ أنَّ قيم ثابت ميكاليس، والسرعة القصوى مساوية لـ 0.207 g/mL، و0.048 g/sec على التَّوالي (الشكل 30).



الشكل 29: تأثير تركيز الركازة (الحليب كامل الدَّسم) في فعالية بروتياز *Rhizomucor miehei* MW150.



الشكل 30: تمثيل العلاقة بين تركيز الركازة (الحليب كامل الدَّسم)، وسرعة التفاعل الأنزيمي لبروتياز *Rhizomucor miehei* MW150، بطريقتي ميكاليس–مينتن، ولاينوفر–بيرك، إذ تُمَثِّل V_0 سرعة التفاعل الابتدائية، V_{max} سرعة التفاعل القصوى (g/sec)، S: تركيز الركازة (g/mL)، K_m: ثابت ميكاليس (g/mL).

4-7- التطبيق العملي للأنزيم والمقارنة بالمنفحة التِّجاريَّة:

قيست المؤشِّرات الخاصّة بالمنفحة التِّجاريَّة Chr. Hansen BioRen® 97T100، وقورنت بالمؤشِّرات الأنزيمية للبروتياز المُنقَّى المُنتَج من كلٍ من العزلتين Rm4 وMW150. ويُبيِّن الجدول 37 التَفوّق المعنوي للمُحضَّرات الناتجة وفق جميع المؤشِّرات، بالمقارنة مع المُحضَّر التجاري للمنفحة. إذ تَميَّزت المُحضَّرات بنشاط تخثُّر نوعيّ مرتفع، ونشاط نوعيّ حال للبروتين منخفض نسبيّاً، ونسبة مرتفعة لنشاط التخثُّر\النشاط الحالّ للبروتين، وهو الأمر المُفضَّل في صناعة الأجبان.

الجدول 37: المؤشِّرات الأنزيمية للمنفحة التِّجاريَّة ومُحضَّرات بروتياز *R. miehei*.

المُحضَّر الأنزيمي	نشاط التخثُّر النَّوعيّ (SU/mg)	النشاط البروتيوليتي النَّوعيّ (PU/mg)	نشاط التخثُّر/ النشاط البروتيوليتي
المنفحة التجارية	1576.01±78.82[a]	26.88±1.34[a]	58.63±2.93[a]
مُحضَّر بروتياز *R.miehei* Rm4 المُنقّى جزئياً	3756.18±162.93[b]	10.36±0.78[b]	362.57±18.85[b]
مُحضَّر بروتياز *R.miehei* MW150 المُنقّى جزئياً	4618.85±254.60[b]	10.65±0.81[b]	433.69±23.0[b]

* القيم في العمود الواحد الَّتي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.01.

استُخدِمَ بروتياز العزلة Rm4 المُنقَّى لصناعة الجبن الأبيض وفقاً للطريقة التقليدية، ويُبَيِّن الجدول 38 نتائج التجارب الأوَّليّة لتحديد نسبة إضافة المُخثِّر الفطري إلى الحليب لصناعة الجبن الأبيض. إذ أعطت الإضافة 6000 SU/L أعلى مردود للخثرة، بينما انخفض مردود الخثرة بشكل ملحوظ عند النسب الأخرى. كما تأثَّر القوام والشكل الخارجي للجبن المُنتَج بنسبة الإضافة، إذ أعطت النسبة المنخفضة (3000 SU/L) خثرة غير متماسكة ذات قوام مُتفتِّت، بينما كانت الخثرة الناتجة عن نسبة الإضافة المرتفعة (7000 SU/L) ذات قوام قاسي شديد الصلابة. وأظهر الجبن المُنتَج باستخدام النسب المنخفضة (3000 SU/L، و4000 SU/L)

احتجازاً أقل للدسم، وانخفاضاً في درجة ظهور النكهة. وتترافق النسبة المرتفعة لإضافة البروتياز بنسبة أعلى لتحلل الكازئين خلال المرحلة الأنزيمية للتخثُّر، أو قبل البدء بتجميع الكازئينات وتشكيل الخثرة، ما يؤدِّي إلى تحقيق تنافر أقل للكازئينات وتشكيل خثرة أكثر تماسكاً وبمردود أعلى (Wium *et al.*, 2003, 294). وتميل الخثرة ذات الشبكة ضعيفة التطوّر إلى فقد الدهن وعدم القدرة على احتجازه (Green and Grandison, 1993, 132). أبدت الخثرة الناتجة عن الإضافة 6000 SU/L القوام المُتجَبِّن (Curdy)، والنكهة المميّزة لهذا النوع من الجبن، بالإضافة إلى مظهر وقوام مُوَحَّد في كامل المقطع. وبناءً على ذلك فقد تمَّ اختيار هذه النسبة لإنتاج الجبن في المرحلة اللّاحقة.

الجدول 38: تأثير نسب إضافة بروتياز *R. miehei* Rm4 في مردود الجبن المُصنَّع وخواصّه.

نسبة الإضافة (SU/L)	المردود (%)	الرائحة (6 درجات)	النكهة (60 درجة)	القوام والملمس (14 درجة)	المظهر الخارجي (20 درجة)	القبول العام (100 درجة)
3000	5.28 ± 1.20^{a}	2.00 ± 0.00^{a}	48.00 ± 0.68^{a}	9.00 ± 0.87^{a}	12.00 ± 0.39^{a}	71.00 ± 1.95^{a}
4000	5.44 ± 1.01^{a}	2.00 ± 0.55^{a}	48.07 ± 0.62^{a}	9.00 ± 0.55^{a}	12.04 ± 0.69^{a}	71.11 ± 2.42^{a}
5000	7.11 ± 1.08^{a}	5.00 ± 0.55^{b}	55.00 ± 1.88^{b}	10.00 ± 0.68^{a}	14.00 ± 0.70^{ab}	84.00 ± 3.82^{bc}
6000	11.66 ± 0.71^{b}	5.50 ± 0.44^{b}	55.00 ± 1.49^{b}	13.00 ± 0.78^{b}	18.00 ± 0.96^{c}	91.50 ± 3.68^{c}
7000	11.01 ± 0.48^{b}	5.00 ± 0.39^{b}	48.00 ± 0.55^{a}	9.07 ± 0.83^{a}	16.00 ± 0.39^{b}	78.07 ± 2.17^{ab}

* القيم في العمود الواحد الَّتي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.05.

يُبَيِّن الجدول 39 تقارُب مردود الجبن المُصنَّع باستخدام كلٍ من المنفحة التِّجاريَّة والبروتياز من *R.miehei* Rm4 إذ لم يظهر اختلاف معنوي في المردود باستخدام كلٍ من المُخثِّرين. وقد أشار Jacob وزملاؤه (2010، 375) إلى نتائج مشابهة حول عدم اختلاف مردود الجبن المُصنَّع باستخدام كلٍ من المنفحة وبروتياز *R.miehei*. وكانت الخواصّ الحسِّيَّة للجبن المُصنَّع باستخدام كلٍ من المُخثِّرين متقاربة، ولم يظهر اختلاف معنوي عند تقييم جميع الخواصّ. وقد أشار Amer وزملاؤه (2015، 1079) إلى نتائج مشابهة حول تماثل الخواصّ الحسِّيَّة للجبن الأبيض المُصنَّع باستخدام كلٍ من المنفحة وبروتياز *R.miehei*.

الجدول 39: مقارنة المردود والخواصّ الحسّيَّة للجبن المُصنَّع باستخدام كلٍ من المنفحة التِّجاريَّة وبروتياز *R.miehei* Rm4.

نوع المُخثِّر	المردود (%)	الرائحة (6 درجات)	النكهة (60 درجة)	القوام والملمس (14 درجة)	المظهر الخارجي (20 درجة)	القبول العام (100 درجة)
منفحة تجارية	11.96±1.19[a]	5.38±1.16[a]	54.01±4.07[a]	12.30±1.79[a]	18.63±1.92[a]	90.31±8.18[a]
بروتياز *R.miehei* Rm4	11.65±0.66[a]	5.38±1.16[a]	54.38±2.07[a]	13.02±0.88[a]	17.69±1.93[a]	90.21±5.26[a]

* القيم في العمود الواحد الَّتي تحمل حرف مُشابِه على الأقل، لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية 0.05.

5-الاستنتاجات والمقترحات والتوصيات:

5-1- الاستنتاجات Conclusions:

1- القدرة العالية لفطر *Rhizomucor miehei* على إنتاج البروتياز، وتميُّز الأنزيم المُنتَج بنشاط تخثُّر نوعيّ مرتفع، وقيمة مرتفعة لنشاط تخثُّر الحليب نسبةً للنشاط الحالّ للبروتين، وهو الأمر المُفضَّل في صناعة الأجبان.

2- نجاعة استخدام منهجية الاستجابة السَّطحيَّة في أمثلة ظروف التخمير، والتنبّؤ بقيم المتغيِّرات.

3- تَفوُّق البروتياز المُنتَج بالتخمير بالحالة الصّلبة على الأنزيم المُنتَج بالتخمير بالحالة السائلة، من حيث المردود والفعاليّة الأنزيمية.

4- وجود تأثيرات غير حرارية للأمواج الميكرويّة في إحداث طفرات فوق المستوى التلقائيّ لحدوث الطفرة. وقد أمكن باستخدام الأمواج الميكرويّة الحصول على طفرة مستقرَّة مُنتِجة للبروتياز بفعاليّة أنزيمية فائقة، وبخواصّ حركيَّة مقاربة للأنزيم المُنتَج من العزلة الطبيعيَّة.

5- ازدياد مُعدَّل ظهور الطفرات ذات الأثر السَّلبيّ في إنتاج البروتياز باستخدام إيثيل سلفونات الميثان.

6- عدم ارتباط مُعدَّل ظهور الطفرات بجرعة المُطَفِّر في جميع معاملات التَّطفير المستخدمة.

7- ازدياد الفعاليّة النَّوعيّة للبروتياز خلال مراحل التنقية، وظهور حزمة بروتينية متجانسة خلال مرحلة الفصل الكهربائي، ما يعكس نجاعة عملية التنقية المستخدمة.

8- تقارُب الوزن الجزيئيّ للبروتياز المُنتَج من العزلتين الطبيعيّة والمُطفَّرة بالأمواج الميكرويّة، إذ قُدِّر باستخدام الرحلان الكهربائي بحوالي 39.77 kDa ، و40.62 kDa على التَّوالي.

9- الثَّبات الحراري المرتفع للبروتياز، ما يمكن استخدامه في الصِّناعات ذات المعاملات الحراريَّة المرتفعة.

10- اختلاف درجات الـ pH المثلى لكلٍ من نشاط تخثُّر الحليب (pH 5)، والنشاط الحالّ للبروتين (pH 4) لبروتياز فطر *Rhizomucor miehei*. واستقرار بنية الأنزيم اتجاه التغيُّر المؤقَّت في قيم الـ pH ضمن المجال [7-3]، وإمكانية استعادة الأنزيم لنشاطه عند استعادة القيم المثالية.

11- الأثر الإيجابيّ لكلوريد الكالسيوم في تحفيز نشاط التخثُّر للبروتياز، إذ بلغ مقدار الزيادة في النشاط 323.48% و326.16% في كلٍ من الأنزيم الطبيعي والمُطفَّر.

12- الأثر الانتقائي لكلوريد الصوديوم في الفعاليّة الأنزيمية للبروتياز، ما يمكن استغلاله في تثبيط النشاط الحالّ للبروتين خلال المراحل المختلفة من تصنيع الجبن، وتحفيز نشاط التخثُّر في بعض صناعات الأجبان المتطلِّبة لإضافة كلوريد الصوديوم إلى الحليب.

13- ازدياد الفعاليّة الأنزيمية بازدياد تراكيز الركائز المختلفة (الكازئين، وحليب الفرز، وحليب كامل الدَّسم مُعاد التَّكوين)، وظهور التَّثبيط بفعل الركازة عند التراكيز المرتفعة بما يخالف حركيَّة ميكاليس-مينتن.

14- الألفة العالية لبروتياز *Rhizomucor miehei* اتجاه كازئين كابا، والألفة الأقل اتجاه الكازئينات الأخرى.

15- تماثُل الجبن الأبيض المُصنَّع باستخدام بروتياز *Rhizomucor miehei* مع الجبن المُصنَّع باستخدام المنفحة التِّجاريَّة، من حيث المردود، والخواص الحسِّيَّة، ما يظهر جدوى استخدام بروتياز *Rhizomucor miehei* كبديل مناسب للمنفحة التقليدية.

5-2- المقترحات والتوصيات Suggestions and Recommendations:

1- تطبيق الظروف المثلى لإنتاج البروتياز على النطاق المعملي والمقارنة بالنتائج المخبرية.

2- الدراسة الجزيئيّة للطفرات المُحدَثة، وتحديد الأساس الوراثي للطفرات الناتجة.

3- دراسة إمكانيّة تأشيب الجين الخاصّ ببروتياز *Rhizomucor miehei* في أنواع ميكروبية أخرى.

4- دراسة تأثير التطفير بأشعة الليزر في إنتاج الفطر *Rhizomucor miehei* للبروتياز.

5- دراسة الخواصّ الكيميائية للجبن المُصنَّع باستخدام بروتياز *Rhizomucor miehei* والمقارنة بخواصّ الجبن المُصنَّع باستخدام المنفحة التقليدية.

6- دراسة إمكانيّة استخدام بروتياز *Rhizomucor miehei* في تطبيقات غذائيّة أخرى، كتطرية اللحوم، أو تحسين خواصّ العجين.

6- المراجع:

أبو غرّة، صياح؛ هدّال، أحمد؛ وحبيبه، فدوى. (2010). تأثير عمليات تصنيع الجبن الأبيض الناعم المرصوص في الحمولة الجرثومية. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. 26(1)، 247-260.

الخفاجي، زهرة. (1990). التقانة الحيويَّة. بغداد، المطبوعات الجامعية. (ص_ص 205-206).

Abdel-Raouf, H. A. H., El-Neshwy, A. A., Rabie, A. M., and Khalifa, S. A. (2017). Evaluation of rennet substitute from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers extracts: study the factors affecting the activity of milk clotting. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, *44*(6), 2203-2219.

Abd-El Salam, M., and Benkerroum, N. (2006). North African Brined Cheeses. In: A. Y. Tamime (Ed.). *Brined Cheeses*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. (p 174).

Abdelouahab, N., Nabila, B., Roza, S., Slimane, B., Etienne, D., Pascal, A., and Mouloud, B. M. (2015). Molecular Weight Determination of a Protease Extracted from *Mucor pusillus*: Comparison Methods. *Food and Nutrition Sciences*, *6*(03), 348.

Abdullah, A. L., Tengerdy, R. P., and Murphy, V. G. (1985). Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnology and Bioengineering*, *27*(1), 20-27.

Abe, M., Abe, K., Kuroda, M., and Arai, S. (1992). Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin: molecular cloning and expression studies. *European Journal of Biochemistry*, *209*(3), 933-937.

Adinarayana, K., Ellaiah, P., and Prasad, D. S. (2003). Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *Aaps Pharmscitech*, *4*(4), 440-448.

Adrio, J. L., and Demain, A. L. (2006). Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS microbiology reviews*, *30*(2), 187-214.

Adrio, J. L., and Demain, A. L. (2010). Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered bugs*, *1*(2), 116-131.

Aguilar, C. N., Favela-Torres, E., Vinegra-González, G., and Augur, C. (2002). Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20. *Applied biochemistry and biotechnology*, *102*(1), 407-414.

Ahmed, I. A. M., Babiker, E. E., and Mori, N. (2010). pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *LWT-Food Science and Technology*, *43*(5), 759-764.

Ahmed, S. A., and Helmy, W. A. (2012). Comparative evaluation of *Bacillus licheniformis* 5A5 and *Aloe variegata* milk-clotting enzymes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *29*, 69-76.

Alvarez, V. M., Von der Weid, I., Seldin, L., and 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.

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. *Middle East Journal of Applied Sciences*, *5*(4), 1068-1081.

American Cheese Society. (2018). *American Cheese Society Cheese and Dairy Product Lexicon and Glossary*. Denver: American Cheese Society. (pp 4-36).

Andrade, V. S., Sarubbo, L. A., Fukushima, K., Miyaji, M., Nishimura, K., and 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.

Andre´n, A. (2011). Rennets and Coagulants. In: J. W. Fuquay., P. L. McSweeney., & P. F. Fox. (Eds.). *Encyclopedia of dairy sciences* (2nd ed.). UK: Academic Press. (p 576).

Araújo, B. F., Ramos, E. L. P., Contiero, J., Ferreira, G. L. S., and Silveira, G. G. (2015). The role of the type of substrate, particle size, and coagulations analytical method on microbial rennet synthesis by *Mucor miehei* Cooney & R. Emers., 1964 (Fungi: Zygomycota) via solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, *2*(4), 245-251.

Arima, K., Iwasaki, S., and Tamura, G. (1967). Milk clotting enzyme from microorganisms: Part I. Screening test and the identification of the potent fungus. *Agricultural and Biological Chemistry*, *31*(5), 540-545.

Ataci, N., Simsek, G., Atac, I. A., and Kuzu, H. (2009). Temperature and pH Effect on Milk Clotting Time of *Mucor miehei* Rennet. *Asian Journal of Chemistry, 21*(3), 1754-1758.

Auerbach, C. (2013). *Mutation research: problems, results and perspectives*. New York: Springer. (p 445).

Ayhan, F., Çelebi, S. S., and 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.

Bailey, M. J., and Siika-aho, M. (1988). Production of microbial rennin. *Biotechnology Letters*, *10*(3), 161-166.

Banik, S., Bandyopadhyay, S., and Ganguly, S. (2003). Bioeffects of microwave—a brief review. *Bioresource technology*, *87*(2), 155-159.

Barrett, A. J. (1994). Classification of peptidases. In: A. J. Barrett (Ed.). *Methods in Enzymology, volume 244, Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases*. San Diego: Academic press. (p 1).

Barrett, A., Rawlings, N., Woessner, J. (2004). *Handbook of Proteolytic Enzymes Volume 1, Aspartic and Metallo Peptidases* (2nd ed.). Oxford, UK: Academic Press. (p 1).

Benluvankar, V., Priya, S. E., and Gnanadoss, J. J. (2016). Medium Formulation and its optimization for increased protease production by *Penicillium* sp. LCJ228 and its potential in blood stain removal. *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol*, *4*(01), 020-026.

Berg, J. S., Powell, B. C., and Cheney, R. E. (2001). A millennial myosin census. *Molecular Biology of the Cell 12*(4), 780–794.

Berger, H., Basheer, A., Böck, S., Reyes-Dominguez, Y., Dalik, T., Altmann, F., and Strauss, J. (2008). Dissecting individual steps of nitrogen transcription factor cooperation in the *Aspergillus nidulans* nitrate cluster. *Molecular microbiology*, *69*(6), 1385-1398.

Berka, R. M., and Cherry, J. R. (2006). Enzyme biotechnology. In: C. Ratledge & B. Kristiansen (Eds.). *Basic biotechnology* (3rd ed.). UK: Cambridge University Press. (pp 477-478).

Beppu, T., and Nishiyama, M. (2013). Mucorpepsin. In: N. D. Rawlings & G. Salvesen. (Eds.). *Handbook of proteolytic enzymes* (3rd ed., Vol. 1). Oxford, UK: Academic press. (p.p 154-155).

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.

Beyzadeoglu, M., Ozyigit, G., and Ebruli, C. (2010). *Basic radiation oncology*. Germany: Springer. (p4).

Bills, G. F., and Foster, M. S. (2004). Formulae for selected materials used to isolate and study fungi and fungal allies. In: G. M. Mueller., M. S. Foster., and G. F. Bills (Eds.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Burlington, MA, UK: Elsevier Academic Press. (p 607).

Bisswanger, H. (2011). *Practical enzymology* (2nd ed., Rev. ed.). Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell. (pp 28-33, 37-38).

Blackwell, M., and Spatafora, J. W. (2004). Fungi and their allies. In: G. M. Mueller., M. S. Foster., and G. F. Bills (Eds.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Burlington, MA, UK: Elsevier Academic Press. (p 9).

Boon, E., Meehan, C. J., Whidden, C., Wong, D. H. J., Langille, M. G., and Beiko, R. G. (2014). Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes. *FEMS microbiology reviews*, *38*(1), 90-118.

Boratyński, F., Szczepańska, E., Grudniewska, A., Gniłka, R., and Olejniczak, T. (2018). Improving of hydrolases biosythesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. *Scientific reports*, *8*(1), 1-9.

Bowden, M. E., Crow, A. B., and Sullivan, T. (2003). *Pharmaceutical achievers: the human face of pharmaceutical research*. USA, Philadelphia: Chemical Heritage Press. (p 43).

Bozkurt-Cekmer, H., and Davidson, P. M., (2017). Microwaves for microbial inactivation—efficiency and inactivation kinetics. In M, Regier., K, Knoerzer, & H, Schubert (Eds.). *The microwave processing of foods*. Oxford: Woodhead Publishing. (pp 223-227).

Braga, R. M., Dourado, M. N., and Araújo, W. L. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*, 86-98.

Bugg, T. D. (2012). *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry* (2nd ed.). UK: John Wiley & Sons. (p.p 2, 8).

Bulgakova, V. G., Grushina, V. A., Orlova, T. I., Petrykina, Z. M., Polin, A. N., Noks, P. P., ... & Rubin, A. B. (1996). The effect of millimeter-band radiation of nonthermal intensity on sensitivity of *Staphylococcus* to various antibiotics. *Biofizika*, *41*(6), 1289-1293.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C., and Gooday, G. W. (2001). *The fungi* (2nd ed.). London: Academic Press. (p.p 1, 3, 12-15, 38-43).

Chelius, M. K., and Wodzinski, R. J. (1994). Strain improvement of *Aspergillus niger* for phytase production. *Applied microbiology and biotechnology*, *41*(1), 79-83.

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.

Chisti, Y. (1999). Solid Substrate Fermentations, Enzyme Production, Food Enrichment. In: M.C. Flickinger., & S.W. Drew (Eds.). *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation* (Vol. 5). New York, USA: John Wiley and Sons. (p 2455).

Chisti, Y. (2014). Fermentation (Industrial) Basic Considerations. In: Batt. C. A., & Tortorello. M. L (Eds.). *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed., Vol. 1). Oxford, UK: Academic Press (pp 751-761).

Chr. Hansen. (n.d.). *MICROLANT® Supreme*. Retrieved November 10, 2018, from https://www.chr-hansen.com/en/food-cultures-and-enzymes/cheese/cards/product-cards/microlant-supreme

Chr. Hansen. (2019). BioRen® 97T100 Product Information Version: 3 PI GLOB EN. Retrieved from https://hjemmeriet.com/en/ChrHansen/Products/BioRen/PI_GLOB_BioRen_97T100_410129_EN.pdf

Clark, S., Costello. (2009). Dairy Products Evaluation Competitions. In: S. Clark., M. Costello., M. Drake., & F. Bodyfelt (Eds.). *The sensory evaluation of dairy products* (2nd ed). Springer Science & Business Media. (pp 62-70).

Cooney, D., and Emerson, R. (1964). *Thermophilic Fungi: An Account of Their Biology, Activities, and Classification*. San Francisco: W.H. Freeman and Co. (pp 1-188).

Cooper. J. B. (2013). Endothiapepsin. In: N. D. Rawlings & G. Salvesen. (Eds.). *Handbook of proteolytic enzymes* (3rd ed., Vol. 1). Oxford, UK: Academic press. (p 147).

Cornish-Bowden, A. (2014). Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. *Perspectives in Science*, *1*(1-6), 74-87.

Crawley, M. J. (2007). Statistical Modelling. In: *The R book*. Chichester, UK: John Wiley & Sons. (p 327).

Crueger, W., Crueger, A., and Aneja. K. R. (2017). *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology* (3rd ed). India: Medtech. (pp 70-71).

Dai ,Y.J., Wang, L.M., Jiang, Z.F., Liu, W.Z., Cheng, C., Nan, X.H. and Liu, X.P. (2014). The effect of cultivation material C/N ratio on the growth and biological conversion rate of *Pleurotus eryngii* mycelium. In: F. Zheng (Ed.). *Biotechnology, Agriculture, Environment and Energy*. London: CRC Press. (pp 73-76).

Dardalhon, M., Averbeck, D., and Berteaud, A. J. (1981). Studies on possible genetic effects of microwaves in procaryotic and eucaryotic cells. *Radiation and Environmental Biophysics*, *20*(1), 37-51.

Da Silva, R. R., Souto, T. B., de Oliveira, T. B., de Oliveira, L. C. G., Karcher, D., Juliano, M. A., ... and Cabral, H. (2016). Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *43*(8), 1059-1069.

Davet, P. and Rouxel, F. (2000). *Detection and Isolation of Soil Fungi*. Plymouth, United Kingdom: Science Publisher Inc. (p 6-7).

De Hoog, G. S. (2000). *Atlas of clinical Fungi* (2nd ed.). Washington- USA: American Society for Microbiology. (pp 95-96).

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 Applied Sciences Journal*, *4*(4), 578-585.

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, Turkey. (pp 16-17).

De Renobales, M., Virto, M., and Barron, L. J. R. (2013). Rennets and sensory characteristics of traditional cheeses. In: V. R. Preedy., R. R. Watson., & V. B. Patel (Eds.). *Handbook of cheese in health: Production, nutrition and medical sciences* (Vol. 6). USA: Wageningen Academic Publishers. (p110).

Dhahi, S. J., Habash, R. W. Y., and Al-Hafid, H. T. (1982). Lack of mutagenic effects on conidia of *aspergillus amstelodami* irradiated by 8.7175-GHz CW microwaves. *Journal of Microwave Power*, *17*(4), 345-351.

Dos Santos Bazanella, G. C., Araujo, A. V., Castoldi, R., Maciel, G. M., Inacio, F. D., De Souza, C. G. M., ... & Peralta, R. M. (2014). Ligninolytic enzymes from white-rot fungi and application in the removal of synthetic dyes. In: T. M. Maria de Lourdes & M. Rai (Eds.). *Fungal Enzymes*. Boca Raton: CRC Press. (p 263).

Duranti, E., Bolla, P., Caroli, A., Chiofalo, L., Di Stasio, L., Fortina, R., ... & Zullo, A. (2003). Problems concerning ovine milk clotting aptitude. *Italian Journal of Animal Science*, 2(1), 89-95.

Dutta, J. R., Dutta, P. K., and Banerjee, R. (2005). Kinetic study of a low molecular weight protease from newly isolated *Pseudomonas* sp. using artificial neural network. *Indian Journal of Biotechnology, 4* (1), 127–133.

Dutta, J. R., and Banerjee, R. (2006). Isolation and characterization of a newly isolated *Pseudomonas* mutant for protease production. *Brazilian archives of biology and technology*, *49* (1), 37-47.

Elgammal, E. W., El-Khonezy, M. I., Ahmed, E. F., and Abd-Elaziz, A. M. (2020). Enhanced production, partial purification, and characterization of alkaline thermophilic protease from the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* BT21. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, *19*(4), 338.

El-Mansi, E. M. T., Bryce, C. F. A., Hartley, B. S., and Demain, A. L. (2006). Fermentation microbiology and biotechnology: an historical perspective. In: *Fermentation Microbiology and Biotechnology* (2nd ed.). USA: CRC press. (pp 1-8,16-24).

El Soda, M. (1997). Control and enhancement of flavour in cheese. In: B. A. Law (Ed.). *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Boston, MA: Springer. (p 219).

Escobar, J., and Barnett, S. M. (1993). Effect of agitation speed on the synthesis of *Mucor miehei* acid protease. *Enzyme and microbial technology*, *15*(12), 1009-1013.

Escobar, J., and Barnett, S. (1995). Synthesis of acid protease from *Mucor miehei*: integration of production and recovery. *Process biochemistry*, *30*(8), 695-700.

Eugster, E. (2017). Cheese, Processed Cheese, and Whey. In: B. Elvers (Ed.). *Ullmann's Food and Feed. V2, PART III: Bulk Food Components*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. (p 586).

Fernández-Lahore, H. M., Fraile, E. R., and Cascone, O. (1998). Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. *Journal of Biotechnology*, *62*(2), 83-93.

Fernandez-Lahore, H. M., Auday, R. M., Fraile, E. R., Cascone, O., Biscoglio de Jimenez Bonino, M., Pirpignani, L., and Machalinski, C. (1999). Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. *The Journal of peptide research*, *53*(6), 599-605.

Fileto-Pérez, H. A., Montoya-Ayón, L. G., Soto-García, E., Páez-Lerma, J. B., Soto-Cruz, N. O., García-Caballero, B. E., and Rutiaga-Quiñones, J. G. (2020). Effect of fermentation time and acid casein concentration as nitrogen source on microbial rennet production. *Journal of Dairy Research*, *87*(3), 379-381.

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.

Foltmann, B. (1993). General and molecular aspects of rennets. In P. F. Fox (Ed.). *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Boston, MA: Springer. (pp. 37-68).

Food and Drug Administration. (2022, January 9). *Code of Federal Regulations, 21 CFR 184.1685 - rennet (animal-derived) and chymosin preparation (fermentation-derived)*. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1685&SearchTerm=rennet

Fortune Business Insight. (2022). *Cheese Market Size, Share & COVID 19 Impact Analysis, By Source (Animal based and Plant based), Product Type (Cheddar, Mozzarella, Parmesan, Feta, and Others), Type (Processed, Natural, Block, Spreadable, and Hard & Soft Cheese), Distribution Channel (Supermarkets/Hypermarkets, Specialty Stores, Convenience Stores, and Online Retail), and Regional Forecast, 2021-2028*. Retrieved August 17, 2022, from https://www.fortunebusinessinsights.com/cheese-market-104293

Fox, P. F., and Walley, B. F. (1971). *Influence of sodium chloride on the proteolysis of casein by rennet and by pepsin. Journal of Dairy Research, 38(02),* 165-170.

Fox, P. F. (1993). Cheese: An Overview. In: P. F. Fox (Ed.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects* (2nd ed.). UK: Springer. (pp 8-9).

Fox, P. F., and McSweeney, P. L. H. (1997). Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In: B. A. Law (Ed.). *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Boston, MA: Springer. (p 1-14).

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., and McSweeney, P. L. (2017). *Fundamentals of cheese science* (2nd ed.). New York: Springer. (p. 315).

Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews*, *62*(2), 334-361.

Garfin, D. E. (2009). One-Dimensional Gel Electrophoresis. In: R. R. Burgess & M. P. Deutscher (Eds.). *Methods In Enzymology Volume 463, Guide To Protein Purification* (2nd ed.). Oxford, UK: academic press. (pp 502-511).

Gaur, R., Singh, A., Tripathi, A., and Singh, R. (2017). Bioreactors. In: R. L. Singh (Ed.). *Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future*. Singapore: Springer. (p 240).

Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B. A., and Mattiasson, B. O. (2003). Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*, *32*(5), 519-524.

Ghazi, S., Sepahy, A. A., Azin, M., Khaje, K., and Khavarinejad, R. (2014). UV mutagenesis for the overproduction of xylanase from *Bacillus mojavensis* PTCC 1723 and optimization of the production condition. *Iranian journal of basic medical sciences*, *17*(11), 844-853.

Glass, R. E. (1982). *Gene function: E. coli and its heritable elements*. USA: Univ of California Press. (p 118).

Gowthaman, M. K., Krishna, C., and Moo-Young, M. (2001). Fungal solid state fermentation—an overview. *Applied mycology and biotechnology*, *1*, 305-352.

Green, M. L., and Grandison, A. S. (1993). Secondary (non-enzymatic) phase of rennet coagulation and post-coagulation phenomena. In P. F. Fox (Ed.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects* (2nd ed.). UK: Springer. (pp 118-133).

Grünefeld, P., and Richert, C. (2006). Effect of microwave irradiation on phosphoramidite couplings on controlled pore glass. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, *25*(7), 815-821.

Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M., and Gharsallah, N. (2007). Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*, *42*(5), 791-797.

Haldane, J. B. S. (1965). *Enzymes*. Cambridge: MIT Press Classics, (originally publisher, Longmans, Green, 1930). (p 84).

Hamnerius, Y., Rasmuson, Å., and Rasmuson, B. (1985). Biological effects of high-frequency electromagnetic fields on *Salmonella typhimurium* and *Drosophila melanogaster*. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*, *6*(4), 405-414.

Harboe, M., Broe, M. L., and Qvist, K. B. (2010). The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants. In: B. A. Law & A. Y. Tamime (Eds.). *Technology of cheesemaking* (2nd ed.). Singapore: John Wiley & Sons. (pp 100-101, 124-125).

Harvey, L. M., and McNeil, B. (1994). Liquid fermentation systems and product recovery of *Aspergillus*. In: J. E. Smith (Ed.). *Biotechnology Handbooks. Volume 7. Aspergillus*. New York: Springer Science+Business Media, LLC. (p.p 150, 165).

Hawksworth, D. L., and Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum*, *5*(4), 5-4.

Hawley, R. S., and Walker, M. (2003). *Advanced genetic analysis: finding meaning in a genome*. UK: Blackwell Publishing. (p.p 9-11, 40-41).

Heflich, R. H. (1991). Chemical mutagens. In: A. P. Li., & R. H. Heflich (Eds.). *Genetic Toxicology*. USA: CRC press. (p.p 143, 145, 186-188, 192-193).

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... & Lumbsch, H. T. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, *111*(5), 509-547.

Horne, D. S., and Lucey, J. A. (2017). Rennet-induced Coagulation of Milk. 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 121).

Hossain, T. M. D. T., Das, F. L. O. R. A., Marzan, L. W., Rahman, M. S., and Anwar, M. N. (2006). Some properties of protease of the fungal strain *Aspergillus flavus*. *Int J Agric Biol*, *8*(2), 162-164.

Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell 80*(2), 225–236.

Huppertz, T., and Fox, P. F. (2006). Effect of NaCl on some physico-chemical properties of concentrated bovine milk. *International Dairy Journal, 16(10), 1142–1148.*

Illanes, A. (2008). *Enzyme biocatalysis: principles and applications*. Netherlands: Springer Science & Business Media. (p.p 4, 5, 16-18, 62-63).

Iwasaki, S., Tamura, G. and Arima, K. (1967). Milk clotting enzyme from microorganisms: Part II. The enzyme production and the properties of crude enzyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, *31*(5), 546-551.

Jacob, M., Jaros, D., and Rohm, H. (2010). The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory-, pilot-and commercial-scale productions. *International journal of dairy technology*, *63*(3), 370-380.

Jain, J. L. (2004). *Fundamentals of biochemistry*. S. New Delhi: Chand Publishing. (p 338).

Jeyanthi, G. P. (2009). *Molecular Biology*. Chennai, India: MJP Publishers. (pp 257-258).

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.

Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Expert Committee on Food Additives. (1974). *Evaluation of certain food additives: eighteenth report of the Joint FAO/WHO.* Geneva: FAO & WHO. (p 34).

Karcher, S. J. (1995). *Molecular biology: a project approach*. San Diego, California: Academic Press, Inc. (pp 170-171).

Katoh, S., Horiuchi, J. I., and Yoshida, F. (2015). *Biochemical engineering: a textbook for engineers, chemists and biologists* (2nd ed., Rev. ed.). Weinheim, Germany: John Wiley & Sons. (p191).

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.

Keasling, J. D. (2012). Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. *Metabolic engineering*, *14*(3), 189-195.

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, 5*(2), 115-121.

Khalil Moghaddam, S., Khaleghian, M., Naderi, F., Azin, M., and Monajjemi, M. (2008). Purification and characterization of milk clotting enzyme produced by *Rhizomucor Rmiehei*. *Journal of Physical & Theoretical Chemistry*, *5*(3), 29-34.

Khan, A. R., and James, M. N. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science*, *7*(4), 815-836.

Khattab, A. A., and Bazaraa, W. A. (2005). Screening, mutagenesis and protoplast fusion of *Aspergillus niger* for the enhancement of extracellular glucose oxidase production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *32*(7), 289-294.

Kidd, S., Halliday, C. L., Alexiou, H., and Ellis, D. (2016). *Descriptions of medical fungi* (3rd ed.). Adelaide, South Australia: the Authors. (p. 232).

Kokkonen, P., Beier, A., Mazurenko, S., Damborsky, J., Bednar, D., and Prokop, Z. (2021). Substrate inhibition by the blockage of product release and its control by tunnel engineering. *RSC chemical biology*, 2(2), 645-655.

Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems—an overview. *Critical reviews in biotechnology*, *25*(1-2), 1-30.

Kumar, A. K., Parikh, B. S., Singh, S. P., and Shah, D. (2015). Use of combined UV and chemical mutagenesis treatment of *Aspergillus terreus* D34 for hyper-production of cellulose-degrading enzymes and enzymatic hydrolysis of mild-alkali pretreated rice straw. *Bioresources and Bioprocessing*, *2*, 35, 1-11.

Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *The Journal of General Physiology*, *30*(4), 291-310.

Lackner, M., Caramalho, R., and Lass-Flörl, C. (2014). Laboratory diagnosis of mucormycosis: current status and future perspectives. *Future microbiology*, *9*(5), 683-695.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, *227*(5259), 680-685.

Lai, Y. P., Huang, J., Wang, L. F., Li, J., and Wu, Z. R. (2004). A new approach to random mutagenesis in vitro. *Biotechnology and bioengineering*, *86*(6), 622-627.

Lambert, P. W., and Meers, J. L. (1983). The production of industrial enzymes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 300*(1100), 263-282.

Lario, L. D., Pillaca-Pullo, O. S., Sette, L. D., Converti, A., Casati, P., Spampinato, C., and Pessoa, A. (2020). Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast Rhodotorula mucilaginosa CBMAI 1528. *Biotechnology Reports*, *28*, e00546, 1-9.

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).

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. (p.p 88-89, 91).

Li, X. H., Yang, H. J., Roy, B., Park, E. Y., Jiang, L. J., Wang, D., & Miao, Y. G. (2010). Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. *Microbiological Research*, *165*(3), 190-198.

Lineweaver, H., and Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, *56*(3), 658-666.

Lonsane, B., and Krishnaiah, M. (1992). Leaching the product and further downstream processing. In: H. W. Doelle., D. A. Mitchell., and C. E. Rolz, (eds.). *Solid Substrate Cultivation*. London, UK: Elsevier Applied Science. (pp 157-158).

Losso, J. N. (2008). The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. *Critical reviews in food science and nutrition*, *48*(1), 94-118.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., and Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, *193*(1), 265-275.

Macauley-Patrick, S., and Finn, B. (2008). Modes of fermenter operation. In: B. McNeil & L. Harvey (Eds.). *Practical fermentation technology*. West Sussex, England: John Wiley and Sons, Ltd. (pp 71-72).

Maggi, M., Mittelman, S. D., Parmentier, J. H., Colombo, G., Meli, M., Whitmire, J. M., ... & Scotti, C. (2017). A protease-resistant *Escherichia coli* asparaginase with outstanding stability and enhanced anti-leukaemic activity in vitro. *Scientific reports*, *7*(1), 1-16.

Maier, R. M., and Pepper, I. L. (2015). Bacterial growth. In: I. L. Pepper., C. P. Gerba., and T. J. Gentry (Eds.). *Environmental Microbiology* (3rd ed.). Oxford, UK; Academic Press. (pp 38-41).

Mamo, J., Kangwa, M., Fernandez-Lahore, H. M., and Assefa, F. (2020). Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(2), 571-584.

Manjrekar, S., Wadekar, T., and Sumant, O. (2021, March). *Enzymes Market- Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2020–2027*. Allied Market Research. https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market

Manoliu, A., Tufescub, F. M., Opricaa, L., Olteanua, Z., and Creangab, D. E. (2004). Microwave Influence in Fungi-a Preliminary Study. *Proceedings of the 11th International Congress of the International Radiation Protection Association, Madrid. Spain, 35*(34), 1-8.

Mantle, D., and Preedy, V. R. (2002). Adverse and beneficial functions of proteolytic enzymes in skeletal muscle. *Adverse drug reactions and toxicological reviews*, *21*(1), 31-49.

Marzluf, G. A. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *61*(1), 17-32.

Mattern, I. E., van Noort, J. M., van den Berg, P., Archer, D. B., Roberts, I. N., and van den Hondel, C. A. (1992). Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Molecular and General Genetics MGG*, *234*(2), 332-336.

McNeil, B., and Harvey, L. (2008). The Design and Preparation of Media for Bioprocesses. In: *Practical fermentation technology*. West Sussex, England: John Wiley and Sons, Ltd. (pp 99-109).

Meltz, M. L. (1991). Physical mutagens. In: A. P. Li., & R. H. Heflich (Eds.). *Genetic Toxicology*. USA: CRC press. (pp 206, 225-229).

Mezykowski, T., Bal, J., Debiec, H., and Kwarecki, K. (1980). Response of *Aspergillus nidulans* and *Physarum polycephalum* to microwave irradiation. *Journal of Microwave Power.15*(2), 75-80.

Miglani, G. S. (2002). *Advanced genetics*. UK: Alpha science international Ltd. (p.p 92, 110).

Minitab Inc.(n.d.). *Model reduction*. Retrieved March 10, 2022, from https://support.minitab.com/en-us/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/regression/supporting-topics/regression-models/model-reduction/

Mitchell, D. A. (1992). Microbial basis of processes. In: H. W. Doelle., D. A. Mitchell., and C. E. Rolz, (eds.). *Solid Substrate Cultivation*. London, UK: Elsevier Applied Science. (pp 25–26).

Mitchell, D. A., Srinophakun, P., Krieger, N., and von Meien, O. F. (2006). Group II bioreactors: forcefully-aerated bioreactors without mixing. In: D. A. Mitchel., M. Berovič., & N. Krieger. *Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation*. Berlin, Heidelberg: Springer. (p 91).

Mótyán, J. A., Tóth, F., and Tőzsér, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, *3*(4), 923-942.

Mueller, G. M., and Bills, G. F. (2004). Introduction. In: G. M. Mueller., M. S. Foster., and G. F. Bills (Eds.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Burlington, MA, UK: Elsevier Academic Press. (p 1).

Mujica, M. Á., Matute-Almeida, L., Rodas-Espinoza, S., Román-Rojas, H., & Vargas-Guzmán, D. (2020). Influence of stirring speed, initial pH and fermentation time on obtaining microbial rennet from *Rhizomucor miehei*. *Biotecnología Aplicada*, *37*(3), 3201-3207.

Nadeem, M., Qazi, J. I., and Baig, S. (2010). Enhanced production of alkaline protease by a mutant of *Bacillus licheniformis* N-2 for dehairing. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *53*(5), 1015-1025.

Nandakumar, M. P., Thakur, M. S., Raghavarao, K. S. M. S., and Ghildyal, N. P. (1999). Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. *Letters in Applied Microbiology*, *29*(6), 380-384.

Nooralabettu, K. P. (2014). Optimisation of ammonium sulfate precipitation method to achieve high throughput concentration of crude alkaline phosphatase from Brown shrimp (*Metapenaeus monoceros*) hepatopancreas. *International Journal of Analytical Bio-Science*, *2*(1), 7-16.

Nurkasanah, S., and Widodo, N. (2015). The Effect of Different Media Content on Protease Activity *Bacillus subtilis*. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, *3*(2), 104-106.

Okpara, M. O., Bamidele, O. S., and Ajele, J. O. (2019). Enhanced Production of Salinity-Induced Proteases from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Advances in Enzyme Research*, *7*(4), 45-56.

Ooijkaas, L. P., Weber, F. J., Buitelaar, R. M., Tramper, J., and Rinzema, A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*, *18*(8), 356-360.

Ottens, M., Wesselingh, J. A., and van der Wielen, L. A. M. (2006). Downstream processing. In: Ratledge, C., & Kristiansen, B. (Eds.). *Basic biotechnology* (3rd ed.). UK: Cambridge University Press. (pp 219-250).

Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., and Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*, 149-162.

Pandey, A., Soccol, C. R., and Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process biochemistry*, *35*(10), 1153-1169.

Pandey, A., Soccol, C. R., and Larroch, C. (2008). *Current Developments In Solid-State Fermentation*. India: Springer Science & Business Media, LLC. (pp 3, 13, 22, 23).

Papp, T., Nyilasi, I., Takó, M., Nagy, L. G., and Vágvölgyi, C. (2011). *Rhizomucor*. In: D. Liu (Ed.). *Molecular detection of human fungal pathogens*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, LLC. (p 783-790).

Pérez-Guerra, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macias, C., and Pastrana, L. (2003). Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, *2*(3), 343-350.

Pham, C. H., Collier, Z. J., Fang, M., Howell, A., and Gillenwater, T. J. (2019). The role of collagenase ointment in acute burns: a systematic review and meta-analysis. *Journal of wound care*, *28*(2), 9-15.

Piscitelli, A., Pezzella, C., Lettera, V., Giardina, P., Faraco, V., and Sannia, G. (2014). Fungal laccases: structure, function and application. In: T. M. Maria de Lourdes & M. Rai (Eds.). *Fungal Enzymes*. Boca Raton: CRC Press. (p 121).

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.

Preetha, S., and Boopathy, R. (1997). Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *13*(5), 573-578.

Prescott, L. M. (2002). *Microbiology* (5th ed.). New York: McGraw-Hill. (p 96).

Quaglia, G. B., and Gennaro, L. (2003). ENZYMES| Uses in Food Processing. In: Caballero, B. (Ed.). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). San Diego, CA, USA: Academic Press. (p 2133-2134).

Radha, S., Babu, R. H., Sridevi, A., Prasad, N. B. L., and Narasimha, G. (2012). Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation. *European Journal of Experimental Biology*, *2*(5), 1517-1528.

Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, *1*(3), 26-27.

Ramet, J. P. (2001). ways of improving cheese made from camel milk. In: *The technology of making cheese from camel milk (Camelus dromedarius)* (No. 113). Food & Agriculture Org. (p 21).

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.

Rao, H. G., Shravani, H. N., Vutukuru, S. S., Subramanyam, K., and Rajasekhar, P. (2012). Strain improvement by classical mutagenesis for L-arginine production. *International Journal of Science & Technology*, *2*(4), 16-26.

Rasband, W. S. (n.d). *ImageJ*. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA https://imagej.nih.gov/ij/

Rawlings, N. D., Barrett, A. J., and Bateman, A. (2011). Asparagine Peptide Lyases: A seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(44), 38321-38328.

Rawlings, N. D. (2013). Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. In: K. Brix & W. Stöcker (Eds.). *Proteases: structure and function*. Vienna: Springer-Verlag Wien. (p 1-7).

Ribeiro, O., Magalhães, F., Aguiar, T. Q., Wiebe, M. G., Penttilä, M., and Domingues, L. (2013). Random and direct mutagenesis to enhance protein secretion in *Ashbya gossypii*. *Bioengineered*, *4*(5), 322-331.

Ribes, J. A., Vanover-Sams, C. L., and Baker, D. J. (2000). Zygomycetes in human disease. *Clinical microbiology reviews*, *13*(2), 236-301.

Roberts, S. M., and Gibb, A. J. (2013). Introduction to enzymes, receptors and the action of small molecule drugs. In: R. Ganellin., S. Roberts., and R. Jefferis (Eds.). *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development; theory and case studies*. UK: Elsevier. (pp. 1-55).

Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry, 59*, 1-41.

Rodriguez-Leon, J. A., Rodriguez-Fernandez, D. E., and Soccol, C. R. (2013). Laboratory and industrial bioreactors for solid state fermentation. In: C. R. Soccol., A. Pandey, and C. Larroche (Eds.). *Fermentation Processes Engineering in the Food Industry, Contemporary Food Engineering*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press. (pp 183-185).

Saito, M., and Machida, S. (1999). A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of Aspergillus flavus and A. parasiticus by ammonia vapor. *Mycoscience*, *40*(2), 205-208.

Sardinas, J. L. (1972). Microbial rennets. In D. Perlman (Ed.). *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 15). New York: Academic Press, INC. (pp. 39-73).

Sato, S., Shibata, C., and Yazu, M. (1996). Nonthermal killing effect of microwave irradiation. *Biotechnology techniques*, *10*(3), 145-150.

Schäfer, T. (2007). Discovering new industrial enzymes for food applications. In R. Rastall (Ed.). *Novel Enzyme Technology for Food Applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. (p 3).

Schipper, M. A. A. (1978). On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*. *Studies in Mycology*, *17*, 53-71.

Schomburg, D., Schomburg, I., Chang, A. (2002). *Springer Hand Book Of Enzymes: Class 3.4 Hydrolases III: EC 3.4.23 - 3.4.99*, *Voume 8* (2nd ed.). Germany: Springer Science & Business Media. (pp 108-109).

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

Şeker, Ş., Beyenal, H., Ayhan, F., and Tanyolaç, A. (1998). Production of microbial rennin from Mucor miehei in a continuously fed fermenter. *Enzyme and Microbial Technology*, *23*(7-8), 469-474.

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.

Shah, M. A., Mir, S. A., and Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy science & technology*, *94*(1), 5-16.

Shahbandeh, M. (2022). *Annual cheese production worldwide from 2015 to 2021*. Retrieved August 17, 2022 from https://www.statista.com/statistics/1120911/cheese-production-worldwide/

Shamis, Y., Taube, A., Mitik-Dineva, N., Croft, R., Crawford, R. J., and Ivanova, E. P. (2011). Specific electromagnetic effects of microwave radiation on *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(9), 3017-3022.

Sharma, A. K., and Singh, S. P. (2016). Effect of amino acids on the repression of alkaline protease synthesis in haloalkaliphilic *Nocardiopsis dassonvillei*. *Biotechnology Reports*, *12*, 40-51.

Sharma, K. M., Kumar, R., Panwar, S., and Kumar, A. (2017). Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *15*(1), 115-126.

Shaw, P., Kumar, N., Mumtaz, S., Lim, J. S., Jang, J. H., Kim, D., ... & Choi, E. H. (2021). Evaluation of non-thermal effect of microwave radiation and its mode of action in bacterial cell inactivation. *Scientific Reports*, *11*(1), 1-12.

Shibai, A., Takahashi, Y., Ishizawa, Y., Motooka, D., Nakamura, S., Ying, B. W., and Tsuru, S. (2017). Mutation accumulation under UV radiation in Escherichia coli. *Scientific reports*, *7*(1), 1-12.

Siala, R., Frikha, F., Mhamdi, S., Nasri, M., and Sellami Kamoun, A. (2012). Optimization of acid protease production by *Aspergillus niger* I1 on shrimp peptone using statistical experimental design. *The Scientific World Journal*, *V 2012*, Article 564932.

SIGMA-ALDRICH. (n.d.-a). *Lipase from Aspergillus oryzae*. Retrieved February 13, 2022, from https://www.sigmaaldrich.com/DE/en/product/sigma/l0777

SIGMA-ALDRICH. (n.d.-b). *Protease from Aspergillus oryzae*. Retrieved February 13, 2022, from https://www.sigmaaldrich.com/DE/en/product/sigma/p6110

SIGMA-ALDRICH. (n.d.-c). *Cellulase from Trichoderma reesei*. Retrieved February 13, 2022, from https://www.sigmaaldrich.com/DE/en/product/sigma/c2730

SIGMA-ALDRICH. (n.d.-d). *Cellulase from Aspergillus sp.*. Retrieved February 13, 2022, from https://www.sigmaaldrich.com/DE/en/product/sigma/c2605

SIGMA-ALDRICH. (n.d.-e). *Dextranase from Chaetomium erraticum*. Retrieved February 13, 2022, from https://www.sigmaaldrich.com/DE/en/product/sigma/d0443

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.

Sing, S. K., Sczakase, G., Soccol, C. R., and Pandey, A. (2008). Production of Enzymes by Solid-State Fermentation. In: A. Pandey., C. R. Soccol., & C. Larroche (Eds.). *Current developments in solid-state fermentation*. India: Springer Science & Business Media, LLC. (pp 196-197).

Sipos, P., Tóth, Á., Elek, Á., and Győri, Z. (2005). Investigation of carbon content and C/N ratio in flours from maturing wheats. *Cereal Research Communications*, *33*(1), 403-406.

Soghomonyan, D., Trchounian, K., and Trchounian, A. (2016). Millimeter waves or extremely high frequency electromagnetic fields in the environment: what are their effects on bacteria?. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*(11), 4761-4771.

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

Stanbury, P. F., Whitaker, A., and Hall, S. J. (2016). *Principles of fermentation technology* (3rd ed.). UK: Elsevier. (p.p 227, 368, 376-378).

Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., and Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. San Diego, CA, USA: Academic Press. (p 236).

Sternberg, M. (1976). Microbial rennets. In D. Perlman (Ed.). *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 20). New York: Academic Press, INC. (pp. 148-150).

Streets, B. W., and Ingle, M. B. (1972). The effect of temperature on spore germination and growth of *Mucor miehei* in submerged culture. *Canadian journal of microbiology*, *18*(7), 975-979.

Subramaniyam, R., and Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International journal of science and nature*, *3*(3), 480-486.

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

Snyman, C., Theron, L. W., and Divol, B. (2019). Understanding the regulation of extracellular protease gene expression in fungi: a key step towards their biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, *103*(14), 5517-5532.

Szecsi, P. B., and Harboe, M. (2013). Chymosin. In: N. D. Rawlings & G. Salvesen. *Handbook of Proteolytic Enzymes* (3rd ed., Vol. 1). Oxford, UK: Academic press. (pp. 37-38).

Tajik, N., Azin, M., Fallahpour, M., & Pourahmad, R. (2014). Mutagenesis by UV and Nitrous Acid for increase of rennet production in *Rhizomucor miehei*. *Biological Journal of Microorganism*, *3*(10), 1-12.

Takó, M., Kotogán, A., Krisch, J., Vágvölgyi, C., Mondal, K. C., and Papp, T. (2015). Enhanced production of industrial enzymes in Mucoromycotina fungi during solid-state fermentation of agricultural wastes/by-products. *Acta Biologica Hungarica*, *66*(3), 348-360.

Taşkın, E., and Eltem, R. (2008). The enhancement of polygalacturonase and polymethylgalacturonase production on solid-state conditions by *Aspergillus foetidus*. *Food Biotechnology*, *22*(3), 203-217.

Thakur, M. S., Karanth, N. G., and Nand, K. (1990a). Studies on the production of microbial rennet by solid state fermentation. *Transactions of the Mycological Society of Republic of China*, *5*(1&2), 13-28.

Thakur, M. S., Karanth, N. G., and Nand, K. (1990b). Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, *32*(4), 409-413.

Thakur, M. S., Karanth, N. G., and Nand, K. (1993). Downstream processing of microbial rennet from solid state fermented moldy bran. *Biotechnology advances*, *11*(3), 399-407.

Tipton, K. (2018). *Translocases (EC 7): A new EC Class. Enzyme Nomenclature News*. Retrieved June 07, 2021 from https://www.enzyme-database.org/news.php#top

Torgerson, T., and Ochs, H. (2014). Genetics of Primary Immune Deficiencies. In: K. E. Sullivan and E. R. Stiehm (Eds.). *Stiehm's Immune Deficiencies*. UK: Academic Press. (pp. 73-81).

Torgomyan, H., and Trchounian, A. (2015). The enhanced effects of antibiotics irradiated of extremely high frequency electromagnetic field on *Escherichia coli* growth properties. *Cell biochemistry and biophysics*, *71*(1), 419-424.

Torres, E. M., Williams, B. R., and Amon, A. (2008). Aneuploidy: cells losing their balance. *Genetics*, *179*(2), 737-746.

Tropp, B. E. (2014). *Principles of Molecular Biology*. Massachusetts, USA: Jones & Bartlett Learning. (pp 319-321).

Twyman, R. M. (2018). *Advanced molecular biology: A concise reference*. Boca Raton, USA: Taylor & Francis. (p 201).

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).

United States Department of Agriculture. (2019a). *USDA's FoodData Central*. Retrieved August 18, 2022 from https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/328637/nutrients

United States Department of Agriculture. (2019b). *USDA's FoodData Central*. Retrieved April 23, 2022 from https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169722/nutrients

Vágvölgyi, C., Vastag, M., Ács, K., and Papp, T. (1999). *Rhizomucor tauricus*: a questionable species of the genus. *Mycological Research*, *103*(10), 1318-1322.

Van Oort, M. (2010). Enzymes in food technology–introduction. In: R. J. Whitehurst., & M. Van Oort (Eds.). *Enzymes in food technology* (2nd ed.). Chinchester, UK: Wiley-Blackwell. (pp 1-17).

Vechtomova, Y. L., Telegina, T. A., Buglak, A. A., and Kritsky, M. S. (2021). UV radiation in DNA damage and repair involving DNA-photolyases and cryptochromes. *Biomedicines*, *9*(11), 1564.

Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., de Jesus Rómero-Gomez, S., Díaz-Godínez, G., and Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, *13*(2-3), 157-167.

Visser, S. (1993). Proteolytic Enzymes and Their Relation to Cheese Ripening and Flavor: An Overview. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 329–350.

Walther, B., Schmid, A., Sieber, R., and Wehrmuller, K. (2010). Cheese in nutrition and health. *Medicine& Nutrition,46*, 38-51.

Wang, S. L., Chen, Y. H., and Yen, Y. H. (2005). Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology*, *36*(5-6), 660-665.

Wang, L., and Yang, S. T. (2007). Solid state fermentation and its applications. In: S. T. Yang (Ed.). *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*. Netherlands: Elsevier. (pp. 473-474).

Wang, S., Zhang, P., Xue, Y., Yan, Q., Li, X., and Jiang, Z. (2021). Characterization of a Novel Aspartic Protease from *Rhizomucor miehei* Expressed in *Aspergillus niger* and Its Application in Production of ACE-Inhibitory Peptides. *Foods*, *10*(12), 2949, 1-12.

Webb, E. C. (1992). *Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. San Diego: Academic Press. (p.p 371, 404).

Whitaker, A. (1992). *Actinomycetes* in submerged culture. *Applied biochemistry and biotechnology*, *32*(1), 23-35.

Williams, J. A. (2004). Pancreatic Digestive Enzymes. In: L. R. Johnson (Ed.). *Encyclopedia of gastroenterology* (Vol. 2). Oxford: Academic Press. (p 49).

Wium, H., Pedersen, P. S., and Qvist, K. B. (2003). Effect of coagulation conditions on the microstructure and the large deformation properties of fat-free Feta cheese made from ultrafiltered milk. *Food hydrocolloids*, *17*(3), 287-296.

Wu, M., Tang, C., Li, J., Zhang, H., and Guo, J. (2011). Bimutation breeding of *Aspergillus niger* strain for enhancing β-mannanase production by solid-state fermentation. *Carbohydrate research*, *346*(14), 2149-2155.

Yang, Y., Iwamoto, A., Kumrungsee, T., Okazaki, Y., Kuroda, M., Yamaguchi, S., and Kato, N. (2017). Consumption of an acid protease derived from *Aspergillus oryzae* causes bifidogenic effect in rats. *Nutrition Research*, *44*, 60-66.

Yasuhara, A., Ogawa, A., Tanaka, T., Sakiyama, T., and Nakanishi, K. (1994). Production of neutral protease from *Aspergillus oryzae* by a novel cultivation method on a microporous membrane. *Journal of Biotechnology techniques*, *8*(4), 249-254.

Zanoelo, F. F., Giannesi, G. C., and Cabral, H. (2014). Proteolytic enzymes: biochemical properties, production and biotechnological application. In: M. L. T. M Polizeli., and M. Rai (Eds.). *Fungal Enzymes*. Boca Raton, FL: CRC Press. (P. 101).

Zhang, D., Palmer, J., Teh, K. H., Calinisan, M. M. A., and Flint, S. (2020). Milk fat influences proteolytic enzyme activity of dairy Pseudomonas species. *International Journal of Food Microbiology*, *320*, 108543, 1-7.

Zhang, W., Liu, F., Yang, M., Liang, Q., Zhang, Y., Ai, D., and An, Z. (2014). Enhanced β-galactosidase production of *Aspergillus oryzae* mutated by UV and LiCl. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *44*(3), 310-320.

Zhang, W., Zhang, Z., and Yao, T. (2016). Enhanced Milk-Clotting Enzyme Production of *Mucor Miehei* Mutated by UV and LiCl. *International Conference on Biomedical and Biological Engineering. 62*, 404-409.

Zheng, X., Shi, X., and Wang, B. (2021). A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 703284, 1-17.

Zhou, Y., Han, L. R., He, H. W., Sang, B., Yu, D. L., Feng, J. T., and Zhang, X. (2018). Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasenisi* ZX01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient. *Molecules*, *23*(1), 125.

ملحق 1: الأجهزة المستخدمة في البحث.

اسم الجهاز	الشركة المصنّعة وبلد المنشأ
ميزان حساس	Mettler Toledo (AB204-S/PH) -Taiwan
موصدة (أوتوكلاف)	LABTECH (LAC-5040S)- Korea
حاضنة	Memmert (BE 500) – Germany
حاضنة هزّازة	New Brunswick Scientific – U.S.A
مقياس الـ pH	Hanna – Romania
مجهر ضوئي	URA Technic– Spain
جهاز تثقيل مبرد	Heraeus – Germany
مطياف الأشعّة المرئيّة	Secomam- France
مطياف الأشعّة المرئيّة وفوق البنفسجيَّة	Optizen- Korea
حَمّام مائي	Memmert- Germany
حَمّام مائي	KÖTTERMANN (3047)- Germany
مُحرِّك مغناطيسي مُسخِّن	Velp Scientifica (AREC)- Italy
فرن ميكرويف	LG (MS3046SQW/100)- China
مصباح مولِّد للأشعّة فوق البنفسجيَّة	Philips (TUV-30 W/G, 30 TB, 1K)- Holland
مضخّة تفريغ	Rocker- India
جهاز الرحلان الكهربائي	Bio-Rad-USA
مُجفِّدة	Christ Alpha (101021)- Germany

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 10.24 g/L, respectively, adjustment of the initial pH at 5.99, and incubation for 89.94 hr at 40.9℃. 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 41.1℃. 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 (K_m) and maximum velocity (V_{max}) values exhibited by Rm4 protease with casein as a substrate were 19.46 mg/mL and 0.0026 mg/min, respectively. For MW150 protease, K_m and V_{max} were 26.29 mg/mL and 0.0021 mg/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, K_m and V_{max} 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, K_m and V_{max} 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: Biomethods, Cheese, Kinetic, Enzyme activity, Mutagenesis, Purification, Protease, *Rhizomucor miehei*.

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

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

A thesis submitted for the degree of Doctorate in Agricultural Engineering (Food Science)

by

Houthail Alahmad Aljammas

Supervisors

Prof. Sabah Yazji
Department of Food Science
Faculty of Agricultural Engineering
Damascus University
Main Supervisor

Prof. Abdulhakim Azizieh
Department of Food Science
Faculty of Agricultural Engineering
Damascus University
Co-Supervisor

2023 AD-1444 AH