چکیده

در پژوهشی که در زمینهٔ تولید آنزیمهای جانشین رنین بوسیله یک سویه از کپک گرمادوست *Mucor miehei* در سیستم فرمانتاسیون بستر جامد انجام پذیرفت، پس از بررسی در زمینهٔ بهینه‌سازی محیط کشت، مشخص گردید که فعالیت آنزیمی در شرایط بهینهٔ تولید، شامل: گرماگذاری $40^{\circ}C$، رطوبت ۵۰٪، حجم تلقیح 10^3 اسپور به ازای هر گرم سبوس گندم و محرک کازئین باغلظت ۱/۵٪ و پس از ۱۱۰ ساعت، به حداکثر خود می‌رسد. در این شرایط به ازای هر گرم محیط کشت ۸۴۰۰ SU آنزیم تولید شد. در نتیجهٔ رسوب آنزیم با سولفات آمونیم پودری قهوه‌ای رنگ، با قدرت لخته کنندگی تقریبی (۱۰۰۰۰۰ SU/g)، عاری از میکروارگانیسم و توکسین و دارای عطری مطلوب به دست آمد.

بررسی تولید رنت قارچی بوسیله *Mucor miehei* با بکارگیری سیستم فرمانتاسیون سوبسترای جامد

● **سیدمجتبی طباطبائی یزدی**، عضو هیئت علمی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران
● **فرشاد خادمی**، دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی
● **سیداحمد میرهادی**، عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات دامپروری

مقدمه

پنیر از جمله با ارزشترین منابع غذایی حاوی پروتئین وکلسیم است که دارای اسیدهای آمینه ضروری بوده و به دلیل تغییراتی تحولاتی که در طی دورهٔ رسیدن[1] در پروتئین‌های پنیر بوجود می‌آید، هضم آن نسبت به پروتئین‌های گوشت ساده‌تر است. این مادهٔ غذایی، نسبت مطلوبی از کلسیم به فسفر را داراست و واجد میزان قابل توجه‌ای ویتامینهای A، D می‌باشد (۱، ۲).

بدون تردید برای تولید پنیر، علاوه بر افزودن میکروارگانیسمهای آغازگر[2] (تلقیح میکروبی)، افزودن موادی که پروتئین شیر را لخته کنند نیز مورد نیاز می‌باشد. این مواد می‌توانند آنزیمهای لخته کننده شیر، باکتریهای تولید کنندهٔ اسیدلاکتیک و یا حتی اسید و مواد اسیدزا باشند که در این بین مطلوب‌ترین پنیر از انعقاد آنزیمی به دست می‌آید، چراکه از یک طرف به پنیر تهیه شده با مایه پنیر می‌توان طعم‌های گوناگون داد و از طرف دیگر این پنیر در مقایسه با پنیرهای تهیه شده به طرق دیگر نسبت بالائی از کلسیم را داراست (۲ و ۳).

درانعقاد آنزیمی یک شبکه جدید پروتئینی به نام ژل، لخته[3] یا دلمه[4] تشکیل می‌گردد (۳ و ۱۲). تا اوایل دهۀ ۱۹۷۰ این آنزیمها تنها از طریق عصاره‌گیری از معدهٔ چهارم (شیردان) یا همان معده اصلی گوساله شیرخوار ۳۰-۱۰ روزه بدست می‌آمد. این عصاره اصطلاحاً رنت[5] و فرم خالص آنزیم موثر در این عصاره، رنین[6]، کیموزین[7] یا پرزور[8] نامیده‌می‌شود(۱، ۷، ۳ و ۴).

بر طبق تصویب کمیتهٔ آنزیمی، رنین با شماره E.C ۳.۴.۲۳.۴ یک آسپارتیک پروتئیناز می‌باشد که خود درگروه هیدرولازها قرار می‌گیرد (۱۱ و ۹).

این دسته از پروتئینازها قادرند پروتئین شیر را به طور مطلوب لخته کنند و بصورت کاملاً اختصاصی پیوندهای پپتیدی بین اسیدهای آمینهٔ متیونین ۱۰۶ و فنیل آلانین ۱۰۵ در زنجیرهٔ کاپاکازئین را بشکنند پروتئین شیر را به طور مطلوب لخته کنند.

مدتهاست که تولید مایه پنیر سنتی در سطح بین‌المللی مواجه با مشکلاتی شده‌است و از مهمترین دلایل آن بالا رفتن مصرف جهانی گوشت و عدم تمایل به ذبح گوساله‌های شیرخوار برای تهیه مایه پنیر، بالا رفتن تولید جهانی شیر و مصرف پنیر، مقبولیت بیشتر پنیرهای تولید شده با مایه پنیر (پنیرهائی با درصد مادهٔ خشک متوسط)، مصرف بیشتر مایه پنیر به ازاء هر کیلوگرم پنیر برای تسریع رساندن پنیر (۱، ۲، ۸ و ۱۷). به دلائل ذکر شده و حتی پیش از ظاهرشدن بحران کمبود مایه پنیر، یعنی از اوایل قرن حاضر تحقیقات در زمینهٔ یافتن جایگزین‌های مناسب آغاز شد که چند دههٔ اخیر این تحقیقات توسعهٔ بسیاری یافته است.

البته آنزیمهای زیادی قادر به پروتئولیزکازئین کاپا و در نتیجه تولید لخته می‌باشند، اما به دلایل زیادی نمی‌توان هر آنزیمی راکه چنین خاصیتی را داشته باشد، در تولید پنیر بکار برد. یک جایگزین مناسب باید دارای صفات و مشخصات زیر باشد:

فعالیت اختصاصی و عمومی پروتئولیتیک آن مشابه این فعالیت در مایه پنیر استخراج شده از معدهٔ پستانداران باشد، فاقد عطر و رنگ نامطلوب باشد و در نتیجه خواص ارگانولپتیکی (طعم) پنیر را تغییر ندهد، در شرایطی مشابه شرایط عمل انعقادی مایه پنیر همچون غلظت یون کلسیم، pH، حرارت و غیره شیر را منعقد کند، قابلیت نگهداری به مدت مناسب را داشته باشد، فاقد آلودگیهای میکروبی نامطلوب باشد، سمی نبوده و محصول پروتئولیز آن نیز سمیت نداشته باشد، فعالیت آنتی بیوتیکی مضر در جهت متوقف کردن رشد باکتریهای لاکتیکی نداشته باشد، تولید و تهیهٔ آن به هزینهٔ کمی نیاز داشته و محدودیت عملی نداشته باشد (۲، ۱۷ و ۱۸).

در ابتدا پژوهشهای گسترده‌ای بر روی جایگزین‌های گیاهی از منابعی نظیر کاریکاپاپایا[9]، فیکوس کاریکا[10]، ویتانیاکوآگولانس[11]، آناناس و جایگزین‌های حیوانی چون پپسین گاو، پپسین خوک، پپسین طیور به عمل آمد. اما، بعداً به دلیل برتری جایگزین‌های میکروبی، تقریباً تمامی تحقیقات مذکور، متوجه میکروارگانیسم‌ها گشت و در این جهت باکتریها و قارچهای میکروسکوپی متعددی توسط پژوهشگران از گوشه و کنار جهان معرفی شدند. در نهایت مشخص گردید در این بین سه گونه میکروبی متعلق به قارچها شامل:

دو گونه کپک به نامهای *Mucor miehei* و *Mucor pusillus*, که از خاک جدا شده بودند و یک گونه مخمر با نام *Endothia parasitica* که پارازیت درخت بلوط می‌باشد، برای تولید صنعتی آنزیمهای جانشین رنین از هر لحاظ مناسب‌تر می‌باشند (۱۲، ۱۴، ۱۷ و ۱۸).

اکنون آنزیمهای منعقد کنندهٔ تهیه شده از گونه‌های مذکور بویژه *M. miehei* تقریباً تمامی رنت‌های میکروبی تجاری را در بازار جهانی تشکیل می‌دهند. این فرآورده‌های میکروبی تحت نامهای تجاری گوناگون از قبیل: فروماز[12]، میتوام‌آر[13]، نوری رنت[14]، رنیلاز، مارزیم[15]، سوپارن[16]، سورکرد[17] و سایر عناوین به فروش می‌رسند (۱۷، ۱۸ و ۲۰).

به طور کلی برای تولید میکروبی آنزیمها از سه سیستم فرمانتاسیون متفاوت بهره گرفته می‌شود که این سه عبارتند از: فرمانتاسیون بر روی سوبسترای جامد[18] (SSF)، فرمانتاسیون روی سطح مایع[19] (LSF) و فرمانتاسیون غوطه‌ور[20] (SF) (۱۱).

در زمینهٔ تولید آنزیمهای جانشین رنین بوسیله کپک مذکور و از میان سیستمهای یاد شده دو سیستم سوبسترای جامد و کشت غوطه‌ور، به دلیل راندمان بالای تولید، مورد توجه قرار گرفته‌اند.

فرمانتاسیون غوطه‌ور اصطلاحاً به فرایندهای تخمیری گفته می‌شود که در آن محیط کشت به صورت محیطی‌مائی وجود داشته باشد و بنابراین پایه اصلی سیستم را آب تشکیل می‌دهد. این سیستم برای تولید بسیاری از متابولیتها مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به هوازی بودن قارچها، ضرورتاً فرمانتاسیون غوطه‌ور مورد استفاده برای تولید آنزیمهای جانشین رنین نیاز به هوادهی داشته و برای انجام این عمل نیاز به بکارگیری گرمخانه‌های شیکردار و یا فرمانتورهای

واجدپمپ هوا و همزن می‌باشد.

بر خلاف سیستم غوطه‌ور، در تخمیر بستر جامد،مواد غذائی به صورت سوسپانسیون در نیامده و یک سوبسترای آزاد و محلول وجود ندارد. اصطلاح تخمیر بر بستر جامد یا سیستم کشت سطحی، اول‌بار برای غنی‌سازی باقیماندهٔ محصولات با ارزش کشاورزی و بالا بردن قابلیت هضم آنها بکار برده شد. سیستم کشت سطحی به دلیل عدم نیاز به تکنولوژی پیشرفته، پائین بودن نسبت حجم راکتور به میزان محصول، غلظت بالای محصول در محیط فرمانتاسیون و در نتیجه کاهش چشمگیر هزینه‌های تغلیظ محصول سبب گردیده است تا این سیستم در زمینهٔ تولید صنعتی بسیاری از آنزیمهای خارج سلولی، پروتئین تک سلولی، بسیاری از مواد غذائی تخمیری، اسیدهای آلی، توکسینها وبرخی مواد شیمیائی صنعتی دیگر موردتوجه قرار گیرد. با این روش آنزیمهائی چون سلولاز، آمیلوگلیکوزیداز، اینورتاز، لاکتاز، پکتیناز، و پروتئازهای قارچی چون پروتئازهای جانشین رنین را می‌توان بیوسنتز نمود. نیاز کم فرمانتورهای بکار رفته در سیستم S.S.F به انرژی در مقایسه با راکتورهای استوانه‌ای همزن دار و نیاز به تجهیزات ساده و ارزان در سطح صنعتی سبب گردیده است تا سیستم S.S.F نه تنها برای کشورهای در حال توسعه بلکه برای کشورهای صنعتی نیز از پتانسیل و اهمیت اقتصادی بالائی برخوردار گردد (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۷ و ۱۹).

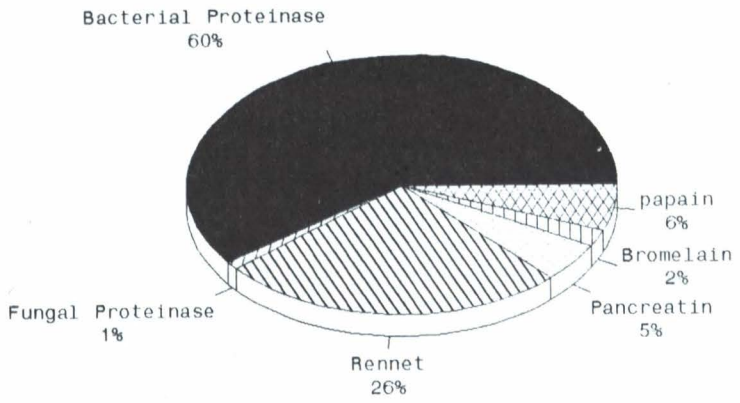
در فرآیندهای بیوتکنولوژی مواد خام طبیعی (و نه مواد خالص و تجاری) و بویژه مواد زائد قابل بازیابی[۲۱] به عنوان سوبسترای فرمانتاسیون مورد استفاده قرار می‌گیرند. در اغلب موارد این مواد پس آبهای کارخانجات صنعتی، بقایای مواد زائد کشاورزی مانند قند، نشاسته، سلولز، همی سلولز، لیگنین، ملاس چغندر قند، ملاس نیشکر، سبوس و آردگندم، برنج، جو، عصاره مخمر، پودر سویا و کنجالهٔ پنبه، ژلاتین پس مانده و غیره می‌باشد، در این بین سبوس گندم به عنوان یک محیط مطلوب در تولید صنعتی بسیاری از آنزیمها مورد توجه بوده است. سبوس گندم دارای ۶۹٪ کربوئیدرات، ۱۵٪ پروتئین و املاح فسفر، کلسیم، آهن، پتاسیم، سدیم، منیزم، مس، روی، منگنز، گوگرد، کلر، لیپید و انواع ویتامینها بوده و برای تولید، بویژه آنزیمهای قارچی بسیار مناسب و اقتصادی است (۵).

در سالهای اخیر، آنزیمهای رنت سهم قابل توجهی از فروش پروتئینازهای گوناگون صنعتی از قبیل پروتئازهای مورد استفاده در صنایع چرم‌سازی و نانوایی را داشته‌اند که از این میان رنت‌های میکروبی درصد بالائی را به خود اختصاص داده‌اند (نمودار دایره‌ای).

در حال حاضر صددرصد نیاز صنایع پنیرسازی کشور به مایع پنیر، از طریق واردات آنزیمهای جانشین رنین تولید شده توسط منابع قارچی (کپکها) و تحت نام مایه پنیر قارچی تأمین شده و سالیانه مقادیر زیادی ارز صرف خرید این آنزیم گردیده است.

در این مقاله نتایج تولید رنت قارچی را با بکارگیری *Mucor miehei* و در سیستم فرمانتاسیون بستر جامد که برای اولین بار در کشور انجام شده است، ارائه می‌گردد. به امید آنکه این نتایج بتواند راهگشای تولید این آنزیم در حد وسیع در کشور باشد.

نمودار سهمی پروتئینازهای صنعتی، میزان هر پروتئیناز و درصد آنها از کل مشخص‌شده است (Hepner, Male ۱۹۸۶)



مواد و روشها

میکروارگانیسم

در این بررسی کپک *Mucor miehei* تهیه شده از بانک میکروبی DSM آلمان به شماره ۱۳۳۰ استفاده شد. کشتهای این میکروارگانیسم بر روی محیط پوتیتودکستروز آگار پس از یک دوره گرمخانه گذاری به مدت ۱۰ روز، در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شد و برای فعال باقی ماندن آن هر ماه به محیط تازه منتقل گردید.

محیط کشت

شش نوع محیط جامد و کمپلکس برای مطالعهٔ تولید آنزیمهای جانشین رنین بررسی شدند، سبوس گندم به عنوان منبع کربن اصلی و محیط پایه در تمامی این محیطها، انتخاب شده و چند ترکیب کمپلکس به عنوان مکمل و به میزان ۱۰٪ به آن اضافه گردیدند.

۱- آردگندم ۲- آرد سورگوم ۳- آرد بادام زمینی ۴- پودر مغز نارگیل ۵- آرد برنج ۶- بدون هیچ گونه افزودنی.

میزان رطوبت محیط کشت ۴۰٪، دمای گرماگذاری $35^{\circ}C$ و زمان گرماگذاری ۱۸۰ ساعت انتخاب شد.

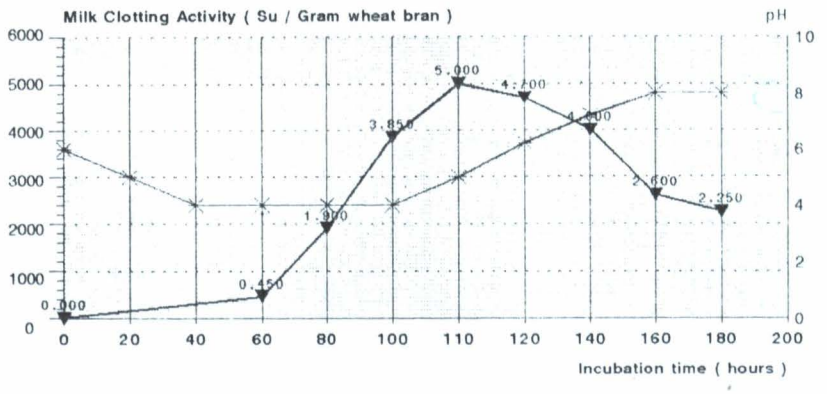
تلقیح محیط کشت

کشتهای کپک موکور به مدت ۱۰ روز بر روی پوتیتودکستروز آگار نگهداری شدند و برای تلقیح محیط جامد، سبوس گندم، بکار برده شدند. غلظت معینی از سوسپانسیون اسپوری پس از شمارش با لام نئوبار پیشرفته تهیه شد و برای تلقیح سبوس استفاده گردید.

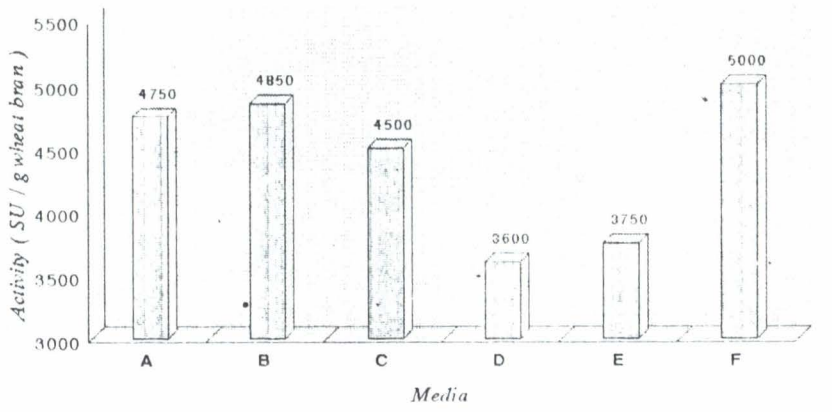
منبع آنزیم

فلاسکهای حاوی محیط کشت پس از تلقیح با

شکل شماره ۱- آنزیم لخته کنندهٔ شیر که بوسیله *M. Miehei* با بکارگیری سیستم فرمانتاسیون جامد تولید شده است. واحد: SU Soxhlet



شکل شماره ۲- تولید آنزیم لخته کننده شیر در محیطهای متفاوت. A: آرد گندم B: آرد سورگوم C: آرد بادام زمینی D: آرد مغز نارگیل E: آرد برنج F: بدون هیچگونه افزودنی واحد سوکسله = SU



سوسپانسیونی از اسپور در گرمخانه‌ای با شرایط فوق قرار داده شدند. پس از گذشت ۱۸۰ ساعت گرماگذاری، با خروج محیطهای کشت از گرمخانه و افزودن آب مقطر با دمای $4^{\circ}C$ فرمانتاسیون متوقف شد و بدنبال آن عصارهٔ آنزیمی با بکارگیری فیلتر کاغذی واتمن شمارهٔ ۱ و تفکیک سبوس از محلول آنزیمی، شفاف گردید. این محلول آنزیمی تا زمان تعیین فعالیت آنزیمی و انجام کار تست‌ها در دمای $2^{\circ}C$ نگهداری شد.

تعیین فعالیت آنزیمی

قدرت لخته کنندگی

قدرت لخته کنندگی آنزیم بر طبق روش Arima (۱۹۷۲) مورد ارزیابی قرار گرفت و با واحد سوکسله[۲۲] (Su) بیان گردید. بر حسب تعریف، یک سوکسله به میزان آنزیمی گفته می‌شود که قادر است ۱ml از سوسپانسیون حاوی ۱/۰٪ پودر شیر بدون چربی[۲۳] و ۰/۱m کلرید کلسیم را در دمای $35^{\circ}C$ و در مدت ۴۰ دقیقه، لخته کند. برای تعیین قدرت لخته کنندگی، ۱ حجم آنزیم به ۱۰ حجم سوسپانسیون شیر خشک با شرایط مذکور افزوده شد و زمان ایجاد لخته در دمای $35^{\circ}C$ ثبت گردید. سپس از فرمول زیر برای تعیین فعالیت آنزیمی استفاده شد:

$$U = \frac{M\ (ml)}{E\ (ml)} \times \frac{35^{\circ}C}{t(^{\circ}C)} \times \frac{2400}{T\ (sec)}$$

که در این فرمول:

U= قدرت لخته کنندگی آنزیم بر حسب واحد سوکسله

M= حجم شیر

E= حجم آنزیم

t= دمای واکنش آنزیم - سوبسترا

T= زمان لازم برای تشکیل لخته

فعالیت پروتئازی

فعالیت پروتئازی آنزیم را با روش‌های گوناگون Bailey (۱۹۸۸)، Anson (۱۹۳۸)، Kunitz (۱۹۴۷) به ترتیب با استفاده از سوبستراهای پودر شیر چرخ‌کرده، هموگلوبین و Casein Hamarstein می‌توان ارزیابی کرد که در این تحقیق روش Kunitz و با استفادهٔ توأم از کازئین و هموگلوبین مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین میزان پروتئین

غلظت پروتئین موجود در فرآوردهٔ آنزیمی با بکارگیری معرف Folin Ciocalteus به روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) تعیین شد.

بحث و نتیجه‌گیری

برای تعیین زمان حصول حداکثر فعالیت لخته کنندگی، ۲۸ فلاسک حاوی محیط کشت پایه (سبوس گندم با شرایط متعارف) تهیه گردید و پس از تلقیح، چهار فلاسک برای تعیین قدرت لخته کنندگی در زمان صفر استفاده شد و بیست و چهار ارلن باقیمانده در گرمخانهٔ $35^{\circ}C$، قرار داده شدند.

سپس به ترتیب در فواصل زمانی ۲۰ ساعت، چهار فلاسک از گرمخانه خارج شده و پس از استخراج، آنزیم تولیدی تعیین فعالیت گردید، این کار تا ساعت ۱۸۰ از شروع گرماگذاری ادامه یافت. بیشترین میزان تولید پس از ۱۱۰ ساعت به دست آمد (شکل ۱).

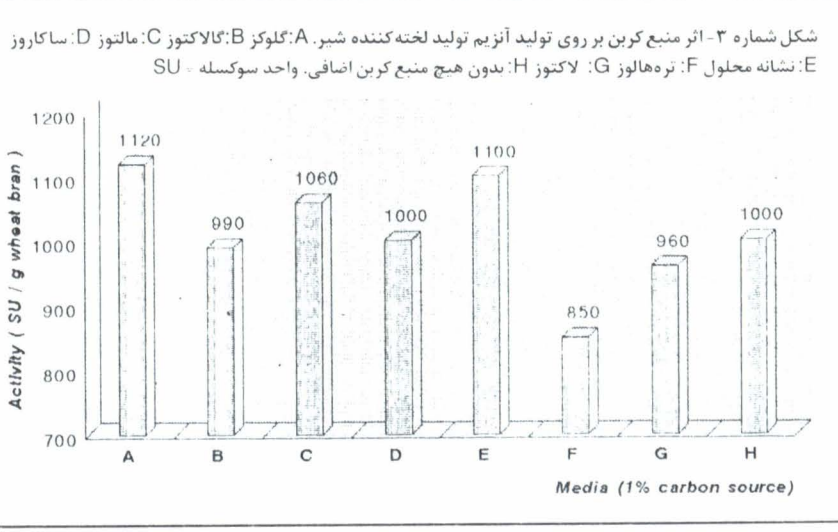
پس از مشخص شدن زمان حصول حداکثر فعالیت آنزیمی و از میان محیطهای کشت غنی شده با منابع کمپلکس کربن گوناگون مانند آرد سورگوم، آرد بادام زمینی، پودر مغز نارگیل، آرد برنج، محیط کشت سبوس گندم (بدون هیچ گونه افزودنی)، مناسب‌ترین محیط کشت کمپلکس پایه تشخیص داده شد (شکل ۲).

آنزیم تولیدی در این محیط نسبت به سایر محیطهائی که به میزان ۱۰٪ با منابع کمپلکس کربن غنی‌سازی شدند، به میزان قابل توجهی بالاتر بود.

یکی از عوامل مهم برای رشد میکروارگانیسم و تولید آنزیم، منبع ازت محیط کشت و قابل دسترس بودن آن برای میکروارگانیسم می‌باشد. از بین منابع آلی ازت، آلبومین، ژلاتین، کازئین، عصارهٔ مخمر، پپتون و پودر شیر بدون چربی و از بین منابع معدنی ازت، اوره، نیترات سدیم و سولفات آمونیم انتخاب گردیدند و اثر این منابع به میزان ۱٪ برای منابع آلی و ۰/۵٪ برای منابع معدنی ازت بررسی گردید (شکل ۴).

میزان تولید آنزیم در محیط حاوی منابع معدنی ازت، پائینتر از شاهد بود ولی منابع آلی افزایش نسبی تولید آنزیم را سبب گردیدند. بیشترین افزایش در محیط حاوی کازئین ۶۶۵۰ SU/gr sub و سپس عصارهٔ مخمر با قدرت ۶۲۵۰ SU/gr sub به دست آمد. براساس این نتایج کازئین و عصارهٔ مخمر به عنوان مطلوب‌ترین منابع ازت شناخته شدند. سپس برای تعیین اثر غلظتهای گوناگون این منابع محیطهای کشت با درصدهای متفاوت (۱۰-۰/۲۵٪) از منابع مذکور تهیه گردید. افزایش غلظت کازئین تا ۱/۵٪ افزایش تولید را سبب گردید و پس از آن تولید آنزیم به سرعت کاهش یافت (شکل ۵) به طوری که در غلظت ۱۰٪ فعالیت

شکل شماره ۳- اثر منبع کربن بر روی تولید آنزیم تولید لخته‌کننده شیر. A: گلوکز B: گالاکتوز C: مالتوز D: ساکاروز E: نشانه محلول F: تره‌هالوز G: لاکتوز H: بدون هیچ منبع کربن اضافی. واحد سوکسله = SU



آنزیمی به SU/gr sub ۴۲۰۰ رسید. با افزایش غلظت عصاره مخمر تا ۲٪ در محیط، فعالیت آنزیمی به مرور کاهش یافت و در محدوده ۵-۲٪ این فعالیت ثابت باقی‌ماند. در غلظت ۱۰٪ فعالیت آنزیمی تا مقدار SU/gr sub ۴۳۰۰ کاهش یافت.

در ادامه، اثر افزایش منبع کربن به محیط مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی ساکاروز، مالتوز، نشاسته محلول، لاکتوز، فرکتوز و تره‌هالوز به میزان ۱٪ به محیط کشت افزوده شدند. در این بین نشاسته محلول، گلوکز به میزان کمی تولید آنزیم را افزایش دادند (شکل ۳).

در ادامه بررسی اثر عوامل شیمیایی بر تولید آنزیم، اثر افزایش ماکروالمنتها در محیط مطالعه شد. در این بررسی املاح معدنی سولفات منیزیم، سولفات آهن، سولفات مس و سولفات روی در غلظتهای mg/l ۰/۰۰۱ - ۱۰۰ برای شناسائی تأثیر یونهای Fe^{2+}، Zn^{2+}، Mn^{2+} و Cu^{2+} بر تولید و فعالیت آنزیمی، انتخاب شدند.

این ترکیبات به طور مجزا و یا همراه با یکدیگر به محیط افزوده شدند. تمامی نتایج به دست آمده، برای رقت‌های گوناگون در محدوده شاهد بود و در نتیجه افزودن این فلزات به محیط سبوس، هیچگونه اثری در افزایش تولید آنزیم نداشت که احتمالاً به دلیل وجود مقادیر کافی از عناصر فوق در سبوس می‌باشد.

یکی از مؤثرترین عوامل در کلیهٔ سیستمهای فرمانتاسیون و تولید آنزیم، دمای گرماگذاری میکروارگانیسم می‌باشد. در این راستا، فلاسکهای تلقیح شده در دماهای گوناگون، گرماگذاری شدند و تولید آنزیم برای هر نمونه اندازه‌گیری شد (شکل ۶).

در این کار تأثیر دامنهٔ دمای $^{\circ}C$ ۵۷-۲۵ بر تولید آنزیم محاسبه گردید. با توجه به گرمادوست بودن میکروارگانیسم مورد بررسی (۱۰ و ۱۹)، رشد آنها و متعاقب آن تولید آنزیم با بالا رفتن دما از $^{\circ}C$ ۲۵ به $^{\circ}C$ ۴۰ تا سطح SU/gr sub ۶۵۰۰ افزایش یافت و سپس با یک کاهش سریع در دمای $^{\circ}C$ ۵۲ به صفر رسید.

از دیگر عوامل موثر بر تولید آنزیم که ویژهٔ سیستم S.S.F بوده و در سایر سیستم‌های فرمانتاسیون فاقد اهمیت است، درصد رطوبت محیط کشت می‌باشد. بنابراین محیط‌هائی با رطوبت‌های گوناگون در دامنه رطوبتی ۸۰-۳۰٪ آماده شد و همانطوری که در شکل (۷) مشاهده می‌گردد، بالاترین میزان تولید به محیطی با رطوبت ۵۰٪ (SU ۷۰۰۰) تعلق داشت.

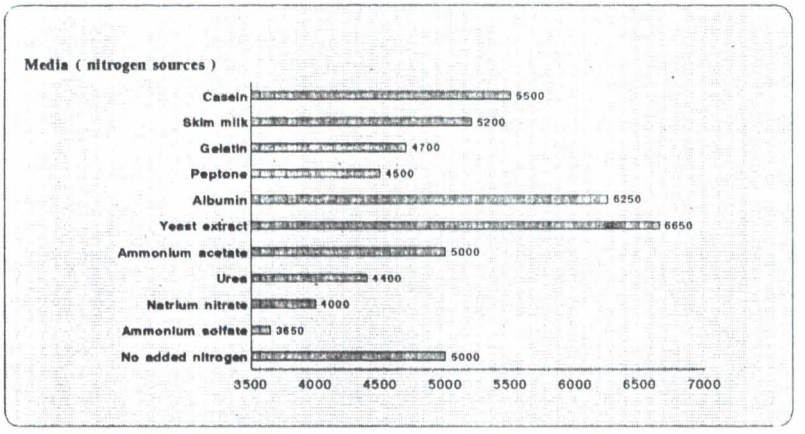
حجم تلقیح نیز به عنوان یکی از عوامل فیزیکی موثر بر تولید آنزیم، مورد بررسی قرار گرفت. در این قسمت غلظت‌های گوناگون سوسپانسیون اسپوری در دامنهٔ $۱۰^{۵} \times ۵ - ۱۰^{۲}$ اسپور به ازای هر گرم سبوس گندم تهیه گردید و به محیطهای کشت افزوده شد.

بالاترین میزان فعالیت در این بخش یعنی SU/gr sub ۶۰۵۰ از غلظت اسپوری $۱۰^{۳}$ اسپور به ازای هر گرم سبوس حاصل شد.

براساس نتایجی که در بالا آورده شد، شرایط بهینه برای تولید بالاترین میزان آنزیم به ازای هر گرم محیط کشت را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد:

محیط سبوس گندم، دمای $^{\circ}C$ ۴۰، رطوبت محیط ۵۰٪، زمان گرماگذاری ۱۱۰ ساعت، حجم تلقیح $۱۰^{۳}$ اسپور به ازای هر گرم سبوس گندم، کازئین به میزان ۱/۵٪، در چنین شرایطی محصولی با فعالیت

شکل شماره ۴- اثر منبع نیتروژن بر تولید آنزیم لخته کننده شیر. ازت آلی و غیر آلی که به میزان (W/W) ۱٪ و (W/W) ۰/۵٪ اضافه شدند. واحد سوکسله: SU



SU/gr sub wheat bran ۸۴۰۰ به دست آمد. از آنجائی که مقایسهٔ قدرت لخته کنندگی و سایر خصوصیات این محصول آنزیمی به دلیل عدم خالص‌سازی و تغلیظ آنزیم با فرآورده‌های تجاری رنت میکروبی، امکان پذیر نبود، در نتیجه محلول آنزیمی پس از یک خالص‌سازی نسبی و تغلیظ با غلظتهای مشخص سولفات آمونیوم به صورت پودر از نظر خصوصیاتی چون فعالیت ویژهٔ آنزیمی، قدرت پروتئولیز، فعالیت لیپولیتیک، تأثیر غلظت Ca^{2+} بر فعالیت آنزیمی، دما و pH اپیتیم فعالیت، پایداری حرارتی، مقاومت به pH، Km و V_{max}، آزمایش آلودی میکروبی و آفلاتوکسین و چند خصوصیت دیگر مورد بررسی قرار گرفت.

در یک مقایسه اجمالی بین نتایج منتشر شده در زمینه تولید آنزیمهای لخته‌کننده شیر تحت دو سیستم کشت غوطه‌ور و کشت سطحی، برتری سیستم فرمانتاسیون جامد در زمینهٔ تولید رنت میکروبی با استفاده از کپکها دیده می‌شود. Karath, Thakur (۱۹۹۱) بر برتری قدرت لخته‌کنندگی رنت حاصل از سیستم SSF بر رنت حاصل از سیستم SF با بکارگیری چندین کپک گوناگون تأکید کرده‌است.

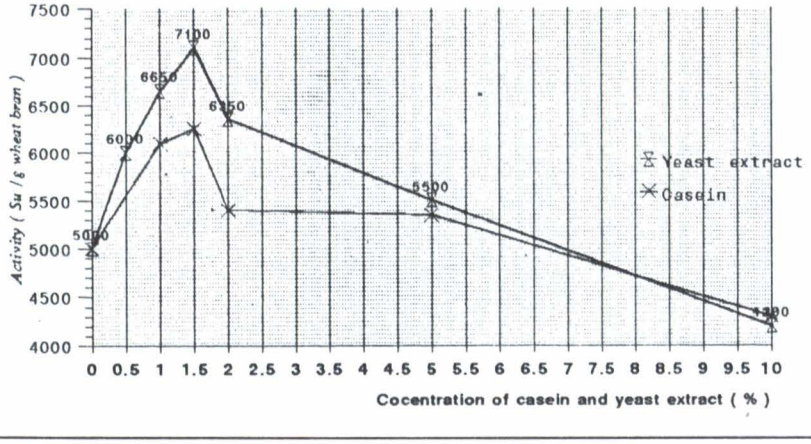
Pozsar - Hajnal (۱۹۷۴) نیز قدرت پرتولیتیک کمتر رنت حاصل از *M. pusillus* در سیستم SSF نسبت به SF و در نتیجه مطلوبیت آن برای صنایع پنیرسازی را گزارش داده است.

نتایج بدست آمده از این بررسی نیز مشخص نمود که این محصول می‌تواند در جایگاه نسبتاً مناسبی در بین فرآورده‌های تجاری قرار داشته باشد و همچنین اینکه سیستم SSF با توجه به ارزان و ساده بودن آن و کیفیت مناسب محصول رنت قارچی حاصله، می‌توانند یک سیستم مطلوب برای تولید صنعتی این آنزیم باشد.

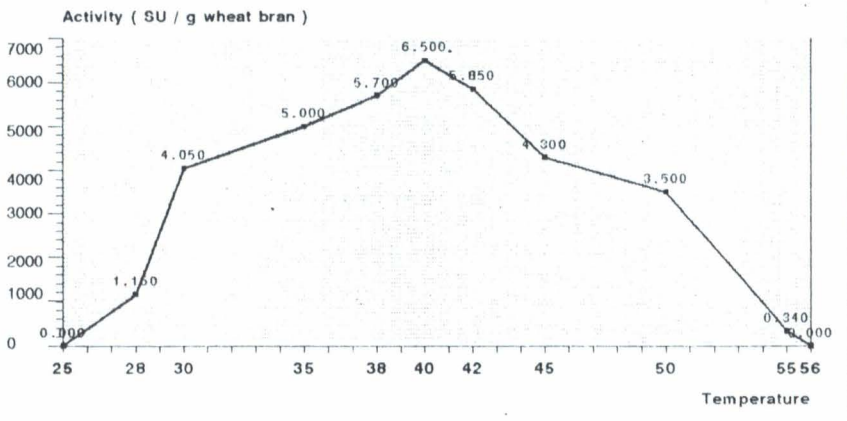
سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات و مساعدتهای آقایان دکتر

شکل شماره ۵- اثر غلظت کازئین و عصاره مخمر بر روی تولید آنزیم لخته‌کننده شیر. واحد سوکسله = SU



شکل شماره ۶- اثر درجه حرارت بر روی تولید آنزیم لخته کننده شیر. واحد سوکسله: SU



علامه، ریاست محترم و مهندس فضائلی، معاونت محترم پژوهشی مؤسسهٔ تحقیقات دامپروری کشور، تشکر و سپاسگزاری می‌گردد. هزینهٔ مربوط به این پروژه توسط مؤسسه تحقیقات دامپروری کشور تأمین گردیده است که بدینوسیله قدردانی می‌شود.

پاورقی‌ها

1- Ripening 2- Starter cultes 3- Curd 4- Clot 5- Rennet 6- Rennin 7- Chymosin 8- Presure 9- *Carica papaya* 10- *Ficus carica* 11- Withania cocagulans 12- Fromase 13- Meito MR 14- Noury rennet 15- Marzyme 16- Suparen 17- Sure curd 18- Solid state (Substrate) fermentation 19- Liquid surface fermentation 20- Submerged fermentation 21- By-products 22- Soxhlet unit 23- Skim milk powder

منابع مورد استفاده

۱- احسانی، محمدرضا. ۱۳۶۸. مکانیزمها و عوامل موثر در انعقاد شیر، وزارت کشاورزی، ۱۲۳ ص.

۲- احسانی، محمدرضا، حسن لامع، محمد رجائی، ۱۳۶۶. جایگزین‌های مایه پنیر و اختصاصات آنها. کنگره ملی مواد غذائی دانشگاه تهران. دانشکده فنی. ۲۳-۱۱.

۳- آذرنیا، ثریا، ۱۳۷۳. بررسی تحولات پرتئولیتیک رسیدن پنیر، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذائی، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی.

۴- رجائی، محمد، تهیه مایه پنیر از پیش معده طیور. نشریه پژوهشی. شماره ۶۱، مؤسسه تحقیقات دامپروری.

۵- معظمی، نسرین، عباس شجاع الساداتی، ۱۳۶۹، مقدمه‌ای بر بیوتکنولوژی، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس. ۱۰۳ ص.

6- Arima, K. J. Yu & S. Iwasari 1970, Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. Methods in enzymolgy, Vol XIX eds, G. E. Perlman and L. Lorand academic press, New York. 446-390.

7- Banrs, W. & D.G Dalgleish, 1990. Dairy microbiology. Elsevier Applied science London, UK, Vol. 1, 324-390.

8- Bigelis R. 1991. Fungal enzymes in food processing. Hand book of Apllied Mycology. Arora D.K,. Marcel Dekker, INC, Vol. 3. 322-370.

9- Dixon, M. and Edwin C. webb, Christopher J.R. Thorne. 1979, Enzymes. Third edition longman Group, ltd. 529-550.

10- Escubar J. and S., M. Barnett. 1993. Effect of agitation speed on the synthesis of *Mucor miehei* Acid protease. Enzyme Microb. Teclmol. Vol. 15. 1009.

11- Hesseltine, cw. 1989. Solid state fermentation. international biodeterioration, 23 (2) 79-89.

12- H. Outrup and C.O.L. Boyce 1990. Microbial proteinases and biotechnology. Elsevier Science publishing Co- Inc. 886-915.

13- Ingraham, J. L. 1974. Species of thermophilic fungi. Thermophilic fungi, AVI publishing, Co. Westport, conneticat, U.S.A. P. 165-190.

14- Krishnas wamy M.A., K.S. Nagaraga. 1979. Production of fungal rennet substitue. Journal of food science and technology Vol. 13, July-August. 187-191.

15- Pozsar-Hajnal K. L. Vamos - Vigyazo & E. Hegedus - Volgyesi. 1974, Investigations into the production of milk clotting enzyme preparations. Acta Alimentaria, Vol. 3 - (1) 83-92.

16- Palo, N.D., Macrio A. Palo, Lawds f. Cunanam. 1979. Skim milk coagulation activities of enzymes produced by phycomycetous fungi. The philippine Journal of science. Vol 13. 189-151.

17- Sternberg, M. 1976. Microbial rennets, Adv. Appl. Microbiol. Vol 13, 39-81.

18- Sardinas, J.L. 1972; Microbial rennet, Adv. Appl. Microbiol. Vol 13, 39-81.

19- Thakur M.S., N.G. Karanth and Krishna nand. 1991; Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermantation. Appl. Microbial. Biotech. 32: 09-413.

20- Whitaker J. R. 1970. Protease of *Endothia parasitica*. Methods in Enzymonogy. Vol XIX. G.E. perlman and L.Lorand Academic press, New York. 439.

شکل شماره ۷- اثر سوبسترای مرطوب بر روی تولید آنزیم لخته کننده شیر. سوکسله: SU