أستخلاص وتنقية وتوصيف وربط ببسين الدجاج واستعماله في صناعة الجبن الابيض الطري

***زينة كاظم عيسى** **منير عبود جاسم**

قسم علوم الاغذية/كلية الزراعة-جامعة البصرة

المستخلص. هدفت الدراسة الحالية الى استخلاص انزيم الببسين EC:3.4.23.1 من بعض المصادر الحيوانية وتنقيته ودراسة بعض صفاته وربطه واستعماله في التطبيقات العملية في مجال الصناعات الغذائية ، استخلص الانزيم من معدة ثلاثة انواع من الحيوانات (الاغنام ، الدجاج ، سمك النويبي) باستعمال خمسة محاليل استخلاص تضمنت الماء المقطر، محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 10% ، محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 6 % الحاوي على 2 % حامض بوريك ، محلول فوسفات الصوديوم الدارىء بتركيز 0.1 مولاري ورقم هيدروجيني 7.3 ومحلول Tris-acetic acid بتركيز 0.4 مولاري برقم هيدروجيني 7.6 لغرض تحديد افضل مصدر للانزيم وافضل محلول استخلاص وقد وجد ان معدة الاغنام كانت افضل مصدر للحصول على الانزيم مقارنة بالمصادر الاخرى وان محلول كلوريد الصوديوم 6% الحاوي على 2% حامض البوريك هو افضل محلول استخلاص حيث اعطى اعلى فعالية نوعية للانزيم والتي بلغت 14.3 وحدة/ملغم .بعد ذلك ركز المحتوى البروتيني للمستخلصات الانزيمية الخام باستعمال كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع تراوحت بين 30-70% ، 20-90% ، 20-60% لببسين الاغنام والدجاج وسمك النويبي على التوالي وقد اعطى ببسين الدجاج المنقى جزئياً اعلى فعالية انزيمية مقارنة ببسين الاغنام وسمك النويبي .

اظهرت دراسة ربط ببسين الدجاج المنقى جزئياً باربعة انواع من المواد الرابطة تضمنت السليكاجل ،راتنج SRF، الجينات الكالسيوم والاكار ان افضل مادة ربط هي الاكار حيث اعطيت اعلى كفاءة ربط والتي بلغت 67%.كان افضل تركيز لربط ببسين الدجاج المنقى جزئياً بالاكار هو 3 % اذ اعطى اعلى فعالية انزيمية والتي بلغت 75% .بلغت الفعالية المتبقية لببسين الدجاج المنقى جزئياً المرتبط بالاكار 21% بعد استعماله 7 مرات ، وبلغت الفعالية المتبقية لببسين الدجاج المنقى جزئياً المرتبط بالاكار27.6% عند خزنه لفترة 60 يوم على درجة حرارة 4 م .

وجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التخثرية لببسين الدجاج المنقى جزئياً الحر والمرتبط هو 5.8 ووجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات ببسين الدجاج المنقى جزئياً الحر والمرتبط كان 3. كانت درجة الحرارة المثلى للفعالية التخثرية لببسين الدجاج المنقى جزئياً الحر والمرتبط هي 35 م ووجد ان درجة الحرارة المثلى لثبات ببسين الدجاج المنقى جزئياً الحر والمرتبط تتراوح بين 15-45 م وان ببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط فقد فعاليته بالكامل عند 85 م.

استعمل ببسين الدجاج المنقى جزئياً المرتبط بالاكار في صناعة الجبن الطري واظهرت النتائج ان تركيب الجبن المنتج ونتائج التقويم الحسي مقاربة للجبن المنتج باستعمال منفحة العجول، وهذا دليل على كفاءة الانزيم في صناعة الجبن الطري و امكانية احلاله محل منفحة العجول وامكانية استخدامه لاكثر من مرة في هذه الصناعة .

المقدمة.

البروتيزات هي الانزيمات التي تحفز التحلل المائي للاواصر الببتيدية فهي تقوم بتحليل البروتينات الببتيدات واحماض امينية وتعطى هذه الانزيمات رقم الشفرة EC:3.4 تبعاً للتصنيف النظامي للانزيمات . وتقسم البروتيزات الى قسمين تبعاً لفعلها التخصصي هما

*جزء من اطروحة دكتوراه

البروتيزات الداخلية Endoproteases و البروتيزات الخارجية Exoproteases . تحلل البروتيزات الداخلية الاواصر الببتيدية الموجودة داخل السلاسل الببتيدية ،اما البروتيزات الخارجية فتقوم بفصل الحامض الاميني الطرفي من السلسلة الببتيدية وهي على نوعين Carboxy Peptidases وهذه تعمل على الاصرة الببتيدية الموجودة في C-termin و Amino peptidases وهي تعمل على الاصرة الببتيدية الموجودة في N-terminal (26).

وتمثل البروتيزات مجموعة مهمة من الانزيمات المنتجة صناعياً وهي تشكل 60 % من الانزيمات الصناعية الكلية المسوقة في العالم (11) .

يعتبر الببسين (EC:3.4.23.1) من البروتيزات الحامضية ذات الفعالية العالية في البيئة الحامضية (6) ، وهو موجود في العصير المعدي بتركيز 400 ملغم/لتر وظيفته كسر البروتين الغذائي في المعدة ، اذ يفرز الببسين من خلايا الغشاء المخاطي المعدي بهيئة غير فعالة تعرف بالببسينوجين الذي يتحول الى ببسين بواسطة التحلل البروتيني (28).

ان تنقية الانزيمات عملية مكلفة جداً وان استعمالها يكون غير اقتصادي،لان الانزيم يستعمل مرة واحدة فقط ولا يمكن استعماله مرة اخرى (4). لذلك كرست العديد من الابحاث للحصول على طريقة يرتبط فيها الانزيم بمادة داعمة ، بحيث يكون من السهولة اضافته في العمليات التصنيعية المختلفة ومن ثم ازالته (13) كما ان استعمال الانزيم المرتبط يقدم فوائد اكثر من الانزيم الحر وذلك لامكانية استعماله بصورة مستمرة ، الانهاء السريع للتفاعل ، السيطرة على صناعة المنتوج وسهولة ازالة الانزيم من المنتوج النهائي(8).

هدفت الدراسة الى استغلال المخلفات الحيوانية (الاغنام ،الدجاج والاسماك) في استخلاص انزيم الببسين وتحديد افضل محلول لاستخلاصه و تنقيته وتوصيفه وربطه ودراسة تاثير بعض العوامل المختلفة على فعاليته التخثرية واستعماله في صناعة الجبن بدلا من الانزيمات التجارية باهضة الثمن.

المواد وطرائق العمل.

1-استخلاص الانزيم:استخلص أنزيم الببسين من معدة الأغنام ،الدجاج وسمك النويبي بأستعمال خمسة محاليل أستخلاص ثم تم اختيار المحلول الأمثل لأستخلاص الأنزيم على اساس الفعالية النوعية للأنزيم الناتجة من كل محلول استخلاص.محاليل الأستخلاص هي:1- ماء مقطر،2-محلول كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز10%حضر بأذابة100غم من كلوريد الصوديوم في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر(25). 3-محلول كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز6 % الذي يحتوي على 2 % من حامض البوريك Boric acid ،حضر بأذابة 60 غم من كلوريد الصوديوم و20 غم من حامض البوريك في كمية من الماء المقطر ثم ، اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر (19).4-محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.3،حضر بأذابة 5.453 غم من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين NaH_2PO_4 مع 9.709 غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na_2HPO_4 في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى7.3اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر (12). 5- محلول Tris_acetic acidبتركيز0.4 مولار ورقم هيدروجيني 7.6،حضر بأذابة 12.1 غم من Tris مع كمية من الماء المقطر ثم اضيف اليه 17.5 مل من حامض الخليك ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر(12).

*جزء من اطروحة دكتوراه

اتبعت طريقة (25) لأستخلاص أنزيم الببسين مع اجراء بعض التغييرات عليها، حيث أخذت المعدة الطازجة وأزيلت محتوياتها والأسطح الدهنية وغسلت بالماء البارد وحفظت بالتجميد لمدة 24 ساعة ثم فرمت ومزجت مع محلول الاستخلاص بنسبة2:1 (وزن:حجم) وجنست بخلاط كهربائي (blender) لمدة 10 دقائق ،بعدها وضع المستخلص بالمجمدة لمدة ساعتين ثم اجري له طرد مركزي g$_x$ 15,000 على درجة حرارة 4 م لمدة 15 دقيقة. أهمل الراسب وجمع الراشح وعدل الرقم الهيدروجيني له الى 1.8 بأستخدام محلول حامض الهيدروكلوريك HCl بتركيز 1مولار وترك لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة المختبر ثم اجري له طرد مركزي مرة اخرى وعدل الرقم الهيدروجيني له الى 5.5 بأستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز 1مولار.

قدرت الفعالية التحللية حسب طريقة(27)وقدرت الفعالية التخثرية حسب طريقة(7) ،واستعملت طريقة (15)في تقدير تركيز البروتين خلال مرحلة التنقية.

2- تنقية الانزيم: تم ترسيب الانزيم باستعمال كبريتات الامونيوم بنسبة تشبع 30-70% ثم اجريت عملية الطرد المركزي بسرعة g$_\times$1911.6 لمدة نصف ساعة بعدها اجريت عملية الديلزة للانزيم تجاه الماء المقطرلمدة24 ساعة مع تبديل الماء كل 12 ساعة.

3- توصيف الانزيم: ضبط الرقم الهيدروجيني لمحلول حليب الفرز المسترجع على الارقام الهيدروجينية التالية (5،5.5،6،6.5،7) بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك او محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 1مولاري ثم قدرت الفعالية التخثرية للانزيم ورسمت العلاقة بين الفعالية التخثرية للانزيم وقيم الارقام الهيدروجينية لتعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم التخثرية،كما عين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم بخلط حجم معين من الانزيم مع حجم مساوٍ له من المحاليل الدارئة بارقام هيدروجينية متدرجة من 1-9 وحضن بدرجة حرارة35 م لمدة نصف ساعة ثم نقل الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية التخثرية. تم تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم التخثرية وذلك بتقدير الفعالية في مدى من درجات الحرارة تراوح بين 15_85 م بفارق عشر درجات ورسمت العلاقة بين درجة الحرارة وفعالية الانزيم لتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم.كما تم تعيين الثبات الحراري بحضن حجم معين من الانزيم بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين 15-85 م بفارق عشر درجات لمدة 15 دقيقة ثم نقل الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية التخثرية ورسمت العلاقة بين درجات الحرارة المختلفة مقابل النسبة المئوية للفعالية المتبقية لتعيين درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم.

4- ربط الانزيم: رُبط انزيم الببسين المنقى جزئياً باستعمال طرائق مختلفة من الربط ثم درست كفاءة ربط الانزيم. تضمنت هذه الطرق1- ربط الانزيم بالادمصاص على السليكا جل تبعا للطريقة الموصوفة من قبل (17) 2- ربط الانزيم على الراتنج resinous بتقنيةCross_Linking تبعا للطريقة الموصوفةمن قبل (23)3- ربط الانزيم بتقنية الحجز بالجينات الكالسيوم باتباع الطريقة الموصوفة من قبل(21) 4- ربط الانزيم بتقنية الحجز بالاكار باتباع الطريقة الموصوفة من (24)واستعملت تراكيزمختلفة من الاكارمن 1 - 5% لمعرفة افضل تركيز لربط الانزيم.

5- قياس الفعالية المتبقية: قدرت الفعالية التحللية لكل من الانزيم الحر والمرتبط لكل طريقة ربط وذلك لمعرفة كفاءة الربط.

6- تصنيع الجبن الابيض الطري: صنع الجبن باتباع الطريقة التي ذكرها (3) واجريت للجبن المصنع التحليلات الكيميائية والتقويم الحسي وهي كالاتي:-أ- التحليلات الكيميائية :1-قدرت النسبة المئوية للبروتين في

*جزء من اطروحة دكتوراه

الحليب حسب طريقة الفورمالين التي ذكرها (14)اما في الجبن فقدرت حسب طريقة مايكروكلدال(5).2-قدرت النسبة المئوية للدهن في الحليب والجبن حسب طريقة كيربر(14).3-قدرت النسبة المئوية للرطوبة في الجبن حسب الطريقة التي ذكرها (14).4-قدر الرقم الهيدروجيني للحليب والجبن حسب الطريقة التي ذكرها (14) .5-قدرت الحموضة كحامض لاكتيك في الحليب حسب ماذكر في (5) اما في الجبن فحسب الطريقة التي ذكرها(10).

ب- التقييم الحسي : اجري التقييم الحسي لنماذج الجبن الطري من قبل 10 من المتخصصين في قسم علوم الاغذية – كلية الزراعة جامعة البصرة ، ومنحت الدرجات طبقاً للاستمارةالموصوفة من قبل (1)لتمييز الصفات المطلوبة في المنتوج .

النتائج والمناقشة.

استخلاص الانزيم :تشيرالنتائج الموضحة في الشكل (1) ان افضل محلول لاستخلاص انزيم الببسينمن معدة الاغنام هو محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 6% الحاوي على 2% حامض بوريك ، اذ انه اعطى اعلى فعالية نوعية والتي كانت 14.3 وحدة /ملغم مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى حيث تراوحت الفعالية النوعية فيها بين 8.04-13.49 وحدة/ملغم .

تبين النتائج في الشكل (2) ان محلول فوسفات الصوديوم الدارىء بتركيز0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.3 المحلول الافضل لاستخلاص انزيم الببسين من معدة الدجاج حيث اعطى فعالية نوعية مقدارها 13.79 وحدة /ملغم مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى التي تراوحت الفعالية النوعية فيها بين 10.34 – 12.73 وحدة /ملغم .

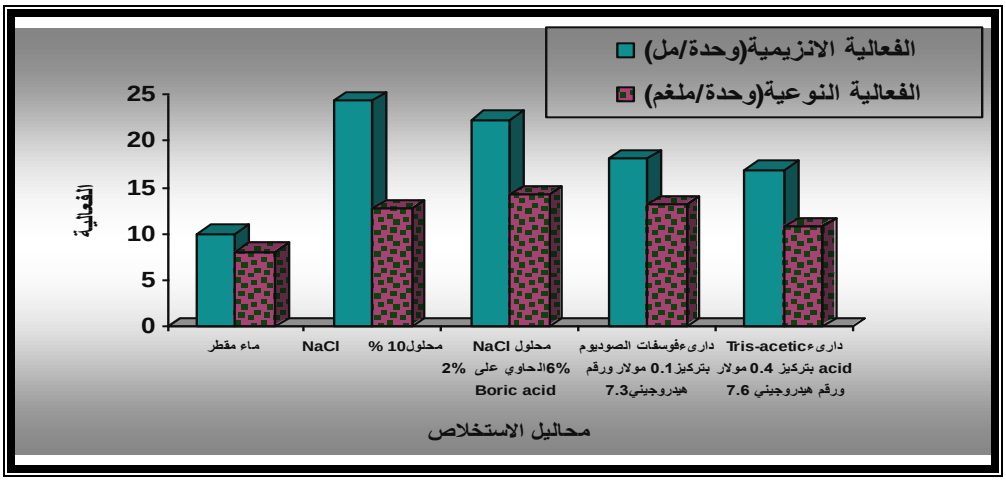
بينما اوضحت النتائج في الشكل (3) ان محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 6% الحاوي على 2% حامض بوريك هو افضل محلول لاستخلاص انزيم الببسين من معدة سمك النويبي حيث اعطى اعلى فعالية نوعية والتي بلغت 13.65 وحدة /ملغم مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى التي تراوحت الفعالية النوعية بين 10.29 _ 13.12 وحدة /ملغم .

نلاحظ من النتائج ان محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 10% اعطى اعلى فعالية انزيمية عند استعماله في استخلاص انزيم الببسين من معدة الاغنام ، الدجاج وسمك النويبي وفي الوقت نفسه اعطى زيادة في تركيز البروتين مما ادى الى انخفاض قيمة الفعالية النوعية لانزيم الببسين حيث ان وجود تركيز عالي من الملح في محلول الاستخلاص يؤدي الى زيادة في ذوبان اكبر كمية من البروتينات (2).

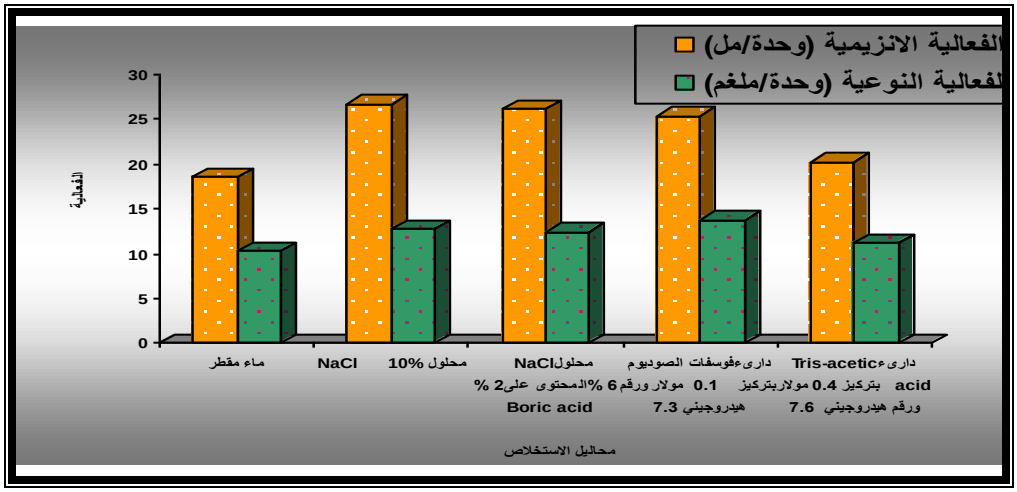
كما توضح النتائج انخفاض الفعالية الانزيمية والنوعية لانزيم الببسين المستخلص من معدة الاغنام ، الدجاج وسمك النويبي باستعمال الماء المقطر مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى حيث كانت الفعالية الانزيمية 10 ،18.6 ،19.2 وحدة /مل على التوالي والفعالية النوعية 8.04، 10.34، 10.29 وحدة /ملغم على التوالي . ان سبب هذا الانخفاض قد يعود الى عدم امتلاكه قوة ايونية تمكنه من فك ارتباط الانزيم من الانسجة كما انه لايمتلك سعة بفرية تمكنه من المحافظة على رقم هيدروجيني مناسب لثبات الانزيم.ان الاختلافات الموجودة في قيم الفعالية النوعية لمحاليل الاستخلاص يمكن ان تعزي الى اختلاف ذائبية البروتينات الموجودة في انسجة المعدة باختلاف محاليل الاستخلاص والتي تنعكس على تركيز البروتين وهذا بدوره يؤثر على الفعالية النوعية لانزيم الببسين .

تنقية انزيم الببسين**:**1-تركيز الانزيم: ركز انزيم الببسين باستخدام املاح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع متدرجة تراوحت بين 20-90 % ، وكانت افضل نسبة اشباع لتركيز ببسين الاغنام، ببسين الدجاج وببسين

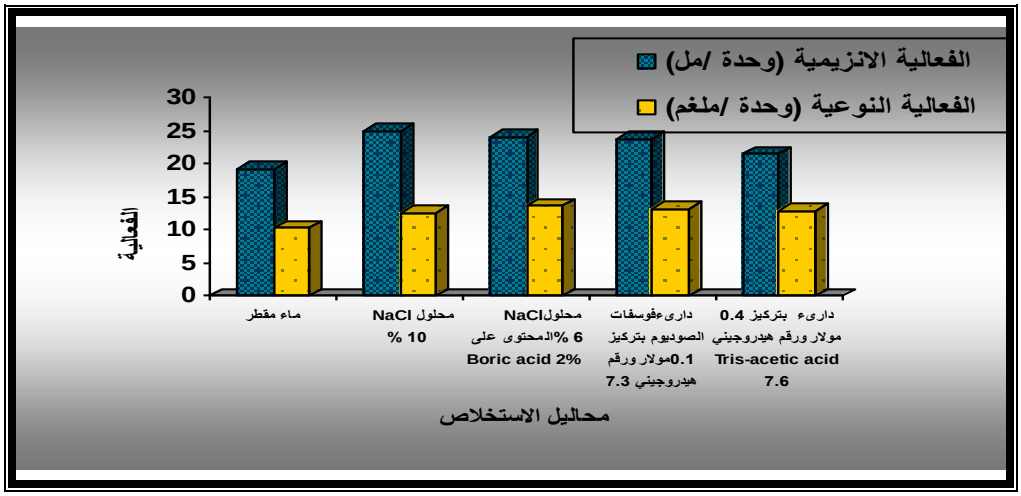
*جزء من اطروحة دكتوراه



شكل رقم (1) مقارنة بين محاليل استخلاص انزيم الببسين من معدة الاغنام



شكل رقم (2) مقارنة بين محاليل استخلاص انزيم الببسين من معدة الدجاج



شكل رقم (3) مقارنة بين محاليل استخلاص انزيم الببسين من معدة سمك النويبي

*جزء من اطروحة دكتوراه

سمك النويبي من 30-70%، 20-90% ، 20-60 % على التوالي ،حيث جمع الراسب الناتج من النبذ المركزي واذيب في قليل من الماء المقطر وتمت ديلزته تجاه الماء المقطر للتخلص من كبريتات الامونيوم ثم قيست الفعالية الانزيمية والنوعية لكل منها وكان مقدارها 54.2، 58.8 ، 56.3 وحدة / مل و 44.42 ،42 ،41.39 وحدة/ملغم على التوالي كما موضح في الشكل (4) .

يعتبر الانزيم الناتج من خطوات الترسيب بكبريتات الامونيوم منقى تنقية جزئية (Partially Purified) بسبب تداخل ذائبية مديات واسعة من بروتينات مختلفة (2).

نلاحظ من الشكل ان ببسين الدجاج المنقى جزئيا يمتلك فعالية انزيمية اعلى من ببسين الاغنام وسمك النويبي لذلك استعمل في عملية الربط .

ربط ببسين الدجاج المنقى جزئيا (المديلز): استعملت عدة طرق لربط الانزيم تضمنت ربط الانزيم بواسطة الحجز بالجينات الكالسيوم ، ربط الانزيم بالادمصاص على السليكاجل ، ربط الانزيم بالارتباطات المستعرضة Caross-linking باستخدام راتنج SRF وربط الانزيم بالحجز بالاكار.

كما تبين النتائج ان كفاءة ربط الانزيم بطريقة الحجز بالجينات الكالسيوم كانت اقل من طريقة الحجز بالاكار حيث بلغت 55 % وان كلا الطريقتين اعطتا كفاءة ربط تقع ضمن المدى الطبيعي الذي يتراوح بين 50-80 % (18) .

قيمت افضل طريقة لربط الانزيم عن طريق تقدير كفاءة ربط الانزيم وتبين النتائج الموضحة في الشكل (5) تفوق طريقة الحجز بالاكار في ربط ببسين الدجاج المنقى جزئيا مقارنة بالطرق الاخرى حيث اعطت هذه الطريقة اعلى كفاءة ربط للانزيم اذ بلغت 67% .

تشير النتائج ان كفاءة ربط الانزيم بطريقة Cross linking-باستخدام راتنج SRF كانت 43 % ،وان ربط الانزيم بطريقة الادمصاص على السليكا جل اعطى اقل كفاءة ربط مقارنة بالطرق الاخرى اذ بلغت15.7%.

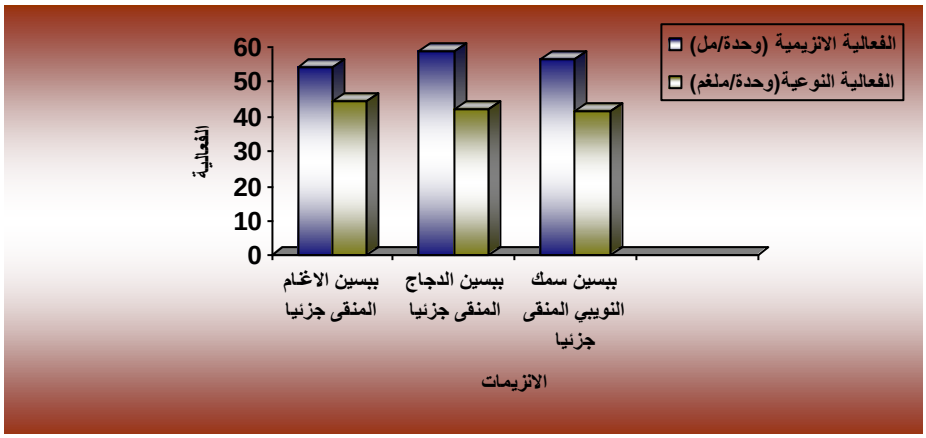
قد يعود سبب انخفاض فعالية الانزيم المرتبط بطريقة Cross-linking باستخدام راتنج SRF (Salicylic acid-resorcinol-Formaldehyde) الى قلة عدد الاواصر التساهمية المتكونة نتيجة لعدم وجود بعض المواد التي تساعد على تكوينها مثل Glutaraldehyde ،او الى تكوين اواصر تساهمية بين البروتينات الموجودة مع الانزيم والمادة الداعمة.اما سبب انخفاض فعالية الانزيم المرتبط بطريقة الادمصاص على السليكا جل فيعود الى احتمال حدوث ضمور للمواقع الفعالة نتيجة لادمصاص الانزيم على سطح السليكا جل او حدوث تسرب لجزيئات الانزيم وانفصالها عن السليكا جل او حدوث ارتباط للمواقع الفعالة مع السليكا جل او ارتباط البروتينات الموجودة مع الانزيم مع السليكا جل.

بينما يعود سبب احتفاظ الانزيم المرتبط بالحجز بالاكار وبالجينات الكالسيوم بفعاليته الى امكانية هذه التقنية في المحافظة على الهيئة الطبيعية للانزيم بحيث لا يحدث أي ارتباط جانبي يؤدي الى شغل جزء من الانزيم وانما يعتمد على حجز الانزيم داخل شبكة هلامية تعمل على الحفاظ عليه من الخروج الى وسط التفاعل وتسمح في الوقت ذاته بدخول كافة مكونات التفاعل وخروج النواتج (29).

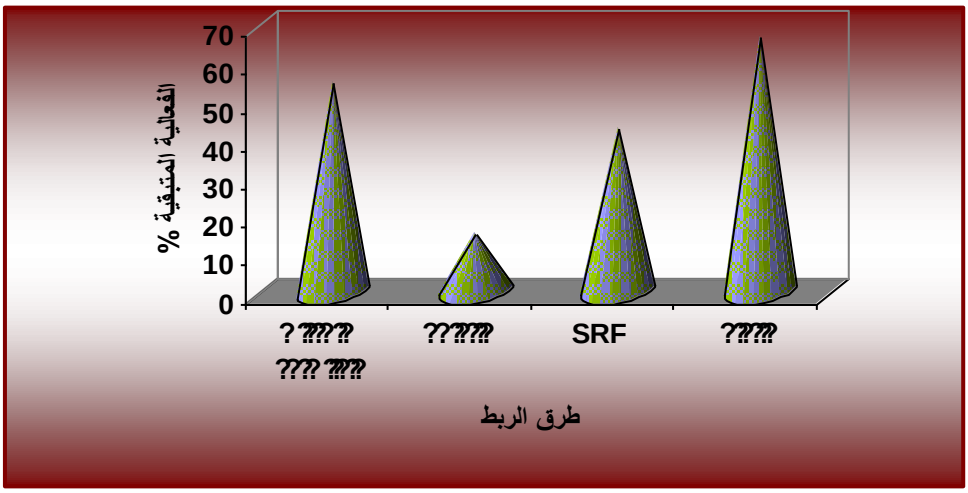
اختيار افضل تركيز من الاكار في ربط الانزيم:

استعملت التراكيز(1 ،2 ،3 ،4 ،5) % من الاكار لربط ببسين الدجاج المنقى جزئيا وذلك لمعرفة افضل تركيز لربط الانزيم .اشارت النتائج الموضحة في الشكل (6) ان افضل تركيز لربط ببسين الدجاج المنقى جزئيا بالاكار هو تركيز 3% اذ اعطى اعلى كفاءة ربط والتي بلغت 75% بينما كانت اقل كفاءة ربط للانزيم عند تركيز 1% اذ

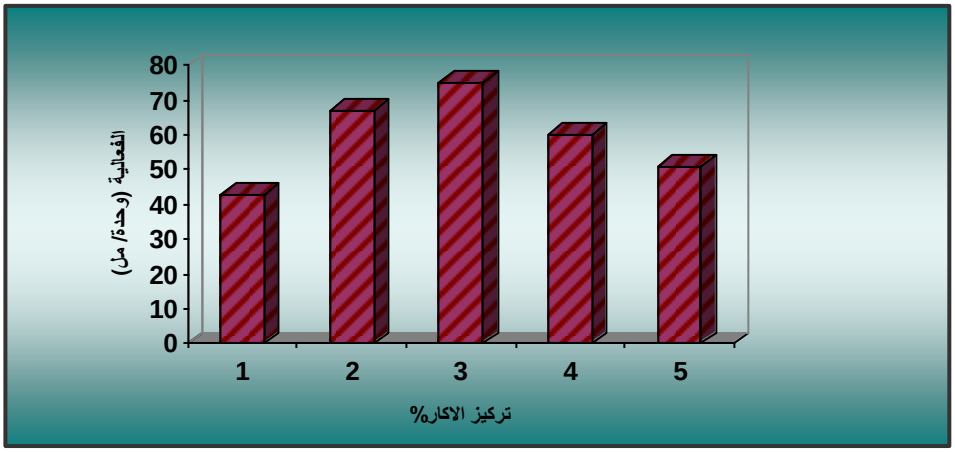
*جزء من اطروحة دكتوراه



شكل (4) مقارنة الفعالية للانزيمات الثلاثة المنقاة جزئيا (ببسين الاغنام ، ببسين الدجاج، ببسين سمك النويبي)



شكل رقم (5) مقارنة بين كفاءة ربط ببسين الدجاج المنقى جزئياً باستعمال طرق مختلفة



شكل رقم (6) اختيار افضل تركيز من الاكار في ربط ببسين الدجاج

*جزء من اطروحة دكتوراه

بلغت 43% وذلك بسبب خروج الانزيم من قطع الاكار التي كانت هشه بسبب تركيزها الواطيء.وعند تركيز 2% كانت قطع الاكار اقل هشاشة من تركيز 1% وبذلك سوف تقل كمية الانزيم المتسربة من مسامات الاكار وبالتالي تكون كفاءة الربط عند تركيز 2% والتي بلغت 67% اكثر من كفاءة الربط عند تركيز 1% .

كما تبين النتائج ان تركيز 4% و5% اعطيا كفاءة ربط اقل من تركيز 3% وقد يعزى سبب ذلك الى صلابة قطع الاكار وبالتالي صغر حجم المسامات مما ادى الى اعاقة وصول المادة الاساس الى الانزيم المحجوز داخل الاكار .ان هذه الاختلافات في كفاءة ربط الانزيم بالحجز يعود الى الاختلافات في حجم مسام المادة الداعمة والذي يعتمد على تركيز المادة المستعملة في الربط بالحجز (9).

تاثير عدد مرات استعمال الانزيم المرتبط على الفعالية:

درس تاثير عدد مرات استعمال قطع الاكار المحتوية على ببسين الدجاج المنقى جزئياً على الفعالية المتبقية للانزيم المرتبط .وتبين النتائج في الشكل (7) الى امكانية استعمال الانزيم المرتبط لغاية 7 مرات لكن الفعالية الانزيمية تقل مع زيادة عدد مرات الاستعمال .حيث احتفظ ببسين الدجاج المنقى جزئيا بـ 76% عند الاستعمال الرابع ، بينما احتفظ بـ 25% عند الاستعمال السابع وانه فقد فعاليته باكملها عند الاستعمال الثامن ،قد يعود سبب انخفاض الفعالية مع استمرار الاستعمال الى تسرب الانزيم من المادة الداعمة خلال الاستعمال والغسل بالماء بعد كل استعمال .

تاثير فترات الخزن على فعالية الانزيم : خُزن ببسين الدجاج المنقى جزئيا المرتبط بالاكار بالتجميد والتبريد وبدرجة حرارة المختبر لمدة 60 يوم .ان عملية الخزن بالتجميد وبدرجة حرارة المختبر لم تنجح بسبب تهشم قطع الاكار وخروج الانزيم منها عند الخزن بالتجميد وبسبب نمو الاحياء المجهرية على الاكار عند خزنه بدرجة حرارة المختبر .اما بالنسبة للخزن بالتبريد فتشير النتائج الموضحة في الشكل (8) الى ثباتية ببسين الدجاج المنقى جزئيا بعد 60 يوم من الخزن حيث بلغت الفعالية المتبقية22%.

الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الببسين : قدرالرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التخثرية لببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط بمدى من الارقام الهيدروجينية تراوح بين 5.8-7 .تشير النتائج في الشكل (9) ان الفعالية التخثرية للببسين الحر والمرتبط تقل مع ارتفاع الرقم الهيدروجيني من 5.8 الى 7 حيث لم يعطي الانزيم أي فعالية عند الرقم الهيدروجيني 7 .

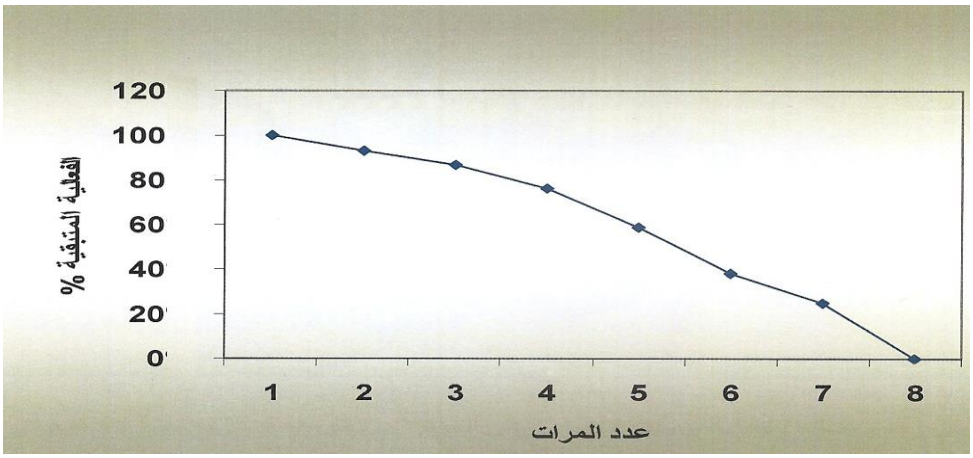
الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الببسين.عين الهيدروجيني الامثل لثبات ببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط بحضنه لمدة 30 دقيقة بدرجة 35ْم في محاليل دارئة تراوحت ارقامها الهيدروجينية بين 1-9 .

تبين النتائج في الشكل (10) ان المدى الامثل لثبات ببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط يتراوح بين 2-3 وان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم هو 3 ، كما توضح النتائج ان ثباتية الانزيم الحر والمرتبط تنخفض كلما ارتفع الرقم الهيدروجيني من 4-7 وانه فقد فعاليته عند الارقام الهيدروجينية القاعدية 8 ،9 .

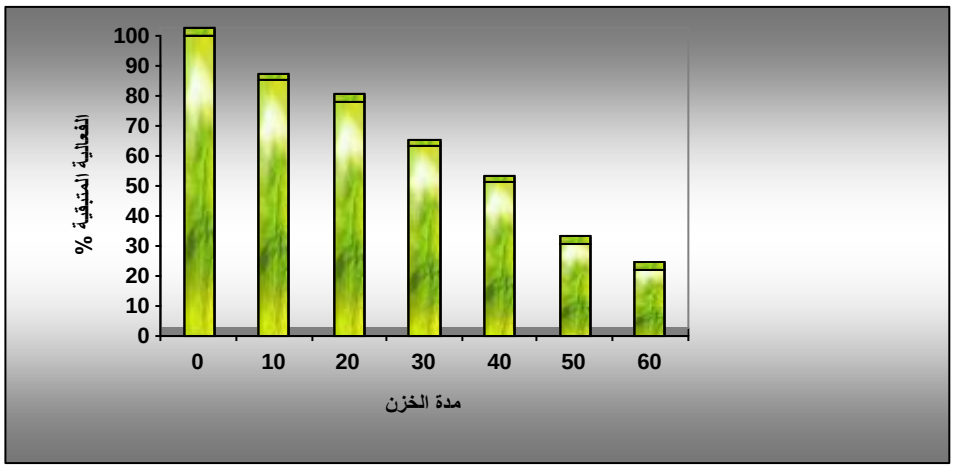
يعزى سبب انخفاض فعالية الانزيم عند ارتفاع الرقم الهيدروجيني عن الحدود المثلى للثبات الى مسخ جزيئة البروتين وتغير شكل او هيئة الموقع الفعال او تغيرالتركيب الثانوي والثلاثي للانزيم ومن ثم فقدان الفعالية الانزيمية (22) .

درجة الحرارة المثلى لفعالية الببسين : توضح النتائج في الشكل (11) الى زيادة الفعالية التخثرية بزيادة درجة حرارة التفاعل حيث بلغت اقصاها عند درجة حرارة 35ْم للببسين الحر والمرتبط حيث بلغت 8.8 و 6.23 وحدة

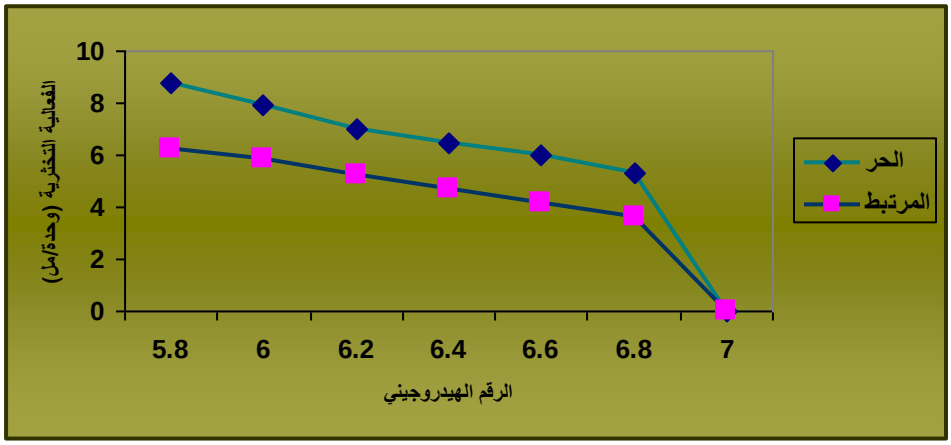
*جزء من اطروحة دكتوراه



شكل رقم(7) عدد مرات استعمال ببسين الدجاج المنقى جزئياً المرتبط بالاكار بتركيز 3%

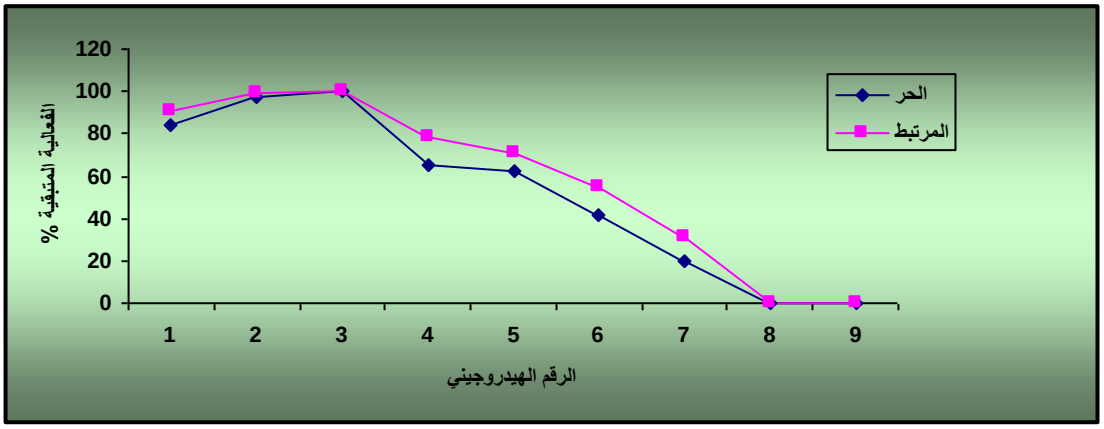


شكل رقم (8) فعالية ببسين الدجاج المنقى جزئيا المرتبط بالاكار خلال خزنه لمدة 60 يوم في درجة حرارة 4 م

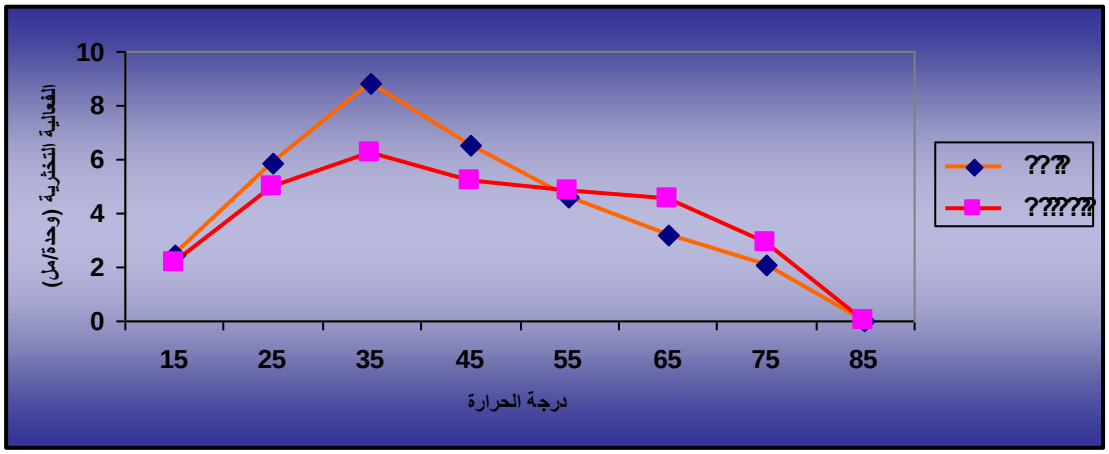


شكل رقم(9) الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التخثرية لببسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار.

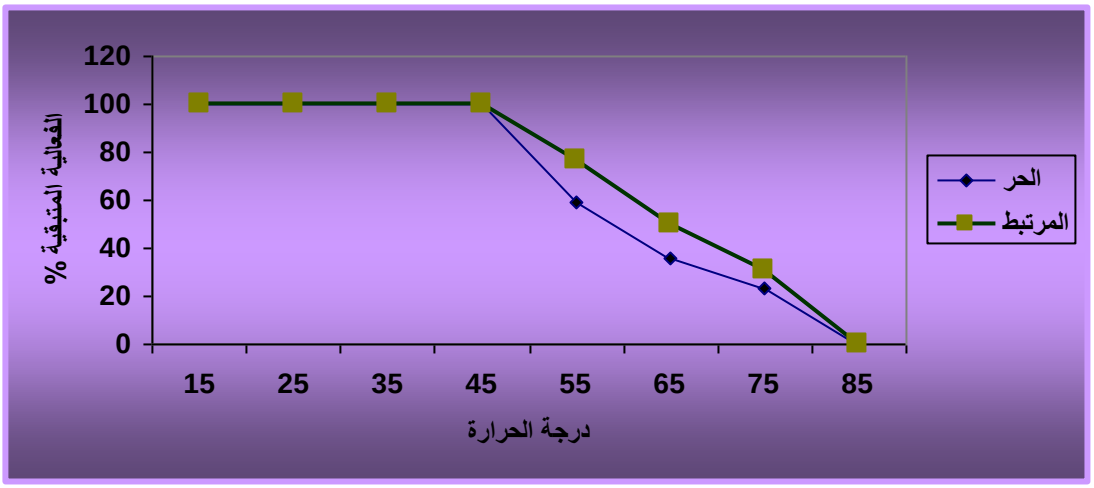
*جزء من اطروحة دكتوراه



شكل رقم (10) الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الفعالية التخثرية لبيسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار



شكل رقم (11) درجة الحرارة المثلى للفعالية التخثريةلبيسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار



شكل (12) درجة الحرارة المثلى لثبات الفعالية التخثرية لبيسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار

*جزء من اطروحة دكتوراه

/مل لببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط على التوالي .بعدها انخفضت الفعالية التخثرية بزيادة درجة الحرارة لتصل الى 2.06 و 2.91 وحدة /مل لببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط على التوالي عند درجةحرارة 75 م.

ان زيادة سرعة التفاعلات الانزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة يعود الى زيادة الطاقة الحركية للجزيئات ومن ثم زيادة التصادمات بين جزيئات الانزيم وجزيئات المادة الاساس ، اما انخفاض الفعالية الانزيمية عند الدرجات الحرارية العالية فانه يعود الى امتصاص الجزيئات المتفاعلة لطاقة عالية مما يؤدي الى تغيير التركيب الثلاثي للانزيم ومن ثم مسخه وفقدانه جزء من فعاليته (22).

درجة الحرارة المثلى لثبات الببسين:يوضح الشكل (12) نتائج حضن ببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط بدرجات حرارة تراوحت بين 15-85 مْ لمدة 15 دقيقة تبين النتائج ان ببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط احتفظ بكامل فعاليته التحللية بدرجة حرارة تراوحت بين 15-45م ،وان الفعالية التخثرية لببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط انخفضت مع ارتفاع درجة الحرارة حيث احتفظ الانزيم الحر بـ 59%من فعاليته واحتفظ الانزيم المرتبط بـ 76% من فعاليته عند درجة 55مْ بعدها انخفضت الفعالية مع ارتفاع درجة الحرارة الى ان فقدت بالكامل عند 75 م للحر والمرتبط .ويعزى سبب انخفاض فعالية الانزيم مع ارتفاع درجة الحرارة الى ان الحرارة العالية تؤثر في تركيب الانزيم اذ تؤدي الى دنترته في وتغيير هيئة الموقع الفعال مما يؤدي الى فقدان فعاليته (16) .

نلاحظ من النتائج ان الانزيم المرتبط اكثر ثباتاً من الانزيم الحر وذلك لان عملية الربط تعطي حماية للموقع الفعال الخاص بالانزيم (20).

تركيب الحليب المستخدم :حللت المكونات الرئيسية للحليب المستخدم في صناعة الجبن الطري ويبين الجدول (1) نتائج تحليل مكونات الحليب .

تحليل مكونات الجبن :توضح النتائج في الجدول (2) تحليل مكونات الجبن الابيض الطري المصنع باستعمال ببسين الدجاج المنقى جزئياً المرتبط بالاكار ومنفحة العجول ونلاحظ عدم وجود فروقات مهمة بين مكونات الجبن الرئيسية لكلا النوعين مما يشير الى ان الجبن المصنع من الانزيم قيد الدراسة مقارب للجبن المصنع من منفحة العجول وان الاختلافات القليلة بينهما انعكست على النسبة المئوية للتصافي في كلا النموذجين اذ يلاحظ من الجدول ان الفرق قليل في نسبة التصافي وهذا يعني ان الانزيم المستعمل يحقق نفس نسبة التصافي مقارنة بالمنفحة حيث بلغت نسبة التصافي للجبن المصنع باستعمال الانزيم قيد الدراسة والجبن المصنع باستعمال منفحة العجول 15.3% و 15.6 % على التوالي.

التقييم الحسي للجبن :يشير الجدول (3) نتائج التقييم الحسي للجبن الطري المنتج من منفحة العجول وببسين الدجاج المرتبط بالاكار ونلاحظ وجود تقارب في صفاته النوعية كما نلاحظ عدم حدوث تغيرات في الجبن المصنع من ببسين الدجاج المرتبط بالاكار بعد يوم وسبعة ايام عند حفظه في درجة حرارة 4 م ، اذ بلغت مجموع درجات التقييم له 88 من اصل 100 درجة وذلك بعد مضي يوم واحد و86 بعد مضي سبعة ايام ، وقد اتصف الجبن بنكهة جيدة خالية من أي طعوم غريبة اذ لم يلاحظ أي مرارة في المنتوج وذلك لعدم وجود انزيم الببسين في خثرة الجبن بصورة حرة لكونه مرتبط بقطع الاكار التي تزال من الحليب بعد حدوث التخثر .

*جزء من اطروحة دكتوراه

المكونات	القيم
البروتين%	3.3
الدهن%	3.6
المواد الصلبة الكلية%	10.62
المواد الصلبة غير الدهنية %	7.02
الحموضة (كحامض اللاكتيك) %	0.14
الرقم الهيدروجيني	6.6
الوزن النوعي	1.29

جدول (1) تحليل المكونات الرئيسية للحليب المستخدم في صناعة الجبن الطري

المكونات	نوع الانزيم المخثر	
	الانزيم قيد الدراسة	منفحة العجول
البروتين %	14.2	14.6
الدهن %	16.7	17.5
الرطوبة %	63.5	61.8
الحموضة (كحامض اللاكتيك) %	0.17	0.17
الرقم الهيدروجيني	6.5	6.5
التصافي %	15.3	15.6

جدول (2) تحليل مكونات الجبن الطري المصنع من ببسين الدجاج المرتبط بالاكار ومنفحة العجول

نوع الانزيم	منفحة العجول	ببسين الدجاج المرتبط	
الصفة		1 يوم	7 ايام
النكهة	28	27	27
القوام والنسيجية	28	26	25
اللون	17	17	17
التقبل العام	18	18	17
المجموع	91	88	86

جدول رقم (3) التقييم الحسي للجبن المصنع بمنفحة العجول وببسين الدجاج المرتبط

*جزء من اطروحة دكتوراه

المصادر

1-السراجي،انتصار حسن محمد(1996).انتاج انزيم مخثر من عفن *Trichoderma hamatum* ودراسة خواصه واستخدامه في صناعة الجبن الطري العراقي .اطروحة دكتوراه .كلية الزراعة-جامعة البصرة.

2-دلالي ، باسل كامل (1983). فهم الانزيمات. مطابع جامعة الموصل – جامعة الموصل .

3-عبد المطلب ، لطفي وسليم ، رياض (1983). صناعة الجبن والالبان المتخمرة . مطابع جامعة الموصل– جامعة الموصل.

4-Altun, G. D. and Cetinus, S. A. (2007). Immobilization of pepsin on chitosan beads. Food chemistry, 100:964-971.

5-A.O.A.C.(1975). Official Methods of Analysis.Association of Official Analytical Chemists. 13th. Edn. Washigton, D.C.

6-Barrett,A. J.(1980) . In:Protein aegradation in health and disease.(Eds., Evered, D.C. and Whelan, J.) Vol.4: 1-9 CIBA Foundation symposia.Excerpta Medica.

7-Berridage, N. J. (1952). An Improved method of observing the clotting of milk containing rennin. J. Dairy Res., 19:32-383.

8-Cao, L.; Langen, L. V. and Sheldon, R. A. (2003). Immobilised enzymes:carrier-bound or carrier free?. Current Opinion in Biotechnology, 14: 387–394.

9-Cao, L. (2005). Carrier-bound Immobilized Enzymes principles, Applications and Design. Wiley –VCH Gmb H& Co. KGaA .

10-Egan, H.; Kirk, R. S. and Sawyer, R.(1985). Pearson's. Chemical analysis of food.8th.Churchill livingstan.London.

11-Godfrey, T. and West, S. (1996). Industrial enzymology. McMillan Publishers Inc. New York, USA.

12-Green,M.L.(1972).Assessment of swine , bovine and chicken pepsins as rennet substitutes for cheddar cheese-making.J.Dairy Res.,39:261-273.

13-Kennedy, J. F. and Melo, E. H. M. and Jumel,K. (1990). Immobilized Enzmes and cells chemical Engineering progress, 86(7): 81-89.

14-Ling,E.R.(1963). Atext-book of dairy chemistry.Vol.11 practical. Chpman and Hall Ltd.U.K.

15-Lowry, O. H. ; Rosebrough, N. J. ; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurment with the folin phenol reagent. J.Biol. Chem., 193: 265-275.

16-Maciunska,J.;Czyz, B. and Synowiecki, J. (1998). Isolation and some properties of B- galactosidase from the thermophilic bacterium Thermus thermophiles. Food Chemistry, 63 (4): 441-445.

17-Minovska,V; Winkelhausen,E and Kuzmanova,S. (2005). Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis**.** J. Serb.

*جزء من اطروحة دكتوراه

Chem. Soc., 70 (4): 609–624.

18-Monsan, P. and Combes, D. (1988). "Enzyme Stabilization by Immobilization", in Mathods in Enzymology Vol. 137, Part D, Pp.584,(Eds., Mosbach,k.). Academic Press, Inc.

19-Moschopoulou, E. E. ; Kandarakis, I. G.; Alichanidis, E. and Anifantakis, E. M. (2006). Purification and characterization of chymosin and pepsin From kid. J.Dairy Research, 73:49-57.

20-Olson, A.C. and Stanley, W.L.(1974) .The use of tannic acid andphenol-formaldehyde resins with gluteraldehyde to immobilize enzymes. In**:** Immobilized enzymes in food and microbial processes. (Eds.,Olson, A.C.andCooney, C.L.). Plenum Press, New York.Pp. 51–62.

21-Riaz, A; Qader, S. A. U,; Anwar, A. and Iqbal, S .(2009) . Immobilization of the rmostable A-amylase on calcium Alginate Beads from *Bacillus Subtilis* KIBGE-HAR.Australian. J. Basic and Applied sci.,3(3):2883-2887.

22-Segel ,I . H .(1976) . Biochemical calculations. 2nd Edn, John and sons. Inc. New York.

23-Shah, B.; Kumar, S. R. and Devi, S. (1995). Immobilized proteolytic Enzymes on Resinous Materials and their use in Milk-clotting. process Biochemistry, 30(1):63-68.

24-Shubber, N.A.K.(2000). Production of gluconic acid from D-glucose by immobilization techniques in bioreactor. M.Sc. Thesis, Baghdad Univ.

25-Temiz, H; Okumus, E, Akut, U; Dervisoglu, M. and Yazici, F. (2008). Portial purification of pepsin from turkey proventriculus.WorldJ.Microbiol Biotechnol . 24(9):1851-1855.

26-Whitaker, J. R. ; Voragen, A. G. J. and Wong, D. W. S. (2003). Handbook of food Enzymology. Marcel Dekker, Inc., New York.

27-Whitaker, J. R. (1958). Properties of the proteolytic enzymes of commercial ficin . J. Food Research, 22:483-493.

28-Walsh, C. (1979). Enzymatic Reaction Mechanisms**.** W. H. Freeman and company. Sanfrancisco.

29-Zaborsky , O . (1974) . Immobilized Enzymes. . 3rd Edn . (ed : R . C . Wwast).CRCPress.

*جزء من اطروحة دكتوراه

Extraction, Purification,Characterization and Immobilization of Chicken Pepsin and Using it in soft cheese Industry

*** Zena Kadhim Issa** **Munir Abood Jasim**

Department of Food Science/ College of The Agriculture- University of Basrah

Abstract

The present study aimed to Isolate pepsin enzyme Ec: 3.4.23.1 from some animal sources and Purified it and Studied it's Charctarestics and Immobilized it as well as it's practical applications in food industry. The enzyme was extracted from the stomach of three animal sources (Sheep, Chicken and Nuwaibi fish) using five extraction solutions including Distilld water , Sodium chloride (10%) solution , Sodium chloride (6%) Boric acid (2%) solution ,Sodium Phosphate 0.1M and an pH 7.3 solution and Tris-acetic acid 0.4M and an pH 7.6 solution in order to find out the best source of enzyme and the best extraction solution .Sheeps stomach was the best source of enzyme compared with other sources , Sodium chloride (6%) Boric acid (2%) solution was the best extraction solution which gave the highest specific activity 14.3 unit / mg .Protein content for the crude enzyme extracts were con centrated using saturated ammonium sulfate in arrange 30-70% , 20-90% and 20-60% for Sheep, Chicken and Nuwaibi fish pepsin respectively.Dialyzed Chicken pepsin possesses the highest proteolytic activity compared with Sheep and Nuwaibi fish .

The dialyzed chicken pepsin Immobilized study with four carriers including Silica gel,SRF Resinous ,Calicium Alginate and Agar showed that the best carrier was agar wgich gave the maximum Immobilized efficency 67%.The best optimum concentration for Immobilize dialyzed chicken pepsin with agar was 3% with the highest proteolytic enzyme 75%. The purifed sheep pepsin was Immobilized with agar in 3% concentration .The remainder enzme activity for agar Immobilized pure Sheep pepsin and dialyzed Chicken pepsin were 25% , 21% respectively after 7 times using and the remaider enzyme activity for agar Immobilize pure Sheep pepsin and dialyzed Chicken pepsin wer 22%, 27% respectively was stored for 60 days in 4 ◌ْC.

The optimal pH for clotting activity for free and Immobilize dialyzed Chicken pepsin was 5.8. The optimal pH for the stability of free and Immobilize dialyzed Chicken pepsin are 3.The optimal temperature for clotting activity for free and Immobilize dialyzed chicken pepsin was 35◌ْC .The optimal temperature for free and Immobilize dialyzed Chicken pepsin stability was 15-45◌ْC.

Agar Immobilized dialyzed making Chicken pepsin was utilized in soft cheese results revealed that the Chemical composition and organoleptic evaluation of cheese was compatible with cheese pruduced in tradetional methods, This result is an indicator to enzmye efficiency in soft cheese and the possibility to use it as Calf rennet alternative and it can be used for more than one time in cheese making .

*جزء من اطروحة دكتوراه