مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 27 (1)،143-158 ، 2014

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

زينة كاظم عيسى و منير عبود جاسم

قسم علوم الاغذية ،كلية الزراعة، جامعة البصرة، البصرة، العراق

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 وان محلول كلوريد الصوديوم 6 % الحاوي على 2 %حامض البوريك هو افضل محلول استخلاص اذاعطى اعلى فعالية نوعية للانزيم والتي بلغت 14.3 وحدة/ملغم . 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. 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 اذ اعطى اعلى كفاءة ربط 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 بالاكار 27.6% عند خزنه لمدة 60 يوم بدرجة 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 استعماله لاكثر من مرة في هذه الصناعة .

المقدمة

البروتيزات هي الانزيمات التي تحفز التحلل المائي للاواصر الببتيدية فهي تقوم بتحلل البروتينات الى الببتيدات واحماض امينية وتعطى هذه الانزيمات رقم الشفرة EC:3.4 تبعاً للتصنيف النظامي للانزيمات . وتقسم البروتيزات الى قسمين تبعاً لفعلها التخصصي هما 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 وAmino peptidases وهي تعمل على الاصرة الببتيدية الموجودة في N-terminal (26).

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

يعد الببسين (EC:3.4.23.1) من البروتيزات 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 بالبيبسينوجين الذي يتحول الى ببسين بوساطة التحلل البروتيني (28).

ان تنقية الانزيمات عملية مكلفة جداً و استعمالها غير اقتصادي،لان الانزيم يستعمل مرة واحدة فقط (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 لاستعمال الانزيم المرتبط له فوائد اكثر مقارنة بالانزيم الحر وذلك لامكانية استعماله بصورة مستمرة ، الانهاء السريع للتفاعل ، السيطرة على صناعة المنتوج وسهولة ازالة الانزيم من المنتوج النهائي(8).

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

المواد وطرائق العمل

حُصل على معد الاغنام العرابي Arabic ewe بعمر 1-2سنة ومعد الدجاج Broiler ومعد لسماك النويبي *Otolithes ruber* الطازجة من الاسواق المحلية لمدينة البصرة.

1-**استخلاص الانزيم:**استخلص أنزيم الببسين من معدة الأغنام ،الدجاج وسمك النويبي بأستعمال خمسة محاليل لأستخلاص. 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_2 PO_4 مع 9.709 غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na_2HPO_4 في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى 7.3 اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر (12).

5- محلول Tris_acetic acid بتركيز0.4 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). اتبعت طريقة (25) لأستخلاص أنزيم البيسين مع اجراء بعض التغييرات عليها، فقد أخذت المعدة الطازجة وأزيلت محتوياتها والأسطح الدهنية وغسلت بالماء البارد وحفظت بالتجميد لمدة 24ساعة 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 $15,000\ _xg$ بدرجة حرارة 4 م لمدة 15 دقيقة. أهمل الراسب وجمع الراشح وعدل الرقم الهيدروجيني له الى 1.8 بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك HCl بتركيز 1مولار وترك لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة المختبر ثم اجري له طرد مركزي مرة اخرى وعدل الرقم الهيدروجيني له الى 5.5 بأستعمال 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 20-90% ثم اجريت عملية الطرد المركزي بسرعة $1911.6\times g$ لمدة نصف ساعة بعدها اجريت عملية الديلزة للانزيم تجاه الماء المقطر لمدة24 ساعة مع تبديل الماء كل 12ساعة.

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_85م بفارق عشر درجات.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.

4- ربط الانزيم: رُبط انزيم البيسين المنقى جزئياً باستعمال طرائق مختلفة من الربط ثم درست كفاءة ربط الانزيم. تضمنت هذه الطرق:

1-ربط الانزيم بالادمصاص على هلام السليكا تبعا للطريقة الموصوفة من قبل (17).

2- ربط الانزيم على الراتنج (SRF) بتقنية Cross_Linking تبعا للطريقة الموصوفةمن قبل (23).

3- ربط الانزيم بتقنية الحجز بالجيلات الكالسيوم باتباع الطريقة الموصوفة من قبل (21).

4- ربط الانزيم بتقنية الحجز بالاكار باتباع الطريقة الموصوفة من (24)واستعملت تراكيزمختلفة من الاكار (5,4,3,2,1) % 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 والتي تضمنت بروتين الحليب باتباع طريقة الفورمالين التي ذكرها (14) وبروتين الجبن قدر باتباع طريقة مايكروكلدال (5)، قدرالدهن في الحليب والجبن حسب طريقة كيربر(14)،قدرت النسبة الرطوبة في الجبن حسب الطريقة التي ذكرها (14)، قدر الرقم الهيدروجيني للحليب والجبن حسب الطريقة التي ذكرها (14) وقدرت الحموضة الكلية للحليب حسب ماذكر في (5) اما في الجبن فحسب الطريقة التي ذكرها(10).

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

النتائج والمناقشة

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

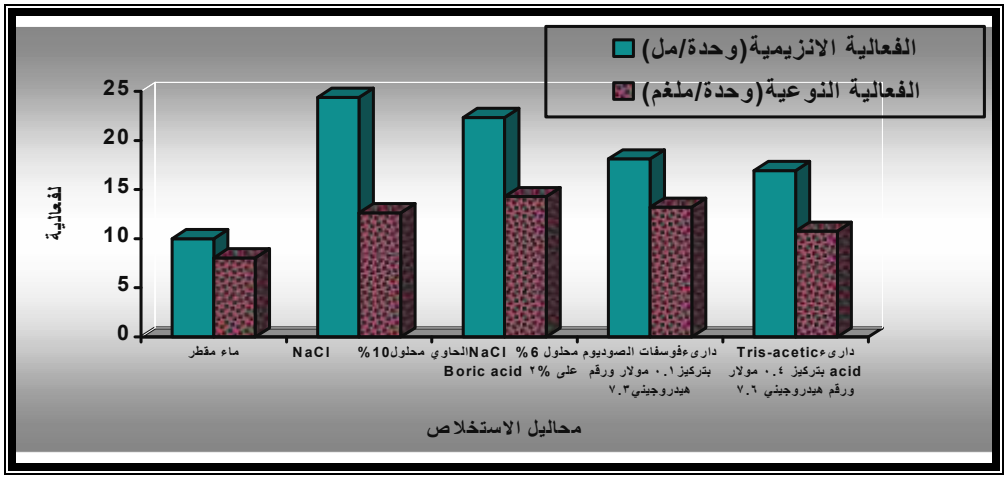
تبين النتائج في الشكل (2) ان محلول فوسفات الصوديوم الدارىء بتركيز0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.3 هو المحلول الافضل لاستخلاص انزيم البيسين من معدة الدجاج اذ اعطى فعالية نوعية مقدارها 13.79 وحدة /ملغم مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى التي تراوحت الفعالية النوعية فيها بين 10.34 – 12.73 وحدة /ملغم. اوضحت النتائج في الشكل (3) ان محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 6% الحاوي على 2% حامض بوريك هو افضل محلول لاستخلاص انزيم البيسين من معدة سمك النويبي اذ اعطى اعلى فعالية نوعية بلغت 13.65 وحدة /ملغم مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى التي تراوحت الفعالية النوعية فيها 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 البيسين من معدة الاغنام، الدجاج وسمك النويبي وفي الوقت نفسه اعطى زيادة في تركيز البروتين مما ادى الى انخفاض قيمة الفعالية النوعية لانزيم البيسين اذ ان وجود تركيز عالي من الملح في محلول الاستخلاص ادي الى زيادة في ذوبان اكبر كمية من البروتينات (2).

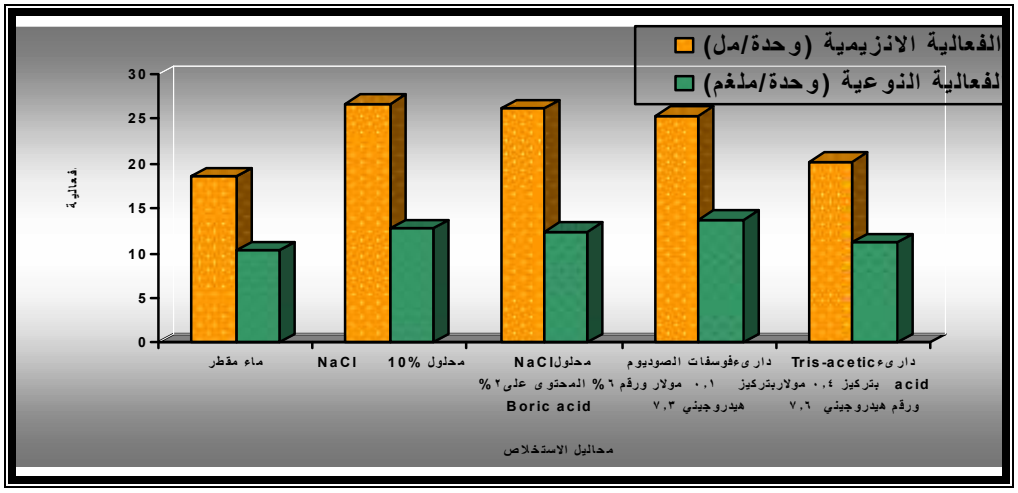
توضح النتائج انخفاض الفعالية الانزيمية والنوعية لانزيم البيسين المستخلص من معدة الاغنام ، الدجاج وسمك النويبي باستعمال الماء المقطر مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى اذ كانت الفعالية الانزيمية 10 ،18.6 ،19.2 وحدة /مل على التوالي والفعالية النوعية 8.04، 10.34، 10.29 وحدة /ملغم

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 تعزى الى اختلاف ذائبية البروتينات الموجودة في انسجة المعدة باختلاف محاليل الاستخلاص والتي تنعكس على تركيز البروتين وهذا بدوره يؤثر في الفعالية النوعية لانزيم الببسين .

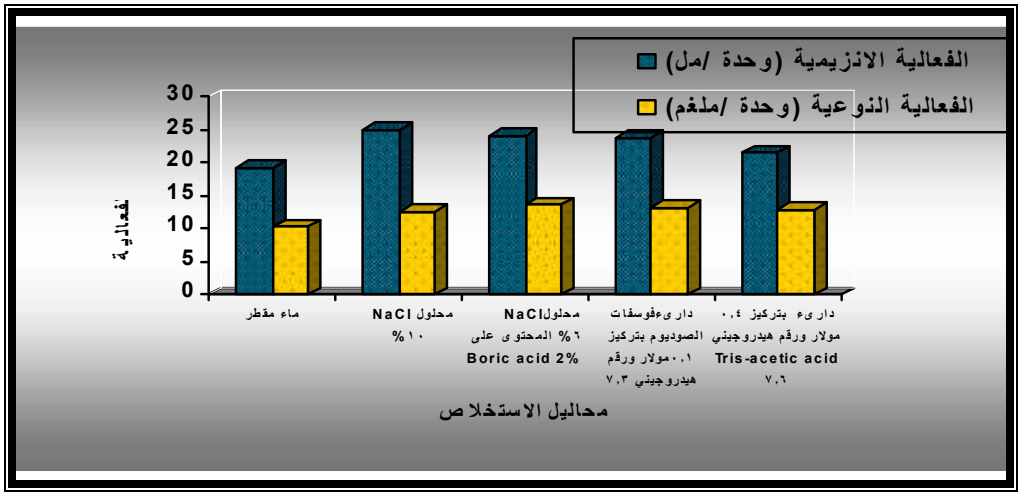
تنقية انزيم الببسين:1-تركيز الانزيم: ركز انزيم الببسين باستعمال املاح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع متدرجة تراوحت بين 20-90 % ، وكانت افضل نسبة اشباع لتركيز ببسين الاغنام، ببسين الدجاج وببسين



شكل (1): تأثير محاليل الاستخلاص في فعالية انزيم الببسين من معدة الاغنام.



شكل (2): تأثير محاليل الاستخلاص في فعالية انزيم الببسين من معدة الدجاج.

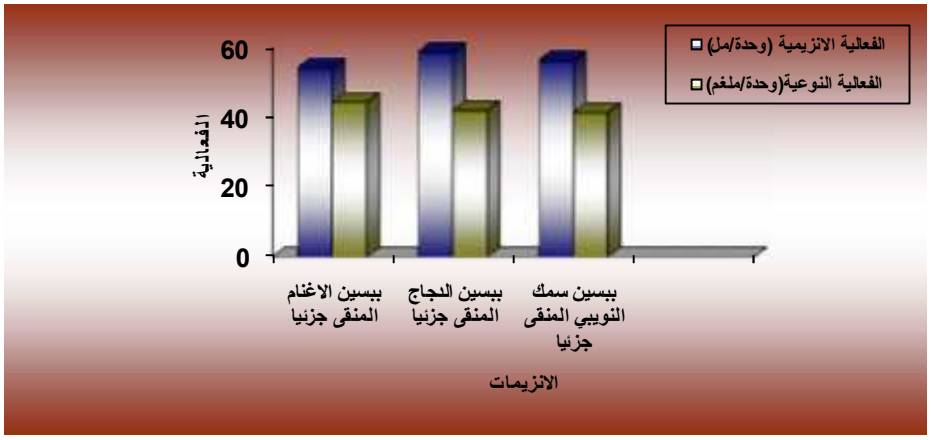


شكل (3): تأثير محاليل الاستخلاص في فعالية انزيم الببسين من معدة سمك النويبي.

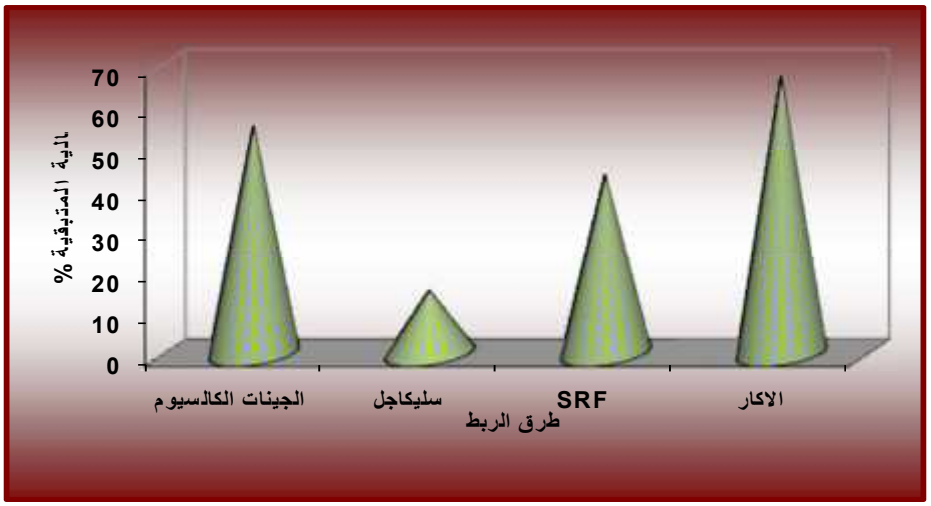
سمك النويبي من 30-70%، 20-90% ، 20-60 % على التوالي ،اذ جمع الراسب الناتج من النبذ المركزي واذيب في قليل من الماء المقطر وتمت ديلزته تجاه الماء المقطر للتخلص من كبريتات الامونيوم ثم قيست الفعالية الانزيمية والنوعية لكل منها وكان مقدارها 54.2، 58.8 ، 56.3 وحدة / مل و 44.42 ، 42، 41.39 وحدة/ملغم على التوالي كما موضح في الشكل (4) يعد 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 . تشير النتائج ان كفاءة ربط الانزيم بطريقة الحجز بالجينات الكالسيوم كانت اقل من طريقة الحجز بالاكار فقد 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 اذ تبين النتائج الموضحة في الشكل (5) تفوق طريقة الحجز بالاكار في ربط ببسين الدجاج المنقى جزئياً مقارنة بالطرق الاخرى اذ اعطت هذه الطريقة اعلى كفاءة ربط للانزيم بلغت 67% تشير النتائج الى ان كفاءة ربط الانزيم باستعمال راتنج SRF كانت 43 % ،وان ربط الانزيم باستعمال هلام السليكا اعطى اقل كفاءة ربط مقارنة بالطرق الاخرى اذ بلغت15.7%، قد يعود سبب انخفاض فعالية الانزيم المرتبط باستعمال راتنج SRF 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 بهلام السليكا فيعود الى احتمال حدوث ضمور للمواقع الفعالة نتيجة لادمصاص الانزيم على سطح هلام السليكا او حدوث تسرب لجزيئات الانزيم وانفصالها عن هلام السليكا او حدوث ارتباط للمواقع الفعالة مع هلام السليكا او ارتباط البروتينات الموجودة مع الانزيم مع هلام السليكا. يعود سبب احتفاظ الانزيم المرتبط 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). لشارت النتائج الموضحة في الشكل

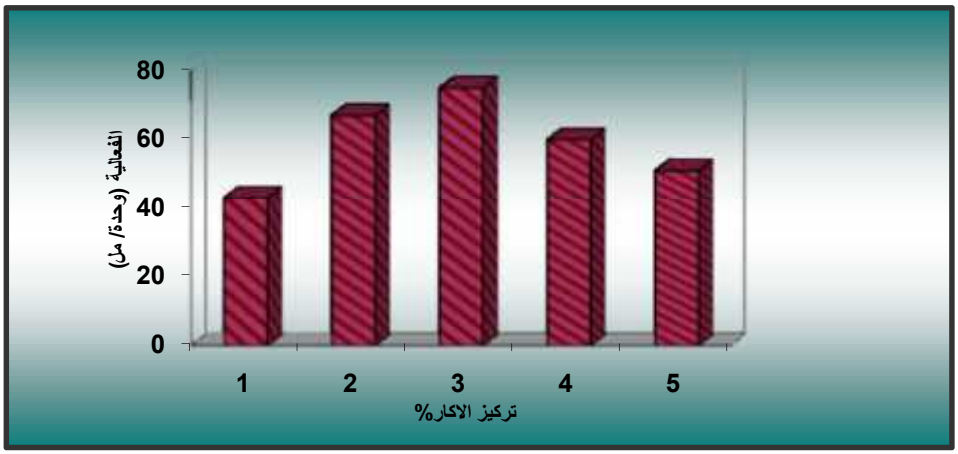
(6) ان افضل تركيز لربط ببسين الدجاج المنقى جزئيا بالاكار هو تركيز 3% اذ اعطى اعلى كفاءة ربط والتي بلغت 75% بينما كانت اقل كفاءة ربط للانزيم عند تركيز 1% اذ بلغت 43% وذلك بسبب خروج الانزيم من قطع الاكار التي كانت هشه بسبب تركيزها الوطىء.



شكل (4) تأثير التنقية الجزئية في فعالية انزيم الببسين للاغنام والدجاج وسمك النويبي



شكل (5) تأثير نوع الربط في فعالية انزيم الببسين للدجاج



شكل (6): تأثير تركيز مادة الاكار الرابطة في فعالية انزيم الببسين للدجاج.

وعند تركيز 2% كانت قطع الاكار اقل هشاشة من تركيز 1% وبذلك قلت كمية الانزيم المتسربة من مسامات الاكار وبالتالي كانت كفاءة الربط اعلى من تلك عند 1% والتي بلغت 67%. المحجوز داخل الاكار .ان هذه الاختلافات في كفاءة ربط الانزيم بالحجز تعود الى الاختلافات في حجم مسام المادة الداعمة والذي يعتمد على تركيز المادة المستعملة في الربط بالحجز (9).

تاثير عدد مرات استعمال الانزيم المرتبط في الفعالية:

درس تاثير عدد مرات استعمال انزيم ببسين الدجاج المربوط بالاكار المنقى جزئياً على الفعالية المتبقية للانزيم المرتبط .وتبين النتائج في الشكل (7) الى امكانية استعمال الانزيم المرتبط لغاية 7 مرات لكن الفعالية الانزيمية قلت مع زيادة عدد مرات الاستعمال فقد 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 اذ بلغت الفعالية المتبقية22%.

الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الببسين : قدر الرقم 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.

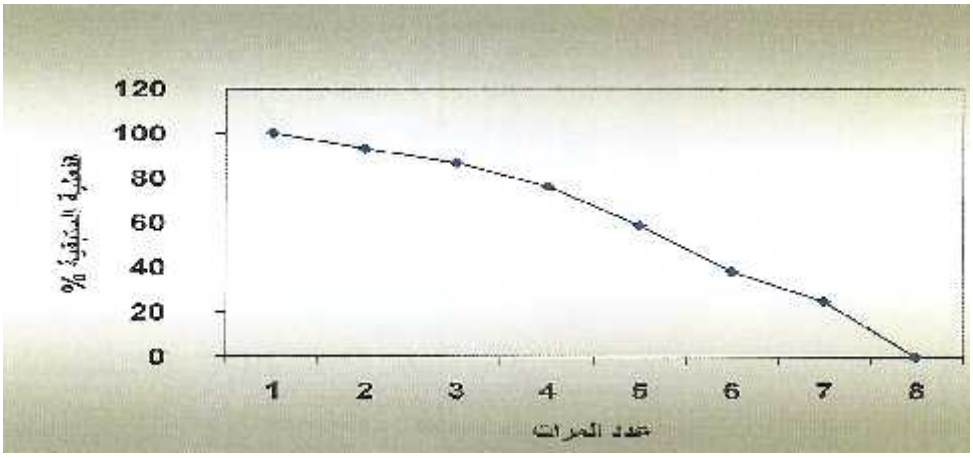
الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الببسين: عين الهيدروجيني **الامثل لثبات** ببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط بحضنه لمدة 30 دقيقة بدرجة 35°م في محاليل دارئة تراوحت ارقامها الهيدروجينية بين 1-9 .

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 .

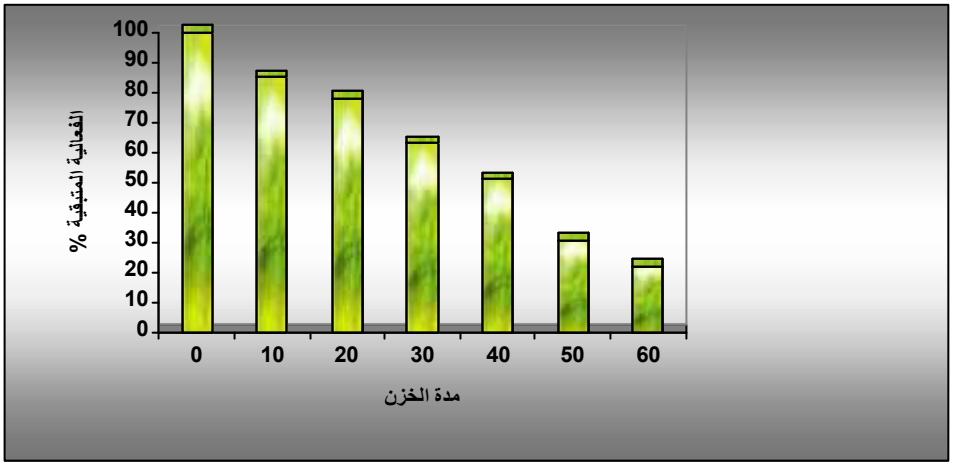
يعزى سبب انخفاض فعالية الانزيم عند ارتفاع **الرقم** الهيدروجيني **عن الحدود المثلى للثبات الى مسخ** جزيئة البروتين وتغير شكل او هيئة الموقع **الفعال** او تغيرالتركيب الثانوي والثلاثي للانزيم **ومن ثم** فقدان الفعالية الانزيمية (22) .

درجة الحرارة المثلى لفعالية الببسين : توضح النتائج **في الشكل** (11) الى زيادة الفعالية التخثرية بزيادة درجة حرارة **التفاعل فقد** بلغت اقصاها عند درجة حرارة 35°م للببسين الحر والمرتبط **وكانت** 8.8 **و** 6.23 **وحدة /مل** لببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر و **المرتبط 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 درجة حرارة** 75م.

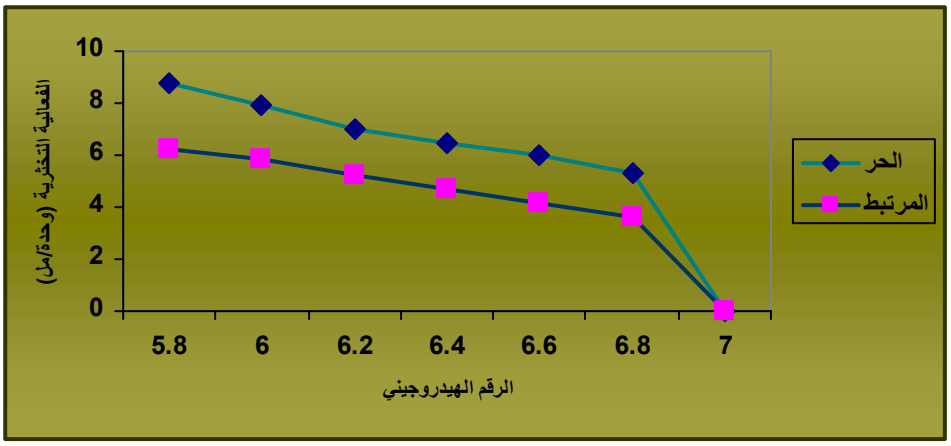
ان زيادة سرعة التفاعلات الانزيمية مع ارتفاع **درجة الحرارة** يعود الى زيادة الطاقة الحركية للجزيئات ومن ثم زيادة التصادمات بين جزيئات الانزيم وجزيئات المادة الاساس ، اما انخفاض الفعالية الانزيمية عند **الدرجات** الحرارية العالية فانه يعود الى امتصاص الجزيئات **المتفاعلة لطاقة** عالية مما يؤدي الى تغيير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



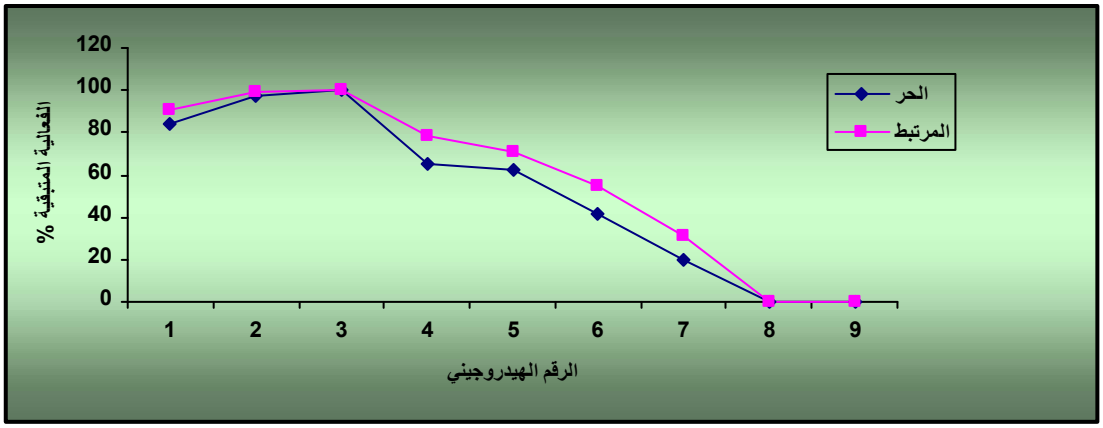
شكل (7): تأثير عدد مرات الاستعمال في فعالية انزيم ببسين الدجاج المنقى جزئياً المرتبط بالاكار.



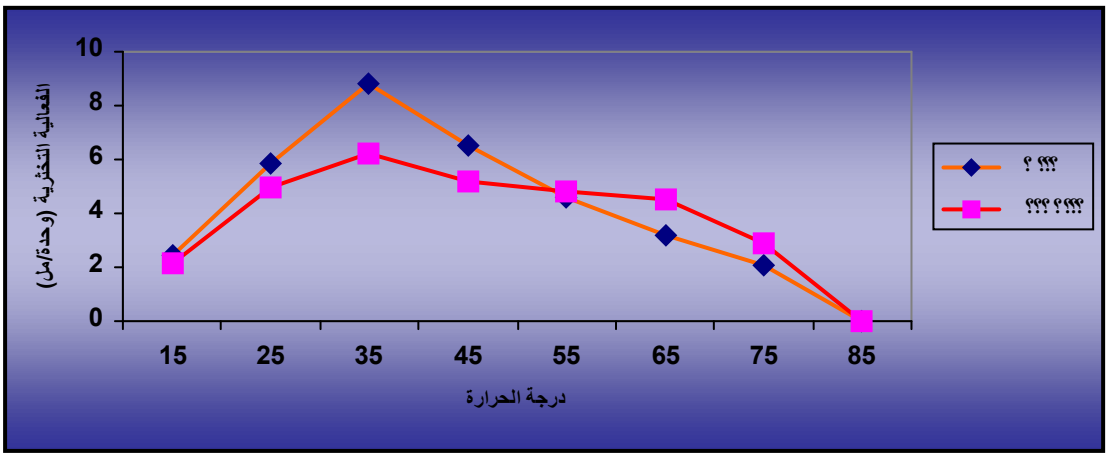
شكل (8): تأثير مدة الخزن في فعالية ببسين الدجاج المنقى جزئيا المرتبط بالاكار.



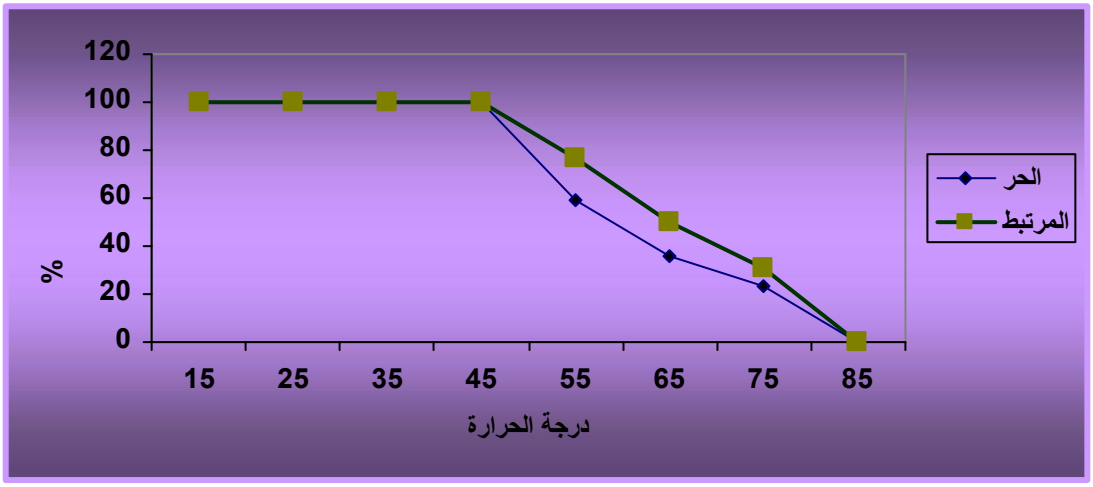
شكل (9): تأثير الرقم الهيدروجيني في الفعالية التخثرية لببسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار.



شكل (10): تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الفعالية التخثرية لببسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار.



شكل (11): تأثير درجة الحرارة في الفعالية التخثرية لبيسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار.



شكل (12): تأثير درجة الحرارة في ثبات الفعالية التخثرية لبيسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار.

درجة الحرارة المثلى لثبات البيسين: يوضح الشكل (12) نتائج حضن بيسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط بدرجات حرارة تراوحت بين 15-85مْ لمدة 15 دقيقة تبين النتائج ان بيسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط احتفظ بكامل فعاليته التحللية بمدى حراري تراوح بين 15-45 م ،وان الفعالية التخثرية لبيسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط انخفضت مع ارتفاع درجة الحرارة اذ 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).

جدول (1): تحليل المكونات الرئيسية للحليب المستعمل في صناعة الجبن الطري.

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 (2): مكونات الجبن الطري المصنع من ببسين الدجاج المرتبط بالاكار ومنفحة العجول.

المكونات	نوع الانزيم المخثر	
	الانزيم قيد الدراسة	مفحة 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 رقم (3): التقييم الحسي للجبن المصنع بمنفحة العجول وببسين الدجاج المرتبط.

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
القبل العلم	18	18	17
المجموع	91	88	86

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 المرتبط جزئياً بالاكار ومفحة 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 مفحة 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 مفحة 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 4م ، 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.

المصادر

1-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: 964-97

5-A.O.A.C. (1975). Official methods of analysis. association of official analytical chemists. 13th edn. Washington, D.C.

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

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

14-Ling,E.R.(1963). A textbook of dairy chemistry. Vol.11 practical. Chapman and Hall Ltd. U.K.

15-Lowry, O. H. ; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement 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. Chem. Soc., 70(4): 609-624.

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

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: Olson, A. C. and Cooney, C. L. (Eds.). Immobilized enzymes in food and microbial processes. 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. CRC Press.

Basrah J. Agric. Sci., 27 (1):143-157, 2014

Extraction, Purification,Characterization and Immobilization of Chicken Pepsin and Using it in Soft Cheese Industry

Zena Kadhim Issa and Munir Abood Jasim

Department of Food Science, College of The Agriculture, University of Basrah, Basrah, Iraq

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 characteristics 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 distilled 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 .Sheep's stomach was the best source of enzyme, Sodium chloride (6%) Boric acid (2%) solution was the best extraction solution which gave 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 . The dialyzed chicken pepsin Immobilized study with four carriers including Silica gel,SRF Resinous ,Calcium Alginate and Agar showed that the best carrier was agar which gave the maximum Immobilized efficiency 67%.The best optimum concentration for Immobilize dialyzed chicken pepsin with agar was 3% with the highest proteolytic enzyme 75%. The purified sheep pepsin was Immobilized with agar in 3% concentration .The remainder enzyme activity for agar Immobilized pure Sheep pepsin and dialyzed Chicken pepsin were 25% , 21% respectively after 7 times using and the remainder enzyme activity for agar Immobilize pure Sheep pepsin and dialyzed Chicken pepsin were 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 produced in traditional methods, This result is an indicator to enzyme 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.

Key words: Extraction Pepsin, Purification Pepsin, Characterization Pepsin, Immobilization Pepsin.