انتاج انزيم الرنيت المايكروبي من العزلة المحلية *Rhizomucor miehei* بطريقة تخمرات الحالة الصلبة

سعد خالد العكيدي هاشم محمد زهراو شعاع صفاء عبد الله نغم عبد الستار ناجي

مركز أبن البيطار، الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية، وزارة الصناعة والمعادن

الخلاصة

تم انتخاب 10 عزلات فطرية ضمن أجناس *Mucor* و *Rhizopus* من مصادر مختلفة وأجريت الاختبارات الخاصة لاختيار أفضل عزلة منتجة لانزيم الرنيت الفطري وتبين ان العزلة Mucor T4 كانت الأفضل. شخص هذا الفطر ضمن نوع *Rhizomucor Miehei*. أما أفضل وسط انتاجي كان هو وسط سحالة الرز وبأسلوب تخمر الحالة الصلبة Solid state fermentation وكانت الظروف المثلى للانتاج باستخدام نسبة ترطيب 1:1.6 (مليلتر ماء مقطر:غرام من الوسط) ورقم هيدروجيني 6 وعند درجة حرارة 40 °م وتركيز لقاح حجم 1مليلتر بحدود 10^6 سبور/غم وسط وحضنت لمدة 3 أيام. كما أستخلص الانزيم من وسط الانتاج باستخدام داريء الفوسفات بتركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 6 ثم قدرت الفعالية التخثرية للعزلة المنتجة وسجلت أعلى نسبة ممكنة وضمن المعايير المعتمدة إذ تحدد من خلالها ملائمتها كمخثرات للحليب وكبديل للمنفحة التقليدية.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

PRODUCTION OF MICROBIAL RENNET ENZYME FROM *RHIZOMUCOR MIEHEI* IN SOLID STATE FERMENTATION

Saaed K. Al-Aqeedi Hashim M. Zehraw Showaa S. Abdala Nagam A. Naje

Ibn Al-Betar Center, The State Co. For Drugs Industries and Medical Appliances, Samara, Ministry of Industry

ABSTRACT

Ten fungal isolate were selected which include Mucor, Rhizopus from different habitat. Tests conducted for the isolation of the best isolates that produce rennet. Results showed that isolate MucorT4 were the best for identification. The husks rice media was best productive media in solid state fermentation and the optimal condition for production use moisturizing ratio 1:1.6 (milliliter distilled water from gram media), pH=6, temperature 40ºC, quantity of inoculums volume 1ml limits 1000000 spore/gm media and incubate for 3 days. It also extracted the enzyme from the production media using phosphate regulator concentration of 0.2 molar pH=6. The estimated effectiveness agglutination for the producer isolation which recorded the highest rate possible within the standards as determined through suitability of milk agglutination and an alternative to traditional rennet.

Key words: Rennet, Rhizomucor miehei, Solid State Fermentation.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

المقدمة

ان استخدام الانزيمات في صناعة الأجبان قد عرف قبل حوالي 6000 سنة قبل الميلاد (1) وانزيم الرينيت هو أحد أهم هذه الانزيمات والذي يأتي من مصدرين رئيسين الأول: المعدة الرابعة للعجول الرضيعة التي تعرف بالمنفحة والثاني: المصدر المايكروبي مثل: *Rhizomucor pusillus* و *Rhizomucor miehei* و *Endothia parastica* و *Aspergillus oryzae* و *Irpex lactis* (2)، يتميز الرينيت المايكروبي بفعاليته التخثرية العالية إذ ممكن استخدامه كبديل وبنفس الكفاءة عن رينيت العجول الرضيعة خصوصاً وان معضم دول العالم بدأت تحرم ذبح العجول الصغيرة مما سبب شحة حقيقية في انتاج المنفحة (3، 4). أنتج هذا الانزيم بأساليب مختلفة بإستخدام *Rhizomucor miehei* من خلال أستعمال طريقة التخمير بالمزارع المغمورة Submerged fermentation (2،5) إذ تتأثر انتاجية الانزيم بعدة عوامل فقد لاحظ Escobar and Banett (3) زيادة الانتاجية مع زدياد معدل الحركة وزيادة تركيز الكلوكوز، من ناحية آخرى فقد أنتج الانزيم وبنجاح بإستخدام أسلوب التخمير الصلب Solid State Fermentation إذ أثبت هذا الأسلوب كفاءته العالية من حيث الانتاجية وكلفته القليلة نسبياً وسهولة السيطرة على العوامل المحددة للانتاج بالقياس مع أسلوب استخدام المزارع المغمورة (6) إذ تتأثر انتاجية الانزيم بعدة عوامل مختلفة كالحرارة ونسبة الرطوبة لمكونات الوسط الزرعي الصلب وتأثير مكونات الوسط (7) فعند استخدام الكازين في الوسط إزداد معدل الانتاج فيما إذا افتقر إلى الكلوكوز نتج عنه انخفاض في الانتاجية، من جهة ثانية فأن الانزيمات المحضرة بوساطة التخمير الصلب قد أظهرت إنخفاضاً في الفعالية التحللية للبروتينات والدهنيات Proteolytic and Lipolytic activity (8).

تهدف الدراسة إلى انتاج انزيم الرينيت الفطري من العزلة المحلية *Rhizomucor miehei* لغرض استخدامه في صناعة الأجبان كمادة مخثرة كبديل عن استخدام المنفحة الحيوانية المكلفة اقتصادياً.

المواد وطرائق العمل

العزل والغربلة

جمعت العينات من مصادر مختلفة مثل التربة إذ تم اختبار عدة مواقع كالموقع المجاور لمركز ابن البيطار – التاجي ومنطقة أبو غريب فضلاً عن كلية الزراعة. كما جمعت عينات من بذور الرز و فول الصويا و نخالة الحنطة ومن الهواء ضمن مختبرات قسم علوم الحياة.

- وسط جابكس المحور Modified Czapek Dox Agar :

حضر بأذابة المواد أدناه في 500 مليلتر ماء مقطر ورقم هيدروجيني 6.

المادة	الوزن(غم)
كلوكوز	15
K2HPO4	7.5
NaCl	0.25
MgSO4.7H2O	0.25
FeSO4	0.005
اكار	10

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

وزن 7.5غم حليب أولاً وذوب في 100 مليلتر ماء مقطر وعقم بطريقة البسترة ثم أضيف إلى مكونات الوسط المعقم مسبقاً في 121 °م ولمدة 15 دقيقة بعدها أضيف البنسلين 0.006 غم والسترنيومايسين 0.25 غم وصب أخيراً في أطباق بتري.

-وسط اكار الحليب Milk Agar :-

حضر من 15% حليب فرز و2% اكار بعد تعقيم الأول في 121°م لمدة 5 دقائق والثاني 121°م لمدة 15 دقيقة ثم خلط وصب في أطباق بتري.

- محلول اللاكتوفينول Lactophenol

حضر بأذابة 20 غم فينول في 20 مليلتر حامض اللاكتك و 40 مليلتر كليسيرول و 40 مليلتر ماء مقطر إذ أستخدم في تصييغ الأعفان لغرض تهيئتها للفحص.

- محلول 0.01% من Tween 80

تحضير أوساط العزل والتنشيط

أخذ 10غم من كل عينة (تربة) سحالة رز و فول صويا و نخالة الحنطة ووضعت في دورق حجم 250 مليلتر وأضيف لها 5 مليلتر من حليب فرز وحضنت في 40 °م لمدة 7 أيام لحين ظهور النمو الفطري بعدها نقلت المستعمرات النامية إلى وسط الجابكس المحور وحضنت 40 °م لمدة 7 أيام لغرض انتقاء المستعمرات التي تنطبق عليها المواصفات المظهرية للأعفان التابعة لجنسي *Mucor* و *Rhizopus* ثم نقلت المستعمرات إلى وسط اكار الحليب وحضنت في 40 °م لمدة 3 أيام إذ لوحظ ظهور هالة شفافة حول المستعمرات النامية نتيجة تحلل الكازين. نقلت مرة آخرى إلى وسط الجابكس لغرض تنقيتها وتنشيطها وحضنت في 40 °م لمدة 7 أيام.

الغربلة

يقصد بها اجراء المقارنة بين عدد من العزلات في صفة محددة مثل صفة انتاج انزيم الرنيت الفطري وتتم على مرحلتين: الأولى يتم فيها تحضير عالق سبوري بإضافة 5 مليلتر من محلول توين 80 على وسط اكار جابك دوكس مائل ثم تقشط بوساطة عروة ناقل وترج جيداً ثم تنقل إلى وسط الجابك دوكس في دورق سعة 250 مليلتر ثم تحضن في 40 °م لمدة 7 أيام. والثانية أستخدمت فيها المواد الآتية:

1- محلول داريء الفوسفات بتركيز 0.05 غم و رقم هيدروجيني 6.0

- 1.36 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجيني

-1.74 غم من فوسفات البوتاسيوم آحادية الهيدروجين

2- محلول كلوريد الكالسيوم بتركيز 0.01 مولاري في الماء المقطر.

3- محلول الحليب الفرز : حضر بأذابة 10 غم من Skim milk في 100 مليلتر من محلول كلوريد الكالسيوم أستخدم الوسط لتقدير الفعالية التخثرية.

4 – وسط سحالة الرز: نقل 100غم من الوسط إلى دورق مخروطي حجم250 مليلتر ورطب بإضافة 30 مليلتر من الماء المقطر وعقم بدرجة 121 °م لمدة 15 دقيقة.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

الفحوصات المظهرية

حضرت شرائح من المستعمرات الفطرية النامية على وسط الجابكس النامية عليه العزلة الفطرية وأستخدم محلول اللاكتوفينول الذي يوضح العزلة بشكل وفحصت بالمجهر الضوئي وسجلت الصفات من حيث وجود الجذيرات وشكلها وموقعها وتفرع الحوامل وشكلها وشكل العويمدات والحوافض البوغية.

الفحوصات المزرعية

أستخدم وسط الجابكس المحور ووسط اكار الحليب والحضن 40 °م لمدة 3 أيام سجلت بعدها الملاحظات الخاصة بلون المستعمرات وقوامها.

تقدير الفعالية التخثرية

نقل 5 مليلتر من محلول الحليب الفرز إلى أنبوب اختبار وحضن في حمام مائي بدرجة37 °م لعدة دقائق ثم أضيف 0.05 مليلتر من مستخلص الانزيم ورج جيداً لعدة مرات، أعيد الأنبوب إلى الحمام المائي مع مراقبته وتحريكه بين مدة وآخرى لحين حصول عملية التخثر إذ ظهرت الخثرة بشكل طبقة غطت سطح الأنبوبة الداخلي وحسب زمن التخثر منذ لحظة وضع الانزيم ولحين ظهور الخثرة وأستخدمت المعادلة الآتية لحساب الفعالية التخثرية وكما يأتي:

الفعالية التخثرية (وحدة/مليلتر) = [2400/ زمن التخثر (ثانية)] × العامل

تعيين الظروف المثلى لانتاج الانزيم

1 – اختيار الوسط الأفضل للانتاج

أستخدمت الأوساط الآتية: سحالة الرز و نخالة الحنطة و فول الصويا + نخالة و سحالة الرز + فول الصويا إذ حضر من كل عينة 15 غم ورطب بـ25 مليلتر ماء مقطر وأستخدم لقاح بحجم 10^6 بوغ/غم وحضنت الأوساط في 40 °م ولمدة 3 أيام ثم أستخلص الانزيم بإضافة 50 مليلتر من محلول داريء الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 6 وبتركيز 0.2 مولاري وقدرت الفعالية التخثرية.

2 – تعيين نسبة الترطيب الأمثل للانتاج

أختير وسط سحالة الرز ولعدة مكررات إذ تم تغيير نسبة الترطيب من 0.5 – 2 (مليلتر: غم وسط) بحجم اللقاح 10^6 بوغ/غم وحضنت في 40 °م لمدة 3 أيام ثم أستخلص الانزيم وقدرت الفعالية التخثرية.

3- اختيار أفضل تركيز لداريء الفوسفات

أستخدمت تراكيز مختلفة من داريء الفوسفات (0.1، 0.2، 0.3، 0.4 مولاري).

انتاج الانزيم في وسط السحالة

لقح الوسط بالعالق السبوري وحضن بدرجة 40°م لمدة ثلاثة أيام، أضيف بعدها 50 مليلتر من الداريء ثم قطع الوسط ومزج جيدً، رشح بعد ذلك بوساطة قطعة قماش ثم نبذ مركزياً بسرعة 10000 دورة/دقيقة ولمدة

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

15 دقيقة إذ أخذ الرائق الذي يحوي المستخلص الانزيمي ثم رشح بوساطة مضخة تخلخل الضغط باستعمال ورق ترشيح ذي فتحات بقطر 0.04 مايكروميتر.

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل للانتاج

حضرت أوساط من سحالة الرز بارقام هيدروجينية تراوحت من 3 إلى 7 وأستخدمت نسبة ترطيب 1.6:1 غم/مليلتر وكان حجم لقاح 10^6 بوغ/غم وحضنت في 40 ° م لمدة 3 أيام ثم أستخلص الانزيم وقدرت فعاليته التخثرية.

تعيين درجة الحرارة المثلى للانتاج

حضرت أوساط من سحالة الرز مرطبة بنسبة 1.6:1 غم/مليلتر وبرقم هيدروجيني 6 وكان حجم اللقاح 10^6 بوغ/غم وحصنت بدرجات حرارية مختلفة تراوحت من 30 إلى 60 °م ولمدة 3 أيام، أستخلص الانزيم وقدرت فعاليته التخثرية.

تعيين حجم اللقاح الأمثل للانتاج

حضرت أوساط من سحالة الرز بنسبة ترطيب 1.6:1 غم/مليلتر وبلقاح تراوح حجمه بين 10^5 بوغ/غم – 10^7 بوغ/غم) حضنت في 40 °م ولمدة 3 أيام ثم أستخلص الانزيم وقدرت فعاليته التخثرية.

تعيين المدة المثلى للانتاج

لقح وسط سحالة الرز المرطب بنسبة 1.6:1 غم/مليلتر بلقاح 10^6 بوغ/غم وحضن في 40 °م لمدة تراوحت من 1-8 أيام، أستخلص بعدها الانزيم وقدرت فعاليته التخثرية.

النتائج والمناقشة

1-العزل و التشخيص

عزلت 10 عزلات فطرية من جنس *Mucor* و *Rhizopus* من مصادر مختلفة خلال الدراسة وأستخدمت أثناء العزل تقنية دعم المزرعة (الخاصة بتنشيط الفطر) بكمية من الحليب الفرز Skim milk بغية اعطاء أكبر فرصة لظهور الأحياء المجهرية المنتجة للانزيم حتى يسهل اقتناصها(9، 10) بالحليب الفرز والمضاف له مضادات البنسلين والستربتوما يسين التي تمنع نمو البكتريا. وقد عزلت على وسط اكار الجابكس المحور إذ أستبدل نترات الصوديوم.

شخصت العزلات إعتماداً على الصفات المظهرية وفقاً لما جاء في المفاتيح التشخيصية لـ *Mucor* و *Rihzopus* (11، 12) و بعد اجراء عملية الغربلة بالمرحلة الأولى والثانية ثبت ان العزلة Muco Tu من أفضل العزلات في إنتاج الرنيت الفطري إذ تتميز العزلة بعدم تكوينها للمدادات وكانت قليلة الجذيرات كما ان حواملها الحافظية تتفرغ في أجزاءها العلوية وتكون غزول فطرية تتميز بطولها المفرط ودقة سمكها وقد أخضعت العزلة لمجموعة من الفحوصات لتحديد خواصها إذ ظهرت مستعمرات رمادية اللون ذو ارتفاع 2-3 مليمتر. تمتاز العزلات بتكوين أبواغ كروية الشكل والسبورات الناضجة مغزلية الشكل وشكل العويمدات شبه كروية والجذيرات قصيرة ورفيعة مفردة.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

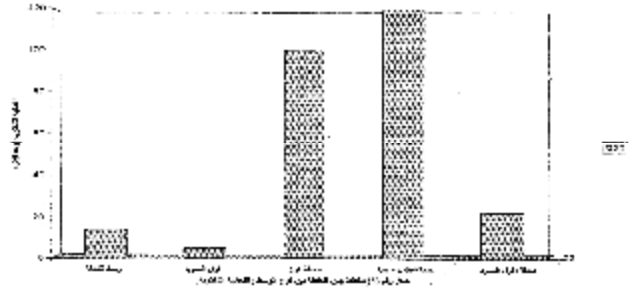
تاثير داريء الفوسفات

وجد أن أفضل محلول أستعمل لاستخلاص الانزيم هو داريء الفوسفات وبتركيز 0.2 ورقم هيدروجيني 6 ويعود اختلاف كفاءة الدواريء المستخدمة في استخلاص الانزيمات إلى اختلاف قابليتها في إذابة الانزيمات وفصلها عن مكونات الوسط غير الذائبة بسبب اختلافها في قوتها الآيونية من جهة وتباين الانزيم من جهة آخرى كنقطة تعادلها الكهربائي وغيرها.

اختيار الوسط الأفضل للانتاج

أستخدمت عدد من الفضلات النباتية المحلية كأوساط صلبة للانتاج مثل سحالة الرز و نخالة الحنطة و فول الصويا، أعطت سحالة الرز أعلى فعالية تخثرية الإ ان استخدام سحالة الرز مخلوطاً بها فول الصويا قد أعطى فعالية تخثرية أكثر مما كانت عليه السحالة وبشكل مفرد ويرجع السبب في ذلك إلى اختلاف المواد العضوية واللاعضوية ودرجة تعقيدها وتكوينها معقدات مع مكونات الوسط اللاعضوية من الأملاح والمعادن كذلك اختلاف حجوم الدقائق والمساحة السطحية ومسامية الوسط كان له الأثر في الاختلاف (13،14،15).

أثرت قابلية امتصاص الدقائق للماء على درجة انضغاطها بعد الترطيب والتعقيم فكانت نخالة الحنطة أكثر انضغاطاً من غيرها وسحالة الرز أكثر صدا Hydrophobic للماء لذا فبالرغم من استخدام 50 مليلتر في عملية الاستخلاص كان حجم المستخلص الانزيمي 56 مليلتر واختلفت الوان المستخلصات الانزيمية الخام فكان لون مستخلص كسبة فول الصويا والنخالة أصفر غامق ولون وسط الرز مائل إلى البني الفاتح بينما مستخلصات بقية الأوساط ومدى ملائمتها لانتاج الانزيم في مجالات التصنيع الغذائي لذا أستبعد وسط فول الصويا من بين الأوساط وأختير وسط سحالة الرز أفضل وسط لانتاج الانزيم (الشكل 1).



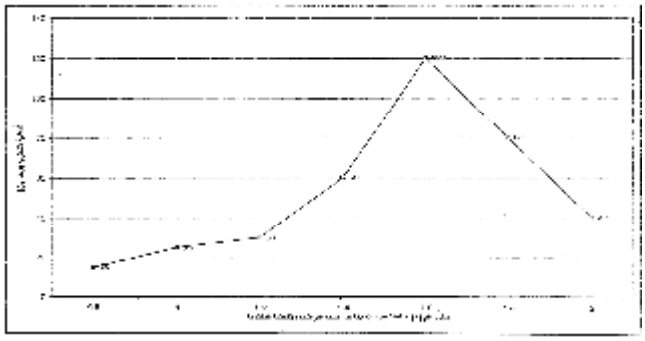
الشكل(1): تأثير أوساط غذائية مختلفة في انتاج الرينيت الفطري من العزلة المحلية للفطر *Rhizomucor miehei*

تعيين نسبة الترطيب المثلى للانتاج

كانت نسبة الترطيب المثلى في وسط سحالة الرز لانتاج الانزيم عند 1:1.6 مليلتر ماء مقطر/غم وسط إذ بلغت الفعالية التخثرية 120 وحدة/مليلتر، ولا بد من الأخذ بعين الاعتبار عند مناقشة نسبة الترطيب العوامل الآخرى كنوع الكائن المستخدم وحجم اللقاح ودرجة الحرارة فمثلاً يتوقف انتقال المواد الغذائية من الوسط إلى الخلايا على توفرها بصورة ذائبة في الماء والذي من المحتمل تناقصه مع تقدم مدة الحضن في درجات الحرارة العالية نسبياً 40 °م نتيجة التبخر، الأمر الذي يقلل من الفعاليات الأيضية وتخليق الانزيمات ويحفز العفن على

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

الاسراع في تكوين السبورات مبكراً لا سيما عند المستويات المتدنية من نسبة الترطيب (16) بيد ان لزيادة نسب الترطيب عن الحدود المثلى تأثيراتها السلبية أيضاً إذ تؤدي إلى تخفيف المغذيات وتحديد انتقال الأوكسجين لانعدام الفراغات البينية بسبب تماسك الوسط وصلابته وقلة الحيز المتاح لتغلغل خيوط العفن إلى داخل الوسط (17) كما مبين في الشكل (2).



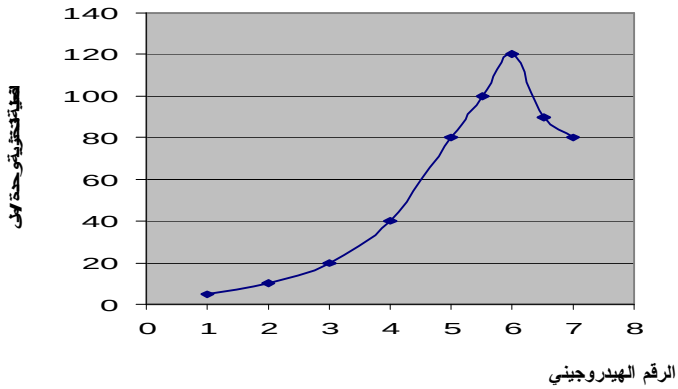
1:2 1:1.8 1:1.6 1:1.4 1:1.2 1:1 1:0.5

الشكل (2): تأثير نسب ترطيب مختلفة في انتاج الرينيت الفطري من العزلة المحلية *Rhizomucore miehe*

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل للانتاج

لوحظ ازدياد الانتاج مع زيادة الرقم الهيدروجيني وبلغت الحد الأعلى عند الرقم الهيدروجيني 6 وسجلت أعلى فعالية تخثرية إذ بلغت 120 وحدة/مليلتر بالرغم من تأثير الرقم الهيدروجيني في نمو الأعفان وفعاليتها الأيضية تعد أمراً في غاية التعقيد(18،19) الإ ان بعض جوانب هذا التأثير تتوضح في انتاج الانزيمات الخارجية في ناحيتين احداهما بتأثير الرقم الهيدروجيني على ذائبية المغذيات وتأينها وجاهزيتها للانتقال إلى داخل الخلايا وثابتيتها بثبات الانزيم المنتج تجاه الرقم الهيدروجيني (20) كما يلاحظ في الشكل (3).

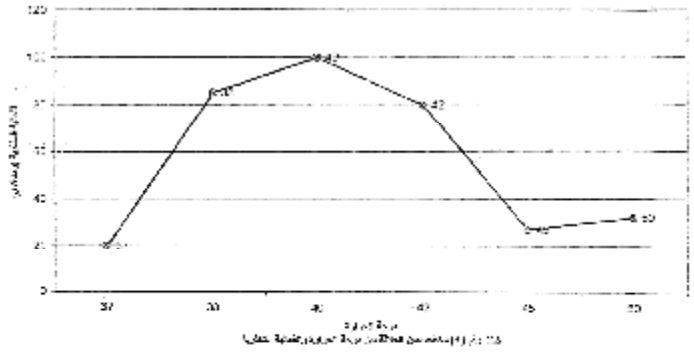
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



الشكل (3): تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني في انتاج الرينيت الفطري من العزلة المحلية *Rhizomucore miehe*

تعيين درجة الحرارة المثلى للانتاج

يلاحظ زيادة الفعالية التخثرية بأرتفاع درجة الحرارة وصولاً إلى 40 °م إذ بلغت 100 وحدة/مليلتر ثم تبدأ بالانخفاض في الدرجات الأعلى وتختلف درجة الحرارة المثلى للانتاج بأختلاف الأحياء المجهرية فيما إذا كانت محبة للحرارة المعتدلة أو العالية كما ان درجة الحرارة في انتاج الانزيمات تتداخل مع العوامل البئية الآخرى إذ ان درجة الحرارة المثلى ومدياتها تكون صحيحة فقط عند ظروف محددة من مدة الحضانة والوسط الغذائي كما ان الاحتياجات التغذوية لبعض الأحياء المجهرية تتغير خلال النمو عند درجات الحرارة فوق المثلى (21) كما في الشكل (4).



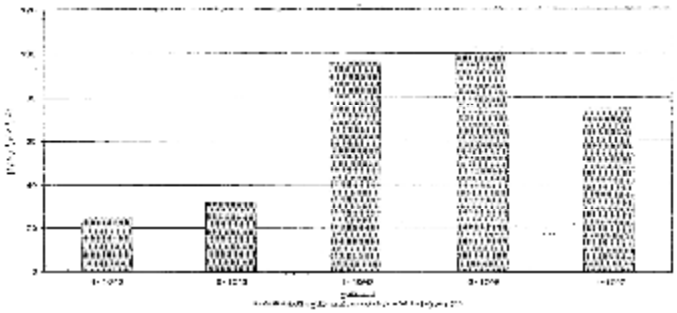
الشكل(4): العلاقة بين درجة الحرارة والفعالية التخثرية للرينيت الفطري المنتج من العزلة المحلية *Rhizomucor miehei*

تعيين حجم اللقاح الأمثل للانتاج

أما فيما يخص نتائج إضافة اللقاح فكانت النسبة المثلى للانتاج 10^6 بوغ بحدود 1 مليلتر إذ بلغت الفعالية التخثرية 100/مليلتر وان زيادة حجم اللقاح عن هذا الحد أو خفضه تؤدي إلى نقصان في الانتاجية. ويشير(16)

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

إلى إمكانية تجاوز محددات وسط الانتاج الهندسية جزئياً باستخدام لقاحات كبيرة الحجم بعض الشيء بحيث تصبح أجزاء الغزول الفطرية النامية قادرة على استثمار معظم دقائق المادة الأساس ودون مزاحمة تؤدي إلى المنافسة على بعض المغذيات المحددة للنمو وذلك من خلال النشر الجيد لذلك اللقاح ويجب استخدام السبورات كلقاح بدلاً من قطع النموات الفطرية المايسليوم (22) لسهولة توزيعها على سطح الوسط وكونها تحقق انتشار ونمو متجانس (الشكل 5).



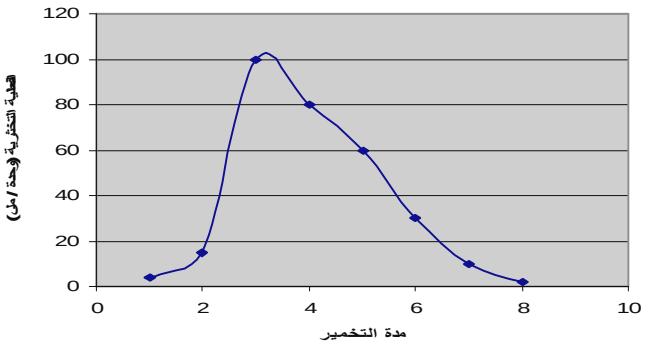
حجم اللقاح بوغ / غم وسط غذائي

الشكل (5): تأثير مستويات مختلفة من اللقاح في انتاج الرينيت الفطري من العزلة المحلية للفطر *Rhizomucor miehei*

تعيين المدة المثلى للانتاج

بلغت ذروة انتاج الانزيم عند مدة حضن 3 أيام إذ بلغت الفعالية التخثرية 100 وحدة/مليلتر وتبدأ الفعالية بالانخفاض في اليوم الرابع ثم تبدأ بالنقصان الشديد في اليوم السادس ويرجع السبب في تدهور انتاج الانزيم بعد مدة بلوغها الحد الأقصى إلى تراكم النواتج الوسطية والثانوية لفعاليات الأيض الهدمية وظهور بوادر التأثير الكابح لهذه النواتج في فعاليات الانزيم المشاركة في العمليات الأيضية بما في ذلك الانزيمات الخارجية ومنها انزيمات البروتييز إذ أشار(23).Wang *et al* إلى ان وجود الأحماض الامينية الحرة ولاسيما الثريونين في وسط نمو بكتريا *Bacillus* يؤدي إلى خفض كفاءتها في انتاج انزيم البروتييز وتزداد حصيلة الانزيم بشكل يوازي الكمية المزالة من هذا الحامض من الوسط (الشكل 6).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



الشكل (6): انتاج انزيم الرينيت الفطري من العزلة المحلية للفطر *Rhizomucor miehei* خلال مدد زمنية مختلفة (1-8 يوم).

المصادر

1. Neelakantan, S.; Mohanty, A. K. and Kaushik, J. K.(1999). Production and use of microbial enzymes for dairy processing. *Current Science*, 77: 143-148.
2. Bailey, M. J. and Siika-Aho, M.(1988). Production of microbial rennin. *Biotechnology Letters*, 10:161-166.
3. Escobar, J. and Barnett, S.(1995). Synthesis of acid protease from *Mucor miehei*: integration of production and recovery. *Process Bioch.*, 30: 695-605.
4. Thakur, M. S. and Karanth, N. G.(1990). Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32: 409-413.
5. Beyenal, H.; Seker, S.; Salih, B. and Tanyolac, A.(1999). The effect of D-glucose on milk clotting activity of *Mucor miehei* in a chemo stat with biomass retention. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*,74: 527-532.
6. de-Silveira, G.; de Olivera, G. M.; Ribeiro, E. J.; Monti, R.(2005). Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. *Food Science and Technology*, 48.
7. Fernandez-Lahore, H. M.; Auday, R. M.; Fraile, E. R..; Biscoglio de Jimenes boniono, M.; Pirpigani L.(1999). Purification and characterization of acid protease from mesophilic *Mucor* sp. Solid –state cultures. *The Journal of Peptide Resarch*, 53: 599-605.
8. Arima, K.; Yu, J. and Iwasaki, S.(1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pussilus* var. *lind*. *Method in Enzymology*,19: 446-460.
9. Veldkamp, H.(1970). Enrolment cultures of prokaryotic organisms. In: Method in microbiology (ed. J. R. Norris and D. W. Ribbons) Vol.3A, Academic press, London.
10. Davis, N. D. and Blevins, W. T.(1979). Methods for laboratory fermentation.
11. Herring, M. F. and Macanese, M. E.(1976). Laboratory method, in food and dairy microbiology. Academic press, New York.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

12. Domsch, K. H.; Grams, W. and Anderson, T. H.(1980). Compendium of soil fungi, Vol. 1. Academic press, New York.
13. Kumar, P. K. R. and Lonsane, B. K.(1987). Gibberellic acid by solid state fermentation. Consistent and improved yields. *Biotech. Bioeng*., 30 (2): 267-271.
14. Nigam, P. and Singh, D.(1994). Solid state (subtract) fermentation system and their application in biotechnology. *J. Basic Microbiology*.
15. Knapp, J. S. and Howell, J. A.(1980). Solid bustard fermentation. In: Topics in enzyme and fermentation biotechnology (ed. A. Wiseman) Vol. 4 Millis Harwood L. td. Chi Chester.
16. Abdullah, A. I.; Tengerdy, R. P. and Murphy, V. G.(1985). Optimization of solid state fermentation of wheat straw. *Biotech. Bioeng.*, 27 (1): 20-27.
17. Kim, J. H.; Hosobuchi, M.; Kishimoto, M.; Seki, T. and Ryn, D. D. Y.(1985). Cellulose production by a solid state caitara systems. *Biotechn. Boeing*., 27: 1445-1450.
18. Berry, D. R.(1975). The environmental control of the physiology of filamentous fungi .In; The Filamentous funfi Vol.1 Edward Arnold-London.
19. سعيد، أكرم ثابت محمد (1996). انتاج الاميليزات من الفطر *Aspergillus omatus* group المتحمـــل للحرارة العالية بوساطة تخمرات الحالة الصلبة. رسالة دكتوراه كلية الزراعة/جامعة بغداد.
20. Bull, A. T. and Bushnell, M. E.(1976). Environmental control of fungal growth..In: The filamentous fungi (ed. J. E. Smith and D. R. Bery) Vol.2, Edward Arnold, London.
21. Anderson, J. G. and Smith, J. R.(1976). Effect of temperature of filamentous fungi, Applied Bacteriology, Academic Press, New Yourk.
22. Kargi, F.; Curme, J. A. and Sheehan, J. J.(1985). Solid state fermentation of sweet sorghum to ethanol. *Biotech. Bioeng*., 27 (1): 40-34.
23. Wang, D. I. C.; Cooney, L. C.; Demand, A. L.; Dunn, J. I.( ) fermentation and enzymes technology, J. Wiley and Sons, New York.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com