مجلة الزراعة العراقية مجلد15 عدد2 ص 102-112 تشرين الأول/2010

دراسة بعض خواص ببسين معدة اسماك الجري وتأثير بعض المضافات في فعاليتها الانزيمية

خالدة عبد الرحمن شاكر مازن جميل هندي دينا سعاد علي

الملخص

اجريت الدراسة الحالية للتعرف على بعض خواص انزيم الببسين بنوعيه (B وA) المعزولة من معدة اسماك الجري والمتمثلة بالرقم الهيدروجيني الامثل ودرجة الحرارة المثلى للفعالية التحللية ولثبات تلك الانزيمات وكذلك شملت الدراسة تأثير بعض المضافات الكيميائية (الكواشف) مثل EDTA، IAA و pepstatin وتأثير اضافة كل من كلوريد الكالسيوم وكلوريد الصوديوم الى وسط التفاعل في فعاليتهما التخثرية فضلا عن تقدير نسبة الفعالية التخثرية الى الفعالية التحللية للمستخلص الخام للنوع A ومقارنتها بمنفحة العجول. وتم تعيين الثوابت الحركية للنوع A بالاضافة الى طاقة التنشيط. اشارت النتائج الى ان رقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التحللية لكلا نوعي الببسين (B وA) هي 5.5 في درجة حرارة 37م وباستخدام الكازين كمادة اساس. في حين فقدت الانزيمات فعاليتها بالكامل عند الرقم الهيدروجيني (7). واحتفظ كلا النوعين بحوالي 95% من فعاليتهما التحللية لدى حضنها على ارقام هيدروجينية (6.5 – 4.5) وعلى درجة حرارة 35م لمدة 30 دقيقة. شهدت الفعالية التحللية لكليهما زيادة مع ارتفاع درجة حرارة وسط التفاعل حتى بلغت اقصاها عند درجة الحرارة 37م واختفت الفعالية بالكامل عند درجة حرارة 53م.

اوضحت نتائج استخدام الكواشف المشار اليها اعلاه ان كلا النوعين لا ينتميان الى أي من البروتيزات السيرينية، الثايول او المعدنية. وكان تأثير كلوريد الكالسيوم ايجابياً ولغاية تركيز 5 ملي مولار بخلاف كلوريد الصوديوم الذي اثر سلبا في الفعالية التخثرية. بلغت نسبة الفعالية التخثرية الى الفعالية التحللية للمستخلص الخام للنوع A (13.66) مقارنة مع 19.65 لمنفحة العجول. وكانت صلابة الخثرة الناتجة بأستعمال النوع A اقل بالمقارنة مع منفحة العجول. بلغت قيم Km وVmax للنوع A تجاه الهيموغلوبين 0.81 ملغم/مل، 498 مايكرو مول/دقيقة على التوالي في حين كانت طاقة التنشيط لها 19800 سعرة/مول.

المقدمة

يعد الببسين (1، 2، 5، 23) من البروتيزات الحامضية والتي تستخدم بنجاح في صناعة الجبن كبديل كلي او جزئي لمنفحة العجول لما يمتاز به من صفات تماثل المنفحة وهو الانزيم الذي يشكل ما يقارب 94.88% من منفحة العجول الرضيعة (15، 28). وتتفاوت هذه النسبة اعتماداً على عمر الحيوان، وافاد بعض الباحثين بنجاح مستخلص ببسين معدة الاغنام والماعز في صناعة الاجبان (2، 8، 23). تناولت الدراسات في منتصف الثمانينات البحث عن بدائل المنفحة التقليدية من الاحياء المائية حيث قام Brewer وجماعته (12) باستخلاص بديل المنفحة من معدة الكود الاطلسي وتمكن Zall وChen (13،14) من استخلاص بديل المنفحة من حيوان البطلينوس واستخدامه بنجاح في صناعة جبن الجدر. واستخلص Tavares وجماعته (31) الببسين من معدة سمك التونة واستخدم في صناعة الجبن الطري. وفي عام 2009 تمكن Tao وجماعته (30) من توصيف الببسين والببسينوجين المستخلص من معدة *Anguilla anguilla*. ودرس Qiong وجماعته (26) حركيات الببسين المنقى من معدة أبراميس البحر Houthuyn *Sparuslu latus*.

جزء من رسالة ماجستير للباحث الثالث.

كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق.

تاريخ تسلم البحث: آيار/2009.

تاريخ قبول البحث: شباط /2010.

يعد دراسة صفات اوخواص الانزيم ذات اهمية كبيرة لتوصيف الانزيم وتعيين ظروف عمله ومدى صلاحه لصناعة معينة دون غيرها. كما ان تأثير المواد المضافة في تحفير فعالية الانزيمات اوتثبيطيها تعد مؤشرا لانتماء الانزيمات الى مجموعة انزيمية معينة دون الاخرى. ولكون الانزيمات مواد بروتينية فهي تتأثر بالتغيرات الحاصلة في درجات الحرارة والرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل سواء كان ذلك سلباً او ايجاباً. ويعرف البيسين من الانزيمات الحساسة تجاه التغيرات الحاصلة في درجات الحرارة والارقام الهيدروجينية لوسط التفاعل (27). وتتفاوت شدة تأثير هذه العوامل بأختلاف مصدر الانزيم ودرجة نقاوته وكيفية اجراء المعاملة الحرارية, وأشارت مراجع عديدة الى تأثير كل من املاح الصوديوم والكالسيوم على الفعالية التخثرية للانزيم (16، 33، 34، 38).

كما تتأثر فعالية انزيم البيسين التخثرية ببعض المضافات الكيميائية التي تضاف الى الحليب لتحسين صناعته او لزيادة قابلية حفظه فللبعض منها تأثير ايجابي وللبعض الاخر تأثير سلبي وتستهدف دراسة الثوابت الحركية كأنزيمات التعرف على تخصص الانزيم وألفته تجاه مواد اساس مختلفة، اذ ان قيمة **Km** يتيح للمقارنة بين الانزيمات من مصادر مختلفة فيما اذا كانت متماثلة جزئياً او كلياً او انها مختلفة لكنها تنشط التفاعل ذاته. ويساهم **Km** في معرفة الملاءمة النسبية لمواد التفاعل المختلفة لآنزيم معين لكونه دليلا على الالفة الظاهرية للانزيم تجاه مادة التفاعل (29). تناول بعض الباحثين تأثير المواد المختلفة في فعالية البروتييزات الحامضية بغية التعرف على طبيعة المجموعات الموجودة في مواقعها الفعالة واستيعاب جانب من أليافها الحفزية واهتم البعض الاخر بالجوانب التصنيعية فدرسوا تأثير المواد التي يحتمل انتقالها الى الحليب بشكل او بأخر في الفعالية التحللية والتخثرية للبروتييزات المستخدمة كمخثرات في صناعة الجبن مثل المطهرات والمنظفات والمواد الحافظة والمضادات الحيوية وغيرها (4، 7). واستناداً الى ذلك هدفت الدراسة الحالية الى التعرف على بعض صفات البيسين المستخلص في دراسة سابقة من معدة سمك الجري ***Siluris glanis*** المتوفرة في الاسواق المحلية (6) وتأثير تلك العوامل في صفات الانزيم بغية الاستفادة منه على الوجه الصحيح في مجال الصناعات الغذائية وغيرها من الصناعات.

مواد وطرق البحث

الانزيمات

1- تم الحصول على الانزيم قيد الدراسة (البيسين) بأستخلاصه من معدة اسماك الجري (***Siluris glanis***) الطازجة المتوفرة في الاسواق المحلية حسب الطريقة التي وصفها **Fox** و**O'leary** (27) واجريت لها عملية تنقية وتوصيف وكما جاء في دراسة سابقة (6).

2- المستحضر التجاري لمنفحة العجول **Calf rennet** المجهز من شركة **Chris Hansen** الدنماركية.

تقدير الفعالية التخثرية

قدرت حسب الطريقة الموصوفة من قبل **Kawai** و**Mukai** (21), وعرفت وحدة الفعالية التخثرية بأنها كمية الانزيم التي تخثر 10مل من الحليب الفرز بتركيز 10% المسترجع في 0.01 مولار كلوريد الكالسيوم لمدة 40 دقيقة/35مْ.

تقدير الفعالية التحليلية

قدرت طبقا لطريقة **Murachi** (24) وعرفت وحدة الفعالية التحليلية بأنها كمية الانزيم التي تحرر واحد مايكرو مول من التايروسين في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

تقدير الثوابت الحركية للانزيم (Vmax و Km)

قدرت بتحضير محلول الهيموغلوبين الممسوخ بالحامض وبرقم هيدروجيني 2 في داريء Hydrochloric acid-potassium chloride) بتراكيز متدرجة تراوحت بين 50-1% حسبت السرعة القصوى Vmax وثابت ميكيلس Km من رسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتراكيز المواد الاساس وبخمس طرائق (29) وهي:

Line Weaver-Burk plot
Woolf-Augustinsoon Hof stee plot
Hanes-Woolf plot
Eadia-Scotchard plot
Eisenthal-Cornish-Bowden plot

تأثير اضافة كلوريد الصوديوم في الفعالية التخثرية: قدرت الفعالية التخثرية بعد اضافة كلوريد الصوديوم بالنسب (0-10) غم/100 مل حليب مسترجع وبحسب الطريقة التي اشير اليها سابقاً.

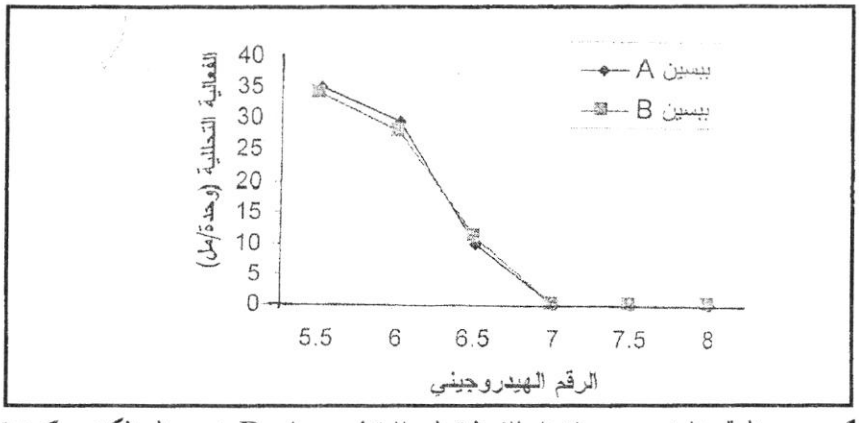
تأثير اضافة كلوريد الكالسيوم على الفعالية التخثرية: قدرت كسابقاتها وبإضافة كلوريد الكالسيوم الى وسط التفاعل بتراكيز متدرجة تراوحت بين 0-10ملي مولار/لتر.

تأثير اضافة بعض المواد الكيميائية في الفعالية التخثرية والتحللية للانزيم: حضرت محاليل Iodoacetic acid (IAA) Pepstatin, EDTA، بتركيز 10 ملي مولار ومثبط التربسين (STI) Soybean Trypsin Inhibitor بتركيز 0.25 ملغم/مل . حضن الانزيم مع المحاليل المذكورة في35 م/30 دقيقة ثم قدرت الفعالية التخثرية والتحللية المتبقية كنسبة مئوية من فعالية الانزيم غير المعامل.

قياس قوة شد الخثرة: قدرت حسب الطريقة الموصوفة من قبل محي الدين (7) وعبر عن قوة شد الخثرة بسرعة حركة العمود داخل الخثرة (سم/دقيقة).

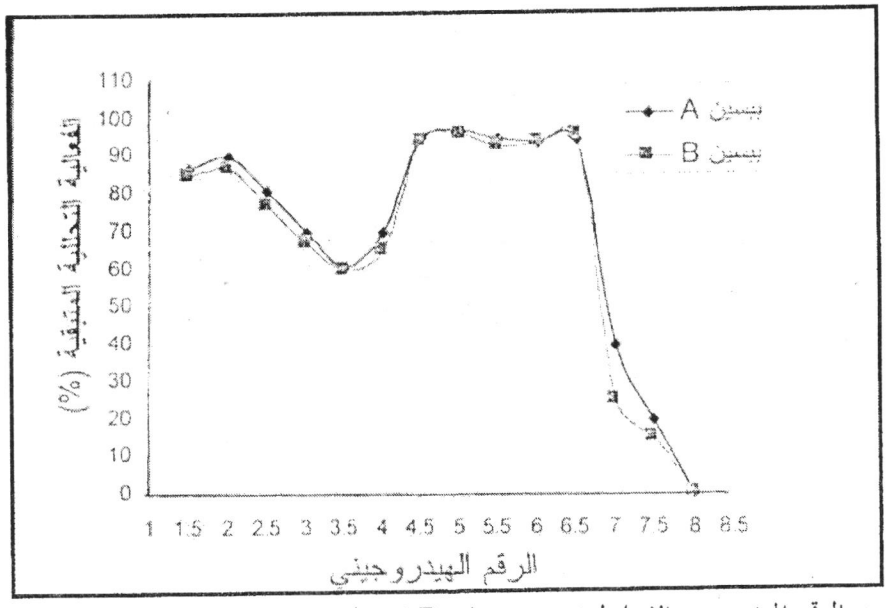
النتائج والمناقشة

يوضح الشكل (1) الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التحللية لببسين (B و A) بأستعمال الكازين كمادة اساس، اذ أظهرت الانزيمات اعلاه فعالية تحللية عالية عند الرقم الهيدروجيني الحامضي 5.5 وهذا يجعله مناسباً للاسراع في انضاج الاجبان الجافة والشبه الجافة وفي ذلك اهمية اقتصادية. كما لوحظ من الشكل ذاته انخفاض الفعالية التحللية لهما عند الرقم الهيدروجيني القريب من التعادل وهذا يساهم في حفظ الاجبان الطرية ومنها الجبن الطري العراقي ذي الرقم الهيدروجيني 6.5 – 6.8 من التحلل البروتيني الذي يعد غير مرغوب فيه.



شكل 1: منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التحللية لببسين A وB باستعمال الكازين كمادة اساس

يوضح الشكل (2) المدى الامثل لثبات ببسين B وA تجاه قيم رقم الهيدروجين المختلفة, اذ لوحظ ان كليهما احتفظا بما يقارب 95% من فعاليتهما التحللية لدى حضنها عند الارقام الهيدروجينية 4.5-6.5 لمدة 30 دقيقة وعلى حرارة 35م. وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما توصل اليه كل من Arunchalaua و Haard (11) عند دراستهما لببسين معدة اسماك *Boredgadus saida* والمنقى كليا اذ بلغ 4-6.5. واشار Xu وجماعته (36) الى ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم الببسين المستحصل من معدة سمك *Optastothus atlonticus* تراوح بين 2-6. وقد يعزى السبب في اختلاف نتائج هذه الدراسة عن نتائج الاخرين الى اختلاف نوع (طبيعته التركيبية) ومصدر الانزيم وظروف الاختبار (35).

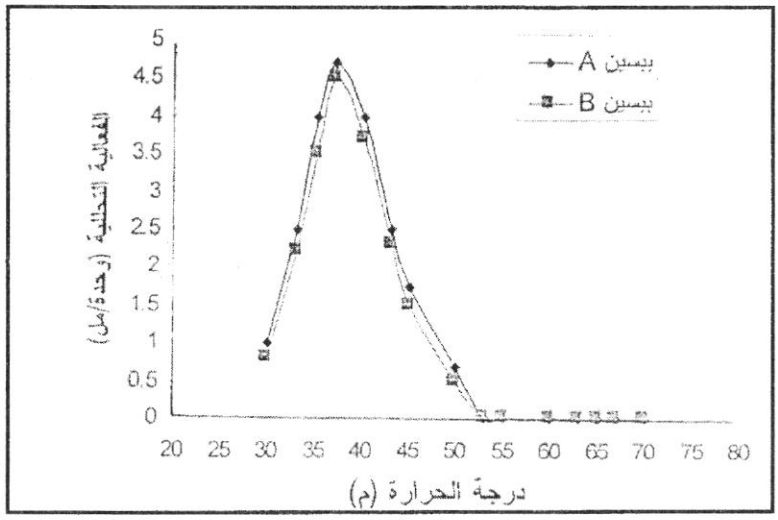


شكل 2: منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات ببسين A وB في محاليل دارئة بارقام هيدروجينية مختلفة وبدرجة حرارة 35م ولمدة 30 دقيقة

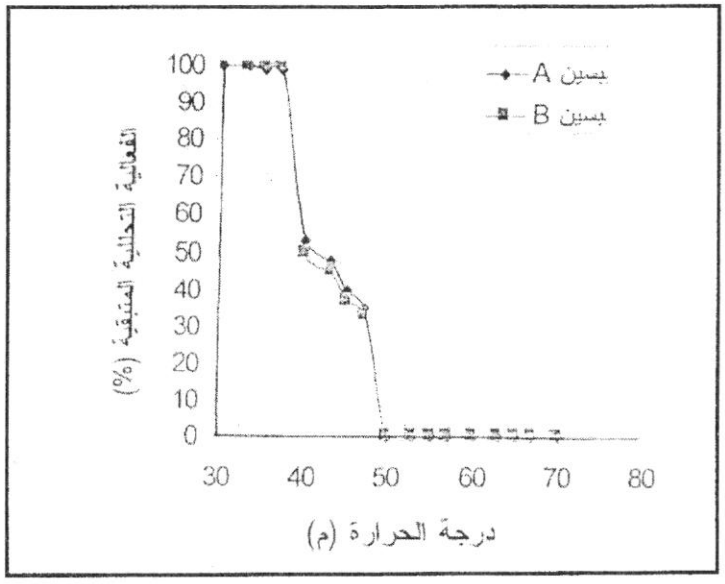
اما منحني تأثير درجة الحرارة على الفعالية التحللية للانزيمات التي هي قيد الدراسة فهي موضحة في الشكل(3) أذ يلاحظ ازدياد الفعالية التحللية مع زيادة درجة الحرارة حتى بلغت اقصاها عند 37°م وان كلتيهما فقدتا الفعالية بالكامل عند رفع درجة حرارة وسط التفاعل الى 53°م وجاءت هذه النتائج متفقة مع ماذكر Xu (36) عند دراستهم لببسين معدة سمك *Hoplethus atlanticus* وكذلك كانت مقاربة الى ما وصل اليه Gildbery و Raa (18) في دراستهم لببسين معدة سمك *Mallotus villosus* الذي اظهر أعلى فعالية تحللية عند درجة حرارة 38م واختلفت نتائج هذه الدراسات عن ما وجده Noda و Mulakami (25) اذ وجد ان الحرارة المثلى للفعالية التحللية المتناظرين لببسين معدة سمك *Sardinos meianos* كانت 55 و40م على التوالي كما اختلفت مع ماشار اليه القريشي (3) في ان البروتييزات (A1 وA2) التي حصل عليهما من مستخلص البنكرياس الكبدي لسمك الكارب العادي (*Cyprinos carpio* L.) بلغت اعلى فعاليه لها عند الارقام الهيدروجينية 7.5 و7 على التوالي.

يشير الشكل (4) الى الثبات الحراري لكلا الانزيمين A وB اذ لوحظ احتفاظهما بكامل فعاليتهما التحللية لدى حضنهما في درجات حرارة تراوحت بين 30-37م لمدة 15 دقيقة وشهدت تلك الفعالية انخفاضا مع ارتفاع درجة حرارة الحضن حتى اختفت بالكامل عند درجة 50°م واستناداً الى هذه النتائج يمكننا القول ان هذه الانزيمات بإمكانها المساهمة في انضاج الاجبان التي لا تتجاوز حرارة سمط الخثرة فيها 40°م. اذ ان بقايا المخثرات في خثرة الاجبان تعد واحدة من العوامل الاربعة التي تساهم في عملية الانضاج (3). وجاءت هذه النتائج غير متفقة مع ماوجده سعيد (8) في

ان ببسين الخنزير والكايموسين فقدتا فعاليتهما عند 65°م، فيما اشار Amer وجماعته (10) وربما يعزى السبب الى اختلاف ظروف الاختبار واستخدام الكايموسين النقي بدلا من المنفحة التقليدية التي تحتوي على الببسين.



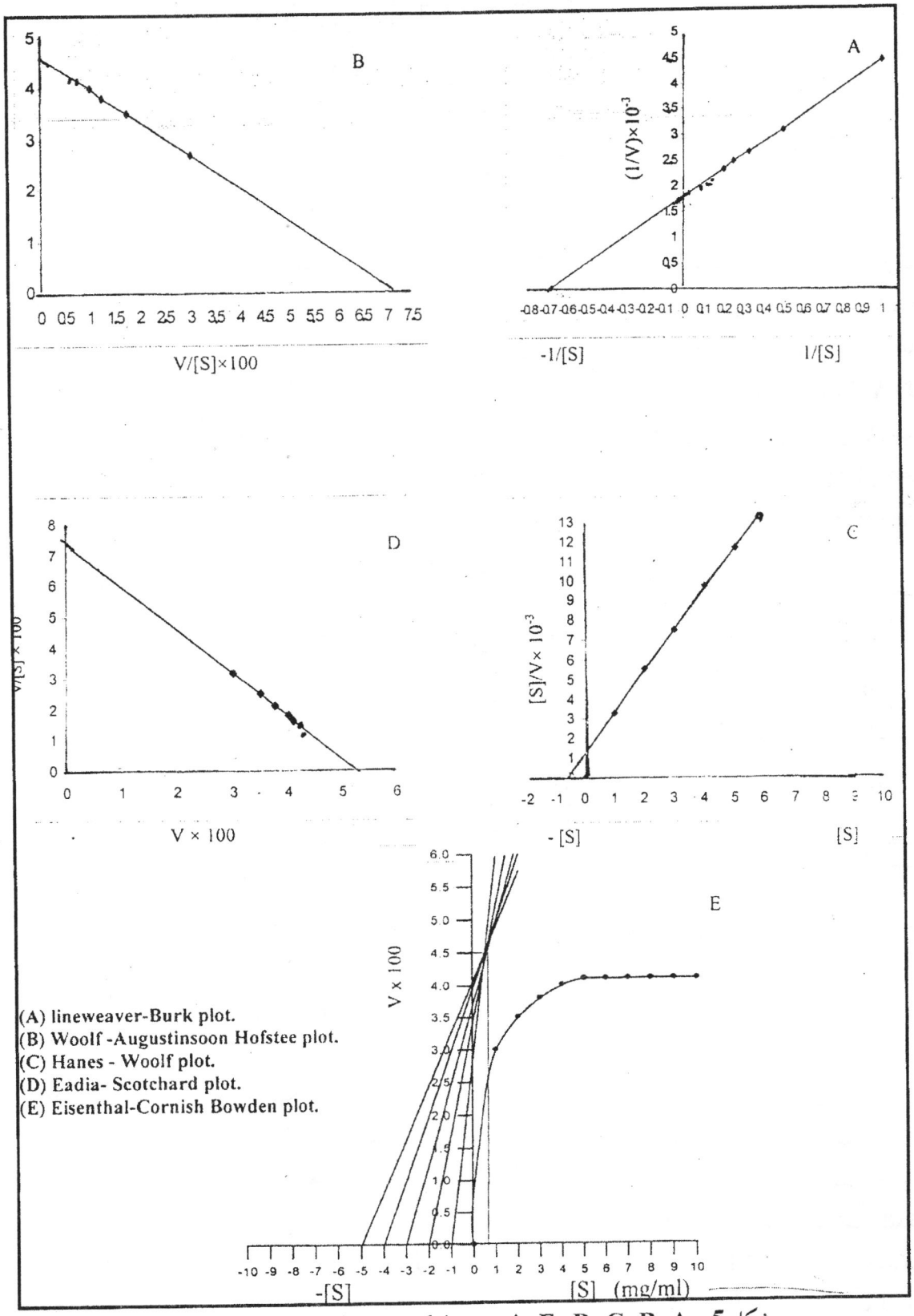
شكل 3: منحنى درجة الحرارة المثلى للفعالية التحللية لببسين A وB باستخدام الهيموغلوبين كمادة اساس



شكل 4: تاثير المعاملة الحرارية في فعالية الانزيم التحللية لببسين A وB لمدة 15 دقيقة في محلول الخلات–الفوسفات الدارئ بتركيز 0.01 مولر ورقم هيدروجيني 5.5

اشارت نتائج دراسة الثوابت الحركية شكل (5) وجدول (1) الى ان معدل قيمة ثابت ميكيلس (km) والسرعة القصوى (Vmax) عند استخدام الهيموغلوبين كمادة اساس هي 0.8ملغم/مل و498 مايكرومول/دقيقة على التوالي، واختلفت هذه النتائج عن تلك التي حصل عليها Arunachalaua و Haard (11) اذ وجد ان km وVmax للببسين المنقى من معدة سمك الكود القطبي 1.33ملي مولار و556 مايكرومولار/دقيقة على التوالي عند استخدام الهيموغلوبين كمادة اساس. اما القريشي (5) فقد وجد ان قيم Km و Vmax للبروتيزات (A1 وA2) المنقاة من البنكرياس الكبدي لسمك الكارب العادي هو 0.65،0.60 ملغم/مل و10.33،9.77 مليمول/دقيقة. وذكر Qiong وجماعته (26) ان قيم (km) تجاه الهيموغلوبين للببسينات التي حصل عليها من *Sparus latus* Houttuyn بلغت 8.7×10^{-8}، 8.6×10^{-8} و7.3×10^{-8} مولار على التوالي. في حين وجد Tao وجماعته (30)

ان قيم (km) لانواع البسين التي حصل عليها من معدة *Anguilla anguilla* كانت بين 8.8×10^{-5}، 9.2×10^{-5} و7×10^{-5} مولار على التوالي.



شكل 5: (A، B، C، D وE) الثوابت الحركية لانزيم البسين A تجاه الهيموغلوبين

جدول 1: الثوابت الحركية لانزيم الببسين المنقى من معدة سمك الجري تجاه الهيموغلوبين

Vmax µmole/min	Km mg/ml	طريقة التقدير
555	1.42	Lineweaver-Burk plot
465	0.65	Woolf-Augustinsoon Hofstee plot.
500	0.6	Hanes-Woolf plot
520	0.68	Eadia-Scotchard plot
450	0.70	Eisenthal- Cornish Bowden plot
498	0.81	المتوسط الحسابي

تأثير بعض المضافات في فعالية الانزيم

يوضح جدول (2) تأثير كل من IAA, EDTA, Pepstatin بتركيز 10 ملي مولار و STI بتركيز 0.25 ملغم/مل في الفعالية التخثرية والتحللية للانزيمات قيد الدراسة بينت النتائج المستحصلة عدم وجود تأثير IAA في الفعالية التخثرية وكان تأثيره في الفعالية التحللية محدودا وهذا يشير الى عدم احتواء الانزيم على مجموعة السلفاهيدرل (SH) في الموقع الفعال له اي انه ليس من بروتيزات الثايول (23) وان عدم انخفاض فعالية الانزيم عند اضافة EDTA يؤكد انه ليس من البروتيزات المعدنية (17) ان عدم تأثر هذه الانزيمات بوجود SII دليلا على انها ليست من الانزيمات الشبيه بالتربسين اي انها ليست من بروتيزات السيرنية وجاءت هذه النتيجة متفقة مع ما حصل عليه Lopez وجماعته (22) اذ لاحظوا بأن مثبط التربسين لايثبط فعالية البروتيزات المستخلصة من معدة سمك أبراميس البحر seabream.

جدول 2: تأثير بعض المضافات في فعالية ببسين Aو B المنقاة من معدة سمك الجري

العوامل	التركيز (ملي مولار)	الفعالية النسبية			
		الفعالية التخثرية		الفعالية التحللية	
–	–	A	B	A	B
انزيم غيرمعامل	–	100	100	100	100
EDTA	10	110	109	108	107
STI	0.25 ملغم/ مل	100	100	100	100
IAA	10	100	100	98	97
Pepstatin	10	0	0	0	0

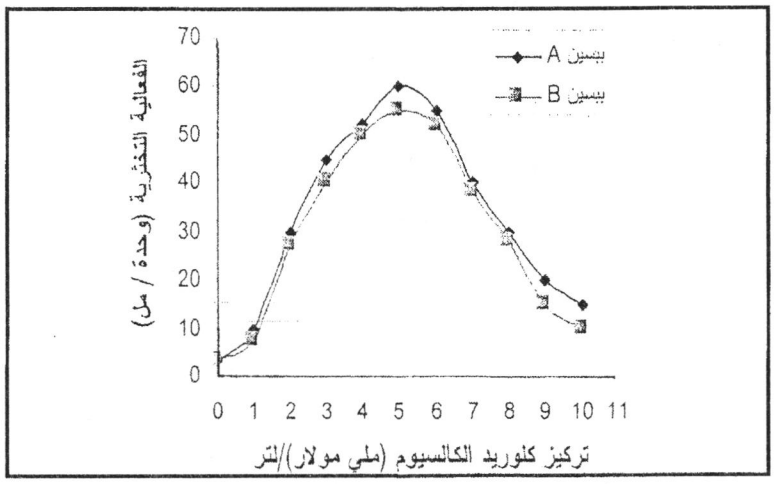
EDTA :Ethylendiaminetetraacetic acid، STI :Soybean trypsin Inhibitor ، IAA: Iodoacetic acid.

اظهر البيستاتين تأثيرا مثبطا في الفعالية التخثرية التحللية لببسين A,B وهذا دليل واضح على انهما من البروتيزات الحامضية وجاءت هذه النتيجة متفقة مع ما حصل عليه كل من Yamada وجماعته (37)، Lopez وجماعته (22) اذ وجدوا ان للبيستاتين تأثيرا مثبطا في فعالية بروتيز معدة الاسماك.

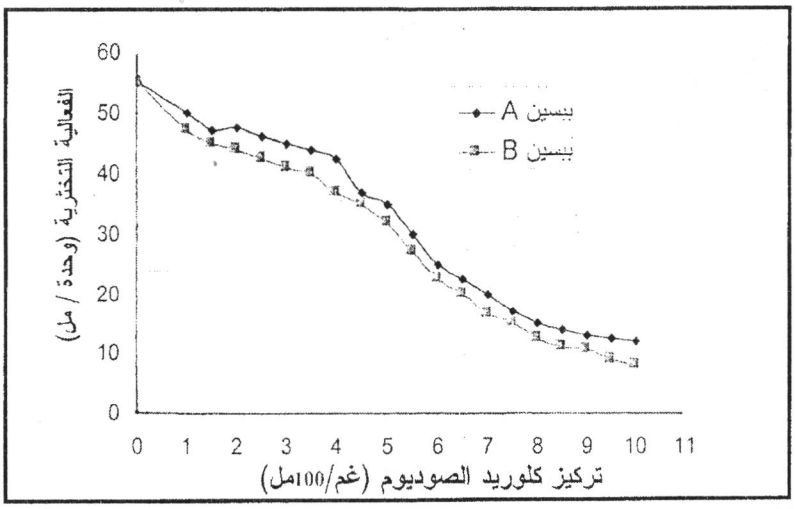
واستناداً الى هذه النتائج يبدو ان ببسين B,A من البروتيزات الحامضية او الاسبارتية لكونهما ذوي رقم هيدروجيني واطىء ولعدم حساسيتهما تجاه مثبطات البروتيزات الاخرى ولكونهما حساستين تجاه البيستاتين.

يوضح الشكلان (6 و7) تأثير اضافة 0–10 ملي مولار/لتر من كلوريد الكالسيوم وكلوريد الصوديوم كل على انفراد في فعالية كل من ببسين A وB التخثرية اذ لوحظ ازدياد الفعالية التخثرية لهما مع زيادة تركيز كلوريد الكالسيوم ولغاية 5 ملي مولاراذ بلغت 60 وحدة/مل للانزيم A و 55 وحدة/مل للانزيم B وبعدها بدأت الفعالية التخثرية بالانخفاض حتى بلغت 18 وحدة/مل و12 وحدة/مل على التوالي عند نسبة اضافة 10 ملي مولار. ويذكر ان لايونات الكالسيوم دور في تجمع اجزاء الباراكازين وكذلك في تحضير الموقع الفعال للانزيم (9) وان التراكيز العالية منه

يسبب ارتفاع تأثير القوة الايونية وبالتالي يثبط فعالية الانزيم (8). وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما حصل عليه Haard (20) من ان زيادة تركيز ايونات الكالسيوم والى مدى معين يسبب زيادة الفعالية التخثرية لبيسين معدة الاسماك.



شكل 6: تاثير كلوريد الكالسيوم في الفعالية التخثرية لانزيم البيسين A وB من معدة سمك الجري



شكل 7: تاثير كلوريد الصوديوم في الفعالية التخثرية لانزيم البيسين A وB من معدة سمك الجري

ادت زيادة تركيز كلوريد الصوديوم الى انخفاض فعالية الانزيمات قيد الدراسة ولوحظ ان حساسية بيسين B كان اكبر من حساسية بيسين A. وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما حصل عليها El-Abbassy و Wahbba (16) اذ وجد ان زيادة تركيز كلوريد الصوديوم ادى الى زيادة زمن تجبين الحليب بفعل بيسين الغنم والخنزير ومنفحة العجول. ويعزى السبب الى حدوث تنافس بين ايونات الصوديوم المضافة وايونات الكالسيوم الموجودة اصلا في الحليب للارتباط بمجموعة الفوسفات مما يقلل من فرصة تكوين اواصر فوسفات الكالسيوم بين اجزاء الكازين لتكوين شبكة الخثرة في المرحلة غير الانزيمية للتجبن وهذا ينعكس سلباً على زمن التجبن ان تزداد وعند الاستقرار في زيادة تركيز ايونات الصوديوم تثبط عملية التجبن بسبب منع تكوين اواصر فوسفات الكالسيوم وبالتالي عدم تكون شبكة الخثرة وترسبها (1، 8). وتأتي أهمية دراسة تأثير هذه الاملاح من استخدامها في صناعة الجبن (7).

نسبة الفعالية التخثرية/الفعالية التحللية

يوضح الجدول (3) ان نسبة الفعالية التخثرية الى الفعالية التحللية للانزيم الخام كانت اقل من تلك التي للمنفحة التقليدية اذ بلغت 13.66 و19.65 على التوالي وجاءت هذه النتائج متفقة مع ماوجده Guerard وGal (19) عند

تقدير هذه النسبة للمستحضر المستخلص من معدة سمك *Scyliorhinut canicula* كما جاءت هذه النتائج متفقة مع ما اشارت اليه دراسات اخرى شملت انزيمات ميكروبية ويعود السبب الى ارتفاع الفعالية التحللية لبدائل المنفحة بالمقارنة مع منفحة العجول اذ ان الاخيرة اكثر تخصصا في مهاجمتها لبروتينات الحليب (7).

تعد دراسة هذه النسبة من المعايير المهمة في اعتماد بدائل المنفحة التقليدية تنعكس هذه النسبة على قوة الخثرة المتكونة بفعل الانزيمات المخثرة للحليب وتبرز اهمية قوة الخثرة من الناحية التصنيعية لعلاقتها المباشرة بنسبة تصافي الجبن الناتج وكذلك ظهور عيوب في قوام ونكهة الجبن وصفات العديد من العوامل التي تؤثر في قوة الخثرة (درجة حرارة التخثر, تركيز ايونات الكالسيوم والرقم الهيدروجيني للحليب وغيرها ...). اوضحت نتائج دراسة قوة الخثرة (جدول 4) من استخدام المستخلص الخام للانزيم قيد الدراسة الى انها بلغت **0.58** سم/دقيقة مقارنة بتلك لمنفحة العجول والبالغة **0.50**سم/دقيقة وهذه تعبر عن سرعة حركة عمود الثقل البالغ **170**غم داخل الخثرة المضرة. ويعزى الاختلاف الطفيف بين المعاملتين الى عوامل فيزيائية او لاختلاف ظروف التجربة وليست لاختلاف تأثير الانزيم ولغرض حسم الموضوع يجب القيام بدراسات اعمق واعتماد وسائل قياس ريولوجية واجهزة اكثر تطوراً.

جدول 3: نسبة الفعالية التخثرية/الفعالية التحللية للمستخلص الخام للانزيم Aمقارنة مع منفحة العجول المستخدمة في صناعة الجبن الطري

نوع المخثر ومصدره	الفعالية التخثرية/الفعالية التحللية
الانزيم A	13.66
منفحة العجول	19.65

جدول 4: قوة شد الخثرة للمستخلص الخام للانزم قيد الدراسة مقارنة مع منفحة العجول في صناعة الجبن

نوع المخثر ومصدره	قوة شد الخثرة سم/دقيقة
الانزيم A	0.58
منفحة العجول	0.50

المصادر

1- الامير، فيصل عزيز (1984). فصل الانزيمات المخثرة من بعض الخضر المحلية ودراسة طبيعتها. رسالة ماجستير –كلية الزراعة– جامعة صلاح الدين، العراق.

2- المزين، قحطان احمد؛ نعيمة احمد سعيد وكلزار اسماعيل الجاف (1992). استخلاص و عزل بعض انزيمات الماعز المعدية. مجلة زراعة الرافدين، **24** (**1**) :**109 – 118** .

3- المزين، قحطان احمد (1993). دراسة بعض صفات ببسين الماعز. مجلة زراعة الرافدين: **25**(2) **55–61** .

4- السراجي، أنتصار حسن (1996). انتاج مخثر من عفن ***Trichoderma hamatum*** ودراسة خواصه واستخدامه في صناعة الجبن الطري. أطروحة دكتوراه–كلية الزراعة– جامعة البصرة، العراق.

5- القريشي، عبدالعال فرحان (2009). دراسة بعض صفات البروتييزات المنقاة من البنكرياس الكبدي لسمك الكارب العادي (*Cyprinos carrpio* L.). مقبول للنشر. مجلة الزراعة العراقية (البحثية).

6- حمادي, دينا سعاد (2001). فصل وتنقية وتوصيف الببسين من معدة اسماك الجري ***Siluris glanis***. رسالة ماجستير –كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

7- محي الدين، محمد عمر (1998). تنقية وتوصيف انزيم البروتيز الحامضي بديل المنفحة – المنتج من العفن ***Rhizomucor miehei*** MO–96. أطروحة دكتوراه –كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

8- سعيد، نعيمة احمد (1988). عزل ودراسة خواص الببسين من الاغنام المحلية. رسالة ماجستير– كلية الزراعة – جامعة الموصل، العراق.

9- **Al-Mzaien, K.A. (1985). Chicken pepsin: Isolation, characterization and assessment of its suitability as a rennet substitute. Ph.D. thesis, National University of Ireland, Ireland.**

10- Amer, S.N.; M.R. Naghnoush; A.H. Fahmi and A.A. Ismail. (1980). Purification and characterization of milk clotting enzymes. (1) Enzymes obtained from adult bovine rennet. Egyptian. J. Dairy Sci., 8:25-34
11- Arunchalam, K. and N.F. Haard (1985). Isolation and characterization of pepsin from polar cod *(Boreogadus suida)*. J. Biochem. Physiol., 80B: 467-473.
12- Brewer, P.; N. Helbig and N. F.Harad (1984). Atlantic Cod Pepsin-Characterization and use as a rennet substitute. J. Food Sci. Technol., 17 (1): 38-43.
13- Chen, H. C. and R. R. Zall (1986a). Partial purification and characterization of Cathepsin- D like protease from surf clam viscera. J. Fd. Sci., 51(1): 71-77.
14- Chen, H.C. and R.R. Zall (1986 b). Evaluation of thiol activated protease from clam viscera as a rennet substitute for cheese making. J. Fd. Sci., 51(3): 815- 852.
15- Dalgleish, D.(1982). The enzymatic coagulation of milk in "Developments in dairy: 1.protein" (ed by P.F. Fox) Applied Science Publisher, London.
16- El-Abbassy, F. and A. Wahba (1986). Studies on camel pepsin.1- Effect of some additives. Egyption J. Dairy Sci., 14:181.
17- Fullbrook, P.D. (1983). Practical limits and prospects.In "industerial enzymology" the application of enzymes. T. Goddfery and J. Reichelt, (eds). The natural Press. London.
18- Gildberg, A.and J. Raa (1983). Purification and characterization of pepsin from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). J. Biochem Physiol, 75A: 337-342
19- Guerard, F. and Y.L. Gal (1987). Characterization of chymosin –like pepsin from the dog fish (*Scyliorhinus canicula*). J. Comp .Biochem. Physiol., 88B (3): 832-827.
20- Haard, N.F. (1986). Atlantic cod gastric protease characterization with casein and milk substrate and influence of sepharose immobilization on salt activation ,temprature characteristics and milk clotting reaction. J. Food Sci., 51(2):313-316
21- Kawai, M. and, N. Mukai (1970). Studies on milk-clotting enzymes produced by *Basidomycetes* part 1-Screening tests of *Basidiomycets* of milk-clooing enzymes. Agric. Biol. Chem., 34 (1): 154-166.
22- Lopez, M.D.; F.L. Carreno; and M.Toro (1998). Characterization of fish proteases by substrate. Gel electrophorses, Comparative Biochem. and Physiology. Part B, Biochem. and Molecular Biology, 121(4):369-377.
23- Means, G.E. and R.E. Feeny (1971). Chemical modification of proteins. Holden. Dey Inc. San Francisco.
24- Murachi, T. (1970). Bromelain enzymes. In: Methods in enzymology. Vol. 19. Ed. by: G. E. Perlman and I. Lorand. Academic press. New York.
25- Noda, M. and K. Murakami (1981). Studies on a proteinase from the digestive organs of sardine. 1-Purification and characterization of three alkaline proteinases from the *pyloric caeca.* J. Biochem. Biophys. Acta., 65B:17-26 .
26- Qiong Zhou, Xiao-Ping Fu, Ling-Jing Zhang, Wen-Jin Su, and Min-Jie Cao (2007). Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus* Houttuyn) pepsinogens and pepsins. Food Chemistry, 103(3): 795-801
27- O'leary, P.A. and P.F. Fox (1975). A procedure for the isolation of gastric enzymes. J. Dairy Res., 42: 445.
28- Picon, A.; M. Meding and M. Munez (1995). Prediction of clotting time for milk coagulation by mixtures of proteolytic enzymes. J. Food Chemistry, 52:411-414.
29- Segel, I.H. (1975). Enzymes kinetics: behavier analyses of rapid equilibrium and steady state systemes. Wiley Inter. Sci., New York.

30- Tao Wu, Le-Chang Sun, Cui-Hong Du, Qiu-Feng Cai, Qi-Biao Zhang, Wen-Jin Su and Min-Jie Cao (2009). Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla Anguilla*). Food Chemistry, 115(1): 137-142.

31- Tavares, J.E., J.A. Baptista and M.F. Marcone (1997). Milk coagulating enzymes of tuna fish waste as a rennet substitute. J. Inter. Fd. Sci. and Nutrition, 48(3): 169- 176.

32- Wahba, A.; F. El-Abbassy (1981). Milk clotting activity of rennet and of rabbit, sheep and porcine pepsins. Egyption J. Dairy Sci., 9:5-10.

33- Wahba, A.; F. El-Abbassy; H. El-shafei and S. Awad (1995). Effect of some factors on the activity of milk clotting enzymes. Egyption J., Food Sci., 23 (1-2): 27-35.

34- Wahba, A.; S. A. Salem and F. El-Abbassy (1994). Effect of some factors on the clotting activity of crude enzymes extracted from some fish stomach. Egyption. J. Diary Sci., 22:197-206.

35- Whitaker, J.R. (1972). Principles of Enzymology for the Food Science. Marcel Dekker, Inc., New York.

36- Xu, R.A.; R.J. Wong; M.L. Rogers and G.C. Fletcher (1996). Purification and characterization of acidic proteases from the stomach of the deep water finfish orange roughy *(Hoplostethus atlanticts)*. J. Food Biochemistry, 20:31-48 .

37- Yamada, A.; K. Takano and L. Kimoi (1993). Purification and properties of protease from tilapia stomach. J. Nippon Suisan Gakkaishi, 39(11): 1903-1908.

38- Zeidan, I.A.; M.E. Ghannam and I.A. Attia (1986). Clotting of goats milk by rennet, pepsin and microbial rennet. Alex. Sci.; Exch , 7: 205-210.

SOME PROPERTIES OF *Siluris glanis* PEPSIN AND EFFECT OF SOME ADDITIVES ON ITS ACTIVITIES

K.A. Shaker **M.J. Hindi** **D.S. Ali**

ABSTRACT

This study was carried out to investigate some characteristic of pepsin (A and B) which were extracted from *Siluris glanis* stomach and effect of some additives on their proteolytic activities. The obtained resultes showed that the optimum pH of proteolytic activity for both enzymes was 5.5 at 37C° and the optimum temperature ranged from 30 to 40C° at optimum pH value. Both enzymes gave the highest proteolytic activities at pH values ranged between 4.5-6.5 over 30min incubation at 35C°.

The results of proteolytic activities response toward some reagents such as (IAA, EDTA, STI) revealed that both enzymes neither serine or thiol nor metallo protease. Meanwhile the addition of $CaCl_2$ up to 5mM enhanced the clotting activity wherease NaCl addition depressed their cloting and proteolytic activities. The ratio of clotting to proteolytic activity for crude enzyme was 13.66 as compared to that for calf rennet which was 19.65. The curd obtained using crude extract of pepsin was less firm as compared to that obtained with calf rennet.

The results of kinetic studies showed that the Km, Vmax and Ka values for pepsin (A) were 0.81 m/ml,498 µ/min,19800 cal/mol respectively.

College of Agric., Univ. of Baghdad, Baghdad, Iraq.