عوامل موثر بر تولید و فعالیت آنزیم لخته کننده شیر در قارچ *Rhizomucor miehei*

پروانه راشدی[۱]، ناصر زارع[۲*]، بهرام فتحی آچاچلوئی[۳]، رسول اصغری ذکریا[۲]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۲- عضو هیات علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
۳- عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۲۲)

چکیده

رنین حاصل از قارچ *رایزوموکور میهی* (*Rhizomucor miehei*) به دلیل فعالیت لخته‌کنندگی بالا، فعالیت پروتئازی کم و نیز مقاومت حرارتی بالاتر نسبت به سایر پروتئازهای قارچی در صنعت تولید پنیر بیشترین توجه را به خود معطوف کرده است. در این تحقیق تأثیر عوامل مختلف شامل درصد رطوبت محیط کشت جامد (۵، ۱۰، ۲۰ درصد)، دمای کشت (۳۰، ۳۷ و ۴۲ °C)، اضافه کردن یون‌های فلزی (کلرید منیزیم، کلرید منگنز و سولفات مس) به محیط کشت مایع بر پایه سبوس گندم و مدت زمان کشت (۵ و ۱۰ روز) بر تولید آنزیم لخته‌کننده شیر در قارچ *رایزوموکور میهی* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت لخته‌کنندگی و پروتئازی و نسبت MCA/PA عصاره آنزیمی قارچ *رایزوموکور میهی* به طور معنی‌داری تحت تأثیر عوامل مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت لخته‌کنندگی و نسبت MCA/PA عصاره در محیط کشت جامد بیشتر از محیط مایع بود. اضافه کردن یون‌های فلزی به ترکیب محیط کشت باعث افزایش تولید رنین توسط *رایزوموکور میهی* و فعالیت لخته‌کنندگی آن گردید. در بین محیط کشت‌های مایع، محیط حاوی کلرید منیزیم نسبت به محیط بدون یون‌های فلزی و محیط حاوی کلرید منگنز و سولفات مس فعالیت لخته‌کنندگی بالاتری را نشان داد. به‌طورکلی، بیشترین فعالیت لخته‌کنندگی عصاره قارچی در محیط کشت جامد با رطوبت ۵ درصد در مدت زمان ۱۰ روز تخمیر در دما ۳۰، ۳۷ یا ۴۲ °C به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود.

کلید واژگان: آنزیم رنین، فعالیت لخته‌کنندگی شیر، فعالیت پروتئازی، پنیر

* مسئول مکاتبات: zaren@uma.ac.ir

۱- مقدمه

رنین (کیموزین)[1] یک آسپارتیک پروتئاز است که آنزیم اصلی مورد استفاده در تولید پنیر می‌باشد. استفاده از رنین در صنایع غذایی، سابقه طولانی دارد و در تمام دنیا برای عملیات پنیرسازی ضروری است. افزودن این آنزیم به شیر سبب افزایش سرعت انعقاد کازئین، پروتئین اصلی شیر، می‌شود. رنین نه‌تنها موجب انعقاد شیر، بلکه نقش مهمی در رسیدگی پنیر نیز ایفا می‌کند [۱]. شکستگی آنزیمی چند پیوند اسیدآمینه خاص در رشته‌های کازئین، فاز اولیه در انعقاد شیر است [۲]. انعقاد کازئین شیر در دو مرحله صورت می‌گیرد: مرحله آنزیمی و مرحله غیر آنزیمی. در مرحله آنزیمی کازئین توسط رنین به شکل کاپا-کازئین در می‌آید و در مرحله غیر آنزیمی از طریق یون کلسیم و حرارت مناسب منعقد می‌شود [۳]. کیموزین به صورت یک پیش‌آنزیم (پروکیموزین) با ۳٦۵ اسیدآمینه و وزن مولکولی ٤۰۷۷۷ کیلودالتون که پروکیموزین نامیده می‌شود تولید و ترشح می‌شود. ۱٦ اسیدامینه آب‌دوست در ابتدای توالی به عنوان توالی سیگنال است، که در ترشح کیموزین از غشای سلولی اهمیت دارد [٤]. در شرایط اسیدی (pH=5) پیش‌آنزیم فعال‌سازی اتوکاتالیتیک را طی کرده و تبدیل به کیموزین (با وزن مولکولی ۳۵٦۰۰ دالتون و ۳۲۳ اسیدآمینه) یا در pH=2 تبدیل به کیموزین کاذب[2] با ۳۳۷ اسیدآمینه می‌شود. هم کیموزین و هم کیموزین کاذب دارای فعالیت لخته‌کنندگی شیر هستند [۵].

آنزیم‌های پروتئولیتیک تقریبا ٦۰ درصد از کل آنزیم‌های تجاری موجود در بازار را شامل می‌شوند. آنزیم رنین نیز در گروه این آنزیم‌ها قرار دارد که از منابع حیوانی، گیاهی و میکروبی قابل تهیه است [٦]. آنزیم کیموزین (رنین) جداسازی شده از شیردان گوساله نشخوارکنندگان به طور سنتی به عنوان آنزیم لخته‌کننده شیر برای تولید پنیر استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد که حیواناتی مانند بوفالو، بز، خرگوش و گوسفند نیز می‌توانند منبع خوبی برای تهیه آنزیم لخته‌کننده شیر باشند، ولی به طور گسترده برای بهره‌برداری مورد بررسی قرار نگرفته‌اند [۵]. مسایلی از قبیل افزایش جمعیت، افزایش تولید محصولات لبنی و کاهش تمایل به ذبح گوساله نشخوارکنندگان برای تهیه مایه پنیر به دلیل بالا رفتن مصرف جهانی گوشت، مشکلات زیادی در عرضه مایه پنیر ایجاد کرده و سبب به هم خوردن عرضه و تقاضای این ماده مهم و مورد نیاز کارخانجات لبنی شده است [۷ و ۸]. در واقع تعداد زیادی از پروتئازها قادر به تجزیه پروتئین‌های شیر و تولید لخته در آن می‌باشند، اما این ویژگی به تنهایی جهت استفاده از آنها در صنعت پنیرسازی کافی نیست. مایه پنیر خوب باید دارای ویژگی-هایی مثل حلالیت بالا در آب، فعالیت انعقاد بالا، فعالیت پروتئولیتیکی مناسب، ایجاد عطر و طعم مطلوب و قابلیت نگه-داری بالا باشد. علاوه بر این، تولید آن نیز محدودیت نداشته باشد. رنین حاصل از منابع گیاهی به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی زیاد و در نتیجه ایجاد تلخی در پنیر به دلیل آزاد سازی برخی پپتیدهای نامطلوب در اثر تجزیه پروتئین‌های شیر، چندان مورد توجه قرار نگرفته‌اند. به همین دلیل صنایع شیر همواره به دنبال جایگزین مناسبی برای آنزیم رنین بوده است و از این نظر آنزیم‌های لخته‌کننده با منشاء میکروبی از اهمیت زیادی برخوردارند. به طوری‌که، بیش از یک سوم صنایع لبنی در سراسر جهان از رنین با منشاء ریزسازواره‌ها استفاده می‌کنند [۹ و ۱۰]. رنین حاصل از ریزسازواره‌های مختلف از دهه‌ی ۱۹۷۰ تحت نام‌های تجاری مختلف مانند رنیلاز[1]، فورماس[2] و غیره برای تولید پنیرهای با ویژگی‌های خاص مورد استفاده قرار گرفته است [۱۱]. تعداد زیادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها به عنوان سویه‌هایی با پتانسیل بالا برای تولید کیموزین یا رنین میکروبی و به عنوان جایگزین برای رنین پیشنهاد گردیده‌اند. رنین با منشاء ریزسازواره به دلیل مزایای آن بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله این مزایا می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱) در هیدرولیز پیوندهای پپتیدی در کاپا-کازئین مشابه رنین حیوانی عمل می‌کنند؛ ۲) استخراج رنین از محیط مایع آسان است؛ ۳) تولیدشان تجاری است؛ ٤) فعالیت لخته‌کنندگی آن نسبت به فعالیت پروتئولیتیکی زیاد است [٤ و ۱۰].

در حال حاضر صنایع لبنی به طور گسترده از رنین میکروبی تولید شده از منابع قارچی به خصوص *رایزوموکور پوسیلوس* (*Rhizomucor pussillus*)، *رایزوموکور میهی* (*Rhizomucor miehei*)، *اندوتیکا پارازیتیکا* (*Endothica parasitica*)، *آسپرژیلوس اوریزا* (*Aspergillus oryzae*) و *آیرپکس لاکتیس* (*Irpex lactis*) و نیز رنین نوترکیب تولید شده در ریزسازواره‌ها استفاده می‌کند. اگرچه در این مورد هم

1. Chymosin
2. pseudochymosin

1. Rennilase
2. Formase

ممکن است مشکلاتی مثل بازده کم پنیر تولید شده و گاهی طعم و مزه تلخ پنیر وجود داشته باشد ولی گزارشاتی در تهیه رضایت‌بخش انواع پنیر با استفاده از فن‌آوری اصلاح شده در تولید پنیر با استفاده از روش‌های میکروبی وجود دارد که می‌تواند جایگزین پنیر تولید شده به روش سنتی شود [۵ و ۷]. در میان ریزسازواره‌ها، قارچ‌های *رایزوموکور میهی* و *موکور پوسیلوس* مایه پنیری تولید می‌کنند که همانند مایه پنیر تجاری از لخته‌کنندگی سریع برخوردار است. تولید تجاری قارچ‌های *رایزوموکور میهی* جایگزین مناسبی برای رنین حیوانی می‌باشد به‌طوری‌که پنیر بیش از ۳۳ درصد جمعیت جهان از این طریق تولید می‌شود [۷، ۱۰ و ۱۲].

مطالعات متعدد نشان داده که میزان تولید رنین در ریزسازواره‌ها به شدت تحت تاثیر نوع و ترکیبات محیط کشت و شرایط کشت و رشد قرار می‌گیرد. به عنوان مثال فودا و همکاران [۱۳] رشد قارچ *رایزوموکور میهی* و تولید رنین در محیط تخمیری جامد تشکیل شده از محصولات جانبی کشاورزی و صنعتی مختلف را مورد ارزیابی قرار داده و نشان دادند که بیشترین مقدار آنزیم لخته‌کننده شیر با تنظیم شرایط رشد در محیط تخمیری جامد با سوبسترای سبوس گندم تولید می‌شود. ساتیا و همکاران [۱٤] تاثیر محیط کشت‌های جامد تشکیل شده از ضایعات کشاورزی و صنعتی مختلف بر تولید رنین و فعالیت لخته‌کنندگی آن در قارچ *Mucor circinelloides* را بررسی نموده و گزارش نمودند که محیط کشت تشکیل شده از پوسته حبوبات شرایط امیدوارکننده‌ایی را برای تولید تجاری این محصول فراهم می‌آورد. سیلوریا و همکاران [۱۵] نیز برای تولید آنزیم لخته کننده شیر از قارچ *رایزوموکور میهی* از دو نوع محیط کشت تخمیری جامد و مایع با ترکیبات مختلف استفاده کرده و نشان داده‌اند که محیط تخمیری جامد محیط کشت مناسبی برای تولید رنین در این قارچ می‌باشد. بنابراین، در این پژوهش تاثیر عوامل مختلف محیطی (ازقبیل دمای کشت، میزان رطوبت محیط کشت و اضافه کردن یون‌های فلزی به محیط کشت) بر تولید آنزیم رنین فعال و فعالیت لخته‌کنندگی رنین تولید شده توسط قارچ *رایزوموکور میهی* مورد بررسی قرار گرفته و یک محیط‌کشت مایع ساده برای تولید رنین از این قارچ توسعه داده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت قارچ *رایزوموکور میهی*

قارچ *رایزوموکور میهی* از کلکسیون میکروبی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به صورت کشت فعال تهیه گردید. برای بازیابی اسپور، قارچ مطابق روش تاکور و کارانت [۱٦] روی محیط کشت PDA[1] کشت، و در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ به مدت ٤ روز نگه‌داری شد.

۲-۲- تهیه مایه تلقیح

سوسپانسیون اسپوری با تراکم 10^{6} اسپور در میلی‌لیتر از کشت-های چهار روزه تهیه شده و به عنوان مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفت [۱۵].

۲-۳- تهیه محیط کشت

به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید رنین، از دو نوع محیط (بستر) کشت استفاده شد.

تخمیر حالت جامد در مقیاس آزمایشگاهی در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتر انجام گرفت و تأثیر میزان رطوبت محیط کشت (بستر کشت)، مدت زمان تخمیر و دمای کشت روی تولید رنین بررسی گردید. محیط کشت شامل ۱۵ گرم سبوس گندم، ۲ گرم کازئین و اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال با مقادیر مختلفی از آب مقطر (سطوح رطوبت ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) بود. محیط کشت‌ها مطابق روش سیلوریا و همکاران [۱۵] با سوسپانسیون اسپوری تلقیح شده و در سه سطح دمایی ($^{\circ}C$ ۳۰، $^{\circ}C$ ۳۷ و $^{\circ}C$ ٤۲) به مدت زمان ۵ و ۱۰ روز نگه‌داری شدند.

تخمیر حالت مایع (کشت مایع) در مقیاس آزمایشگاهی در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتر انجام گرفت. محیط کشت شامل ۱۰ گرم سبوس گندم، ٤ گرم تریپتون، ۸ گرم گلوکز در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل شده بود. به منظور بررسی تأثیر مواد معدنی بر تولید رنین، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از کلرید منیزیم، کلرید منگنز یا سولفات مس به محیط کشت مایع اضافه گردید. سپس محیط کشت با سوسپانسیون اسپوری تلقیح شد و در سه سطح دمایی ($^{\circ}C$ ۳۰، $^{\circ}C$ ۳۷ و $^{\circ}C$ ٤۲) به مدت زمان ۵ و ۱۰ روز در شیکر انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه نگه‌داری شدند. در کلیه آزمایش-ها، ضدعفونی محیط کشت با استفاده از اتوکلاو با دمای $^{\circ}C$ ۱۲۱ و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت.

1. Potato Dextrose Agar

۲-٤- تهیه عصاره آنزیمی

پس از اتمام زمان تخمیر، ٦٠ میلی‌لیتر آب اتوکلاو شده به هر محیط کشت جامد افزوده شده و به مدت ٦ ساعت در دمای آزمایشگاه نگه‌داری گردید. سپس، مطابق روش پریتا و بوپاتی [۱۷] محلول حاصل از هر محیط کشت جامد و محیط‌های مایع با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شده و به منظور حذف ذرات کلوئیدی با ٦٠٠٠ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول به دست آمده به عنوان عصاره آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۵- تعیین فعالیت لخته‌کنندگی آنزیم رنین

فعالیت لخته‌کنندگی با استفاده از روش آریما [٦] سنجیده شد. به این صورت که زمان مورد نیاز برای لخته شدن یک میلی‌لیتر شیر بدون چربی (حاوی ۰/۰۱ مولار کلرید کلسیم) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. برای این منظور، یک میلی‌لیتر سوبسترا با عصاره آنزیمی مخلوط شده و سپس زمان لخته‌شدن شیر یادداشت گردید. برای محاسبه فعالیت لخته‌کنندگی رنین بر حسب واحد سوکسله از فرمول زیر استفاده شد [۱۲]:

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

که در آن M= حجم شیر، E= حجم محلول آنزیم، T= دمای واکنش آنزیم-سوبسترا، t= زمان لخته شدن شیر برحسب ثانیه است.

طبق تعریف یک واحد سوکسله مقدار آنزیمی است که یک میلی‌لیتر محلول حاوی ۰/۱ گرم پودر شیر بدون چربی و ۱/٤۷ میلی‌گرم کلرید کلسیم را در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ طی مدت ٤۰ دقیقه لخته می‌کند [۱۲].

۲-٦- تعیین فعالیت پروتئازی آنزیم رنین

فعالیت پروتئازی با استفاده از روش آریما [٦] سنجیده شد. برای این منظور، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول یک درصد کازئین در بافر ۰/۰۲ مولار پتاسیم فسفات (pH=7.5) به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیم اضافه شده و مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ نگه‌داری گردید. سپس با افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۰/٤٤ مولار به آن، واکنش آنزیم-سوبسترا متوقف گردید. محلول واکنش به مدت ۱۰ دقیقه با ٦٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول رویی برای ادامه آزمایش استفاده گردید. سپس یک میلی‌لیتر معرف فولین (سه بار رقیق شده) و ۲/۵ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۰/۵۵ مولار به یک میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده فوق اضافه گردیده و برای رنگ‌گیری به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ قرار داده شد. در نهایت، جذب محلول در ٦٦٠ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. واحد فعالیت آنزیم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۱۸].

$$\frac{Unit}{ml}\ enzyme = \frac{(\mu mole\ Tyrosine\ equivalent\ released)(3.8)}{(0.5)(10)(1)}$$

که در آن (۵/۵) حجم کل واکنش (بر حسب میلی لیتر)، (۰/۵) حجم آنزیم (بر حسب میلی لیتر)، (۱۰) زمان تجزیه شیمیایی (بر حسب دقیقه)، (۱) حجم استفاده شده در اسپکتروفتومتر را نشان می‌دهد. µmole Tyrosine نیز نشان دهنده‌ی میزان تیروزین آزادسازی شده توسط آنزیم رنین است که بر اساس منحنی استاندارد تیروزین با استفاده از فرمول شماره ۳ محاسبه گردید. طبق تعریف یک واحد فعالیت آنزیمی، مقدار آنزیمی است که قادر به آزادسازی یک میکروگرم تیروزین در طول موج ٦٦٠ نانومتر می‌باشد [۳، ٦ و ۵].

داده‌های صفت MCA[1]/PA[2] از تقسیم اعداد به دست آمده برای فعالیت لخته‌کنندگی بر فعالیت پروتئازی نمونه‌ها، محاسبه شد.

برای محاسبه و کمی‌سازی میزان تیروزین آزادسازی شده توسط آنزیم رنین از منحنی کالیبراسیون تیروزین استاندارد استفاده شد. برای این منظور غلظت‌های مختلف تیروزین (۱/۳۷۵، ٦/۸۷۵، ۱۳/۷۵، ۲۷/۵ و ۵۵ میکرومولار) تهیه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ نگه‌داری گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۰/۵۵ مولار و یک میلی‌لیتر معرف فولین (سه بار رقیق شده) به مخلوط فوق اضافه شده و برای رنگ‌گیری به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ نگه‌داری و جذب نوری آن در طول موج ٦٦٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس معادله شماره ۳ حاصل از آن برای محاسبه تیروزین (بر حسب میکرومول) آزاد شده مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).

$$Y= 0.003X+0.038$$

1. milk-clotting
2. proteolytic activity

که در آن X= جذب نوری نمونه‌ها و Y= غلظت تیروزین (میکرومولار) را نشان می‌دهد.

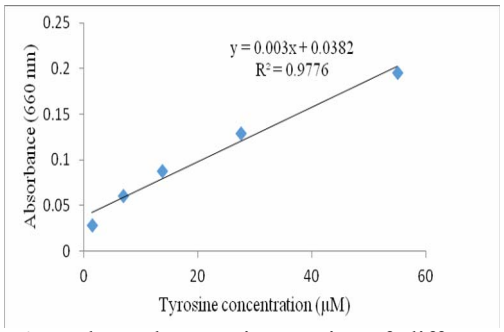

Fig 1 Plot and regressin equation of different tyrosine concentration vs. absorbance 660 nm

۳- تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با عامل‌های محیط کشت (در هفت سطح)، دما (سه سطح) و مدت زمان کشت (دو سطح) انجام گرفت. برای بررسی اختلاف بین تیمارها تجزیه واریانس، به روش General Linear Model و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند (univariate) دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و به کمک نرم افزار آماری SAS و SPSS 16.0 نسخه ۹/۲ انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. با توجه به این که صفت ضریب تغییرات MCA/PA از تبدیل داده‌ها به روش جذر استفاده گردید.

٤- نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فعالیت لخته‌کنندگی، فعالیت پروتئازی و نیز نسبت MCA/PA به طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع و ترکیب محیط کشت، مدت زمان تخمیر، اثر متقابل محیط کشت × دما، دما × مدت زمان تخمیر، محیط کشت × مدت زمان تخمیر، محیط کشت × دما × مدت زمان تخمیر قرار گرفت. بین دماهای مختلف تخمیر تفاوت معنی‌داری از نظر فعالیت لخته-کنندگی و فعالیت پروتئازی وجود نداشت ولی نسبت MCA/PA به طور معنی‌داری تحت تأثیر دمای تخمیر قرار گرفت (جدول ۱).

Table 1 Variance analysis of milk- clotting and protease activity (MCA and PA) and MCA/PA ratio of *Rhizomucor miehei* extract under different culture condition

SOV	df	Mean of Squares		
		MCA	PA	MCA/PA
Medium (A)	6	3185.93**	171396.41**	2.11**
Culture time (B)	1	1290.17**	2160.63*	0.205 ns
Temperature (C)	2	107.55 ns	57.64 ns	0.491**
A×B	6	318.73**	1926.89**	0.289**
A×C	12	259.72**	3617.41**	0.332**
B×C	2	668.82**	3550.13**	0.303**
A×B×C	12	336.17**	5413.60**	0.297**
Error	84	43.31	397.57	0.0552
CV(%)		21.94	12.68	23.04

ns, * and **: Non significant and significant at 5% level of probability and significant at 1% level of probability, respectively.

انتخاب رهیافت مناسب برای تولید آنزیم لخته‌کننده شیر در فرآیند محیط تخمیری بستگی به عوامل متعددی دارد که از مهمترین آنها می‌توان به در دسترس بودن مواد تشکیل دهنده محیط‌کشت و هزینه موردنیاز اشاره کرد [۱۹]. در این تحقیق از سبوس گندم برای تهییه بستر کشت استفاه گردید و تأثیر یون‌های فلزی، مدت زمان تخمیر و دمای کشت بر تولید رنین بررسی گردید. همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود محیط کشت (بستر کشت) جامد با رطوبت ۵ درصد نسبت به سایر محیط‌ها بیشترین فعالیت لخته‌کنندگی را نشان می‌دهد. اضافه کردن یون‌های فلزی (کلرید منیزیم، کلرید منگنز و سولفات مس) به ترکیب محیط کشت مایع قارچ *رایزوموکور میهی* باعث بهبود و افزایش تولید آنزیم رنین و در نتیجه افزایش فعالیت لخته‌کنندگی می‌گردد. در بین محیط کشت‌های مایع حاوی کلرید منیزیم نسبت به محیط مایع بدون یون‌های فلزی و محیط مایع حاوی کلرید منگنز و سولفات مس فعالیت لخته‌کنندگی بالاتری را نشان داد. به طوری‌که عصاره قرچی حاصل از محیط کشت جامد با رطوبت ۱۰ درصد و محیط کشت مایع حاوی کلرید منیزیم فعالیت لخته‌کنندگی یکسانی را نشان دادند. کم‌ترین فعالیت

لخته‌کنندگی شیر در محیط کشت مایع فاقد یون‌های فلزی مشاهده شد (شکل ۲). این نتایج با نتایج تحقیقات ویشواناتا و همکاران [۲۰] روی قارچ *Aspergillus oryza* پریتا و همکاران [۲۱] روی *موکور میهی* و نوانی و همکاران [۲۲] روی *موکور پوسیلوس* مطابقت دارد. پی-جینگ و چنگ-چون [۲۳] نیز در مطالعه تولید آنزیم لخته‌کننده شیر از *Amylomyces rouxii* در محیط مایع برنج نتایج مشابهی گزارش نموده‌اند.

با توجه به شکل ۲ مشاهده می‌شود محیط کشت مایع حاوی کلرید منیزیم بیشترین فعالیت پروتئازی را دارد که اختلاف معنی-داری با محیط مایع حاوی کلرید منگنز نداشته ولی نسبت به سایر محیط‌کشت‌های مایع دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد. با وجود این، در محیط کشت جامد، فعالیت پروتئازی عصاره حاصل از محیط کشت حاوی ۱۰ درصد رطوبت به طور معنی‌داری بیشتر از محیط کشت جامد با ۵ درصد و ۲۰ درصد رطوبت بود.

محیط کشت جامد با رطوبت ۵ درصد به طور معنی‌داری نسبت MCA/PA بالاتری را نسبت به سایر محیط کشت‌ها نشان داد ولی محیط کشت جامد با رطوبت ۱۰ درصد و ۲۰ درصد از نسبت MCA/PA یکسانی برخوردار بودند. در محیط مایع، تمامی محیط‌ها نسبت MCA/PA یکسانی را نشان دادند که به طور معنی‌داری کمتر از نسبت MCA/PA محیط کشت جامد بود (شکل ۲).

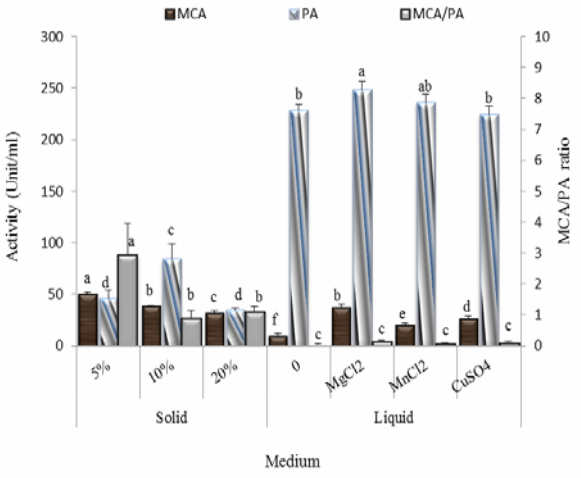

Fig 2 Effect of different medium compositions on the activity of rennin produced by *Rhizomucor miehei.* Different letters show significant differences based on Duncan's multiple range test (P≤0.05).

عصاره آنزیمی حاصل کشت‌های ۱۰ روزه فعالیت لخته‌کنندگی بالایی را نسبت به ۵ روز نشان داد. در حالی‌که فعالیت پروتئازی عصاره آنزیمی در کشت‌های ۵ روزه به طور معنی‌داری بیشتر از کشت‌های ۱۰ روزه بود (شکل ۳).

بررسی ترکیب تیماری محیط کشت، دمای تخمیر (کشت) و مدت زمان تخمیر نشان داد که بیشترین فعالیت لخته‌کنندگی در محیط جامد با رطوبت ۵ درصد در مدت زمان ۱۰ روز تخمیر در دماهای ۳۰ یا ۳۷ $^{\circ}C$ به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با همان محیط کشت در مدت زمان ۱۰ روز در دمای ۴۲ $^{\circ}C$ نداشته ولی به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. کمترین فعالیت لخته‌کنندگی در محیط مایع با دمای ۳۰ $^{\circ}C$ و مدت زمان ۵ یا ۱۰ روز و دمای ۴۲ $^{\circ}C$ در مدت زمان ۱۰ روز و نیز محیط مایع حاوی سولفات مس با دمای ۳۷ $^{\circ}C$ و مدت زمان ۵ روز مشاهده گردید. علاوه براین، در اکثر محیط کشت‌های جامد با افزایش مدت زمان تخمیر به ۱۰ روز فعالیت لخته‌کنندگی عصاره قارچ نیز به طور معنی‌داری افزایش یافته است. البته در برخی از محیط کشت‌های مایع نیز چنین حالتی وجود دارد (جدول ۲).

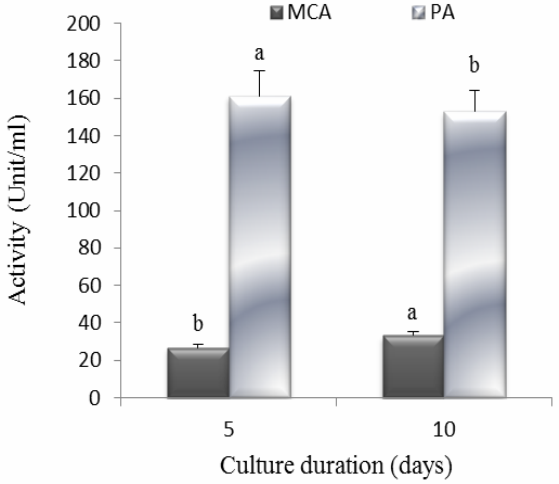

Fig 3 The effect of culture duration on the activity of of rennin produced by *Rhizomucor miehei.* Different letters show significant differences based on Duncan's multiple range test (P≤0.05).

Table 2 The effects of different factors on milk-clotting and protease activity (MCA and PA) and MCA/PA ratio of *Rhizomucor miehei* extract

Culture media	%miosture & metal ions	Temperature (°C)	Time (day)	MCA (S. U.)	PA (Unit/ml)	MCA/PA
Solid	%5	30	5	44.76^{bcd}	15.88^{lm}	2.91^{b}
Solid	%5	30	10	61.25^{a}	28.23^{lm}	2.19^{bcd}
Solid	%5	37	5	40.87^{b-f}	8.43^{m}	5.01^{a}
Solid	%5	37	10	60.78^{a}	45.22^{lm}	1.34^{c-g}
Solid	%5	42	5	39.13^{c-f}	82.25^{jk}	0.486^{f-k}
Solid	%5	42	10	52.19^{ab}	94.11^{j}	0.571^{e-k}
Solid	%10	30	5	35.72^{d-g}	195.68^{ghi}	0.188^{h-k}
Solid	%10	30	10	42.37^{b-e}	19.67^{lm}	2.62^{bc}
Solid	%10	37	5	36.97^{c-f}	33.24^{lm}	1.11^{d-j}
Solid	%10	37	10	34.89^{d-g}	92.88^{j}	0.375^{g-k}
Solid	%10	42	5	33.84^{d-g}	49.13^{kl}	0.729^{e-k}
Solid	%10	42	10	42.9^{b-e}	111.1^{j}	0.394^{g-k}
Solid	%20	30	5	36.66^{c-f}	32.51^{lm}	1.14^{d-i}
Solid	%20	30	10	23.06^{ghi}	29.82^{lm}	0.815^{e-k}
Solid	%20	37	5	32.58^{d-h}	24.93^{lm}	1.62^{b-f}
Solid	%20	37	10	48.88^{bc}	31.28^{lm}	1.68^{b-e}
Solid	%20	42	5	32.27^{d-h}	30.31^{lm}	1.18^{d-h}
Solid	%20	42	10	13.53^{ij}	54.02^{kl}	0.251^{h-k}
Liquid	-	30	5	10.02^{jk}	220.2^{d-g}	0.071^{k}
Liquid	-	30	10	0^{k}	210.8^{g-i}	0^{k}
Liquid	-	37	5	0^{k}	221.59^{d-g}	0^{k}
Liquid	-	37	10	28.67^{fgh}	228.19^{c-g}	0.123^{k}
Liquid	-	42	5	15.66^{ij}	230.27^{c-g}	0.068^{k}
Liquid	-	42	10	0^{k}	258.5^{bcd}	0^{k}
Liquid	$MgCl_2$	30	5	32.58^{d-h}	264^{bc}	0.123^{k}
Liquid	$MgCl_2$	30	10	36.97^{c-f}	223.06^{d-g}	0.167^{ijk}
Liquid	$MgCl_2$	37	5	31.64^{d-h}	300.06^{a}	0.105^{k}
Liquid	$MgCl_2$	37	10	33.84^{d-g}	266.11^{c-g}	0.149^{jk}
Liquid	$MgCl_2$	42	5	42.67^{b-e}	229.9^{c-g}	0.246^{h-k}
Liquid	$MgCl_2$	42	10	41.36^{b-f}	246.77^{b-f}	0.172^{ijk}
Liquid	$MnCl_2$	30	5	9.08^{jk}	254.3^{bcd}	0.047^{k}
Liquid	$MnCl_2$	30	10	23.06^{ghi}	231.98^{b-g}	0.099^{k}
Liquid	$MnCl_2$	37	5	15.66^{ij}	269.5^{ab}	0.058^{k}
Liquid	$MnCl_2$	37	10	11.9^{ijk}	251.17^{b-e}	0.048^{k}
Liquid	$MnCl_2$	42	5	20.55^{hij}	226.97^{c-g}	0.090^{k}
Liquid	$MnCl_2$	42	10	36.66^{c-f}	181.74^{hi}	0.202^{h-k}
Liquid	$CuSo_4$	30	5	11.77^{ijk}	212.3^{e-h}	0.055^{k}
Liquid	$CuSo_4$	30	10	30.08^{e-h}	248.84^{b-f}	0.121^{k}
Liquid	$CuSo_4$	37	5	0^{k}	259.3^{bcd}	0^{k}
Liquid	$CuSo_4$	37	10	43.24^{b-e}	226.6^{c-g}	0.190^{h-k}
Liquid	$CuSo_4$	42	5	40.1^{b-f}	226.72^{c-g}	0.176^{ijk}
Liquid	$CuSo_4$	42	10	31.33^{e-h}	172.94^{i}	0.181^{ijk}

* In each column means followed by the same letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

بیشترین فعالیت پروتئازی در محیط کشت مایع حاوی کلرید منیزیم در دمای ۳۷ °C و مدت زمان ۵ روز به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با محیط کشت مایع حاوی کلرید منگنز در دمای ۳۷ °C و مدت زمان ۵ روز نداشته ولی به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. بر عکس، محیط کشت جامد با ۵ درصد رطوبت در مدت زمان ۵ روز و دمای ۳۷ °C کمترین فعالیت پروتئازی را نشان داد که اختلاف معنی‌داری با محیط جامد دارای رطوبت ۵ درصد در دمای ۳۰ °C و مدت زمان ۵ و

۱۰ روز، محیط جامد دارای رطوبت ۵ درصد در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ و مدت زمان ۱۰ روز، محیط جامد دارای رطوبت ۱۰ درصد در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ و مدت زمان ۵ روز، محیط جامد حاوی رطوبت ۱۰ درصد در دمای $^{\circ}C$ ۳۰ و تمامی محیط‌های جامد دارای رطوبت ۲۰ درصد به غیر از دمای $^{\circ}C$ ٤۲ در مدت زمان ۱۰ روز نداشته ولی به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود (جدول ۲).

عصاره آنزیمی قارچ *رایزوموکور میهی* در محیط کشت جامد با رطوبت ۵ درصد، مدت زمان تخمیری ۵ روز و دمای $^{\circ}C$ ۳۷ بیشترین نسبت MCA/PA را داشت که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۲). به طور کلی نسبت MCA/PA در محیط کشت‌های مایع کمتر از محیط کشت‌های جامد بود.

دما یکی از مهمترین پارامترها در کنترل فرآیندهای زیستی است. افزایش یا کاهش دمای کشت میزان آنزیم تولید شده توسط ریزسازواره‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مطالعات متعددی نشان داده که تولید آنزیم لخته‌کننده شیر در ریزسازواره‌ها عمدتاً تحت تأثیر دمای کشت قرار می‌گیرد [١٦، ٢٤ و ٢٥]. بر اساس نتایج این تحقیق، از نظر فعالیت لخته‌کنندگی اثر متقابل معنی‌داری بین محیط کشت و دمای کشت وجود داشت به طوری‌که در محیط کشت جامد حاوی ۵ درصد رطوبت بین دماهای کشت اختلاف قابل ملاحظه و معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲). ولی در محیط کشت جامد حاوی ۱۰ یا ۲۰ درصد رطوبت به ویژه در کشت‌های ۱۰ روزه بین دماهای کشت اختلاف قابل ملاحظه‌ای وجود داشت. برای مثال در محیط جامد حاوی ۱۰ درصد رطوبت فعالیت لخته‌کنندگی کشت‌های جامد ۱۰ روزه در دمای ۳۰ و $^{\circ}C$ ٤۲ بیشتر از دمای $^{\circ}C$ ۳۷ بود (جدول ۲). علاوه براین، در محیط مایع حاوی کلرید منیزیم و کلرید منگنز در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ فعالیت پروتئازی بیشتر از سایر دماهای کشت بود (جدول ۲). در تحقیقات قبلی نیز دمای بهینه برای رشد و تولید آنزیم لخته-کننده شیر توسط قارچ *رایزوموکور میهی* $^{\circ}C$ ٤۰ تا $^{\circ}C$ ٤۲ گزارش شده است [١٣، ١٦ و ٣٠]. در ریزسازواره‌های دیگر نیز دمای بهینه برای رشد و تولید بهینه آنزیم لخته‌کننده شیر مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال، بهترین دمای رشد برای تولید آنزیم لخته‌کننده شیر در قارچ *رایزوموکور پوسیلوس* $^{\circ}C$ ۵۰ [٢٦] و برای رشد قارچ *آسپرژیلوس اوریزا* $^{\circ}C$ ۵۵ [٢٠] گزارش شده است. ولی دمای بهینه برای تولید آنزیم لخته‌کننده در *Enterococcus faecalis* TUA2495L گزارش شده است [٢٧]. درحالی‌که دمای بهینه رشد برای *Rhizopus oryza* [٢٨] و *Bacillus sphaericus* برابر $^{\circ}C$ ٦۰ می‌باشد [٢٩].

سطح رطوبت نیز از عوامل موثر فاکتور برای رشد قارچ و تولید آنزیم لخته‌کننده در محیط تخمیری جامد می‌باشد. در تحقیق حاضر فعالیت لخته‌کنندگی و نسبت MCA/PA عصاره‌ی آنزیمی قارچ *رایزوموکور میهی* در رطوبت ۵ درصد به طور معنی‌داری بیشتر از محیط کشت‌هایی با درصد رطوبت بالاتر بود (شکل ۲ و جدول ۲). به عبارت دیگر با افزایش میزان رطوبت محیط کشت جامد فعالیت لخته‌کنندگی و نسبت MCA/PA کاهش یافت. این در حالی است که فعالیت پروتئازی عصاره آنزیمی حاصل از محیط کشت‌های حاوی رطوبت ۵ درصد در مقایسه با رطوبت ۱۰ درصد به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۲) که علت آن افزایش فعالیت لخته‌کنندگی رنین تولیدی نسبت به فعالیت پروتئازی می‌باشد. چنین نتایجی توسط لخا و لونسان در *Aspergillus niger* نیز گزارش شده است به طوری‌که بیشترین فعالیت آنزیم در محیط تخمیری جامد نسبت به محیط مایع مشاهده شد [٣١]. در قارچ پوسیدگی سفید (White Rot Fungi) نیز در رطوبت پائین بیشترین فعالیت آنزیم مشاهده شد در صورتیکه در رطوبت بیشتر رشد میسیلیوم قارچ افزایش یافته است [٣٢]. با توجه به این‌که فرآیند تخمیر محیط جامد با محیط مایع متفاوت است، رشد میکروبی و فرآیند تخمیر در محیط جامد در نزدیکی سطح ذراتی که رطوبت کمی دارند صورت می‌گیرد [١٧]. در سطوح رطوبتی متفاوت، فعالیت-های متابولیتیکی موجود زنده و در نتیجه سنتز آنزیم لخته‌کننده تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به طوری که رطوبت پایین منجر به کاهش حلالیت مواد مغذی موجود در محیط جامد شده و باعث افزایش تنش آب می‌شود و مقدار رطوبت بیشتر باعث کاهش تخلخل، از بین رفتن ساختار ذرات، افزایش چسبندگی، کاهش مقدار اکسیژن، کاهش تبادل گازها و افزایش تشکیل میسیلیوم‌ها می‌شود [١٣].

یون‌های فلزی در محیط تخمیری برای تولید بهینه پروتئازها مورد نیاز هستند. با این حال پاسخ گونه‌های ژنوتیپی مختلف به یون-های فلزی خاص برای تولید آنزیم متفاوت است. بر اساس نتایج

حاصل از این تحقیق، اضافه کردن یون‌های فلزی به محیط کشت مایع باعث بهبود فعالیت لخته‌کنندگی و نسبت MCA/PA عصاره‌ی آنزیمی قارچ *رایزوموکور میهی* گردید (شکل ۲). محیط مایع حاوی کلرید منیزیم به طور معنی‌داری بیشتر از محیط مایع فاقد یون‌های فلزی می‌باشد. این در حالی است که فعالیت لخته-کنندگی به طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل بین محیط کشت و یون‌های فلزی موجود در محیط کشت قرار گرفت. به طوری‌که در محیط کشت مایع حاوی سولفات مس در مدت زمان کشت ۵ و ۱۰ روزه و دماهای ۳۰ و ۴۲ $^{\circ}C$ و هم‌چنین محیط مایع حاوی کلرید منیزیم در دمای ۴۲ $^{\circ}C$ و مدت زمان کشت ۵ و ۱۰ روزه فعالیت لخته‌کنندگی بیشتری مشاهده گردید (جدول ۲). تأثیر یون‌های فلزی بر تولید آنزیم لخته‌کننده شیر در ریزسازواره‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. اضافه کردن یون‌های منیزیم، کلسیم و مس باعث افزایش تولید آنزیم لخته‌کننده شیر در قارچ *Rhizomucor circinelloides* گردیده است [۲۵]. نیگام و همکاران [۳٤] نشان دادند که اضافه کردن سدیم به محیط کشت باعث کاهش فعالیت لخته‌کنندگی آنزیم رنین در *Bacillus subtilis* می‌شود. گزارش شده که افزودن منیزیم، منگنز و کلسیم در محیط کشت *Trametes ostreiformis* موجب افزایش تولید آنزیم لخته‌کننده شیر می‌شود، در حالی که افزودن مس، روی، کبالت و آهن موجب کاهش تولید آنزیم لخته‌کننده شیر می‌شود [۲۳].

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، بیشترین فعالیت لخته‌کنندگی در ۱۰ روز پس از کشت قارچ *رایزوموکور میهی* و فعالیت پروتئازی در ۵ روز بعد از کشت مشاهده شد. به طوری-که فعالیت لخته‌کنندگی و پروتئازی تحت تأثیر اثرات متقابل نیز در مدت زمان ۱۰ و ۵ پس از کشت بیشترین فعالیت را نشان دادند (جدول ۲). در *Mucor circinelloides* بیشترین فعالیت لخته‌کنندگی در مدت زمان ۵ روز بعداز کشت گزارش شده است [۲۵]. کاظمی وایساری و همکاران نشان نیز بیشترین فعالیت لخته‌کنندگی در قارچ *رایزوموکور میهی* را در ٤ روز بعد از کشت گزارش کرده‌اند [۳۵]. با افزایش مدت زمان تخمیر فعالیت لخته‌کنندگی آنزیم رنین به طور محدودی افزایش می‌یابد که در مقایسه با افزایش فعالیت پروتئازی بسیار کم می‌باشد [۳، ۱۳، ۲۱ و ۳٦].

با مقایسه نتایج تخمیر حالت جامد و تخمیر حالت مایع در شرایط بهینه مشاهده گردید که نسبت MCA/PA در کشت مایع نسبت به کشت حالت جامد کمتر است (جدول ۲) که دلیل آن می‌تواند تغییر در فعالیت پروتئازی آنزیم حاصل از تخمیر باشد. به نظر می‌رسد که در روش کشت مایع به دلیل تولید مقادیر بالاتری از آنزیم‌های پروتئولیتیک غیر اختصاصی و در نتیجه تولید رنین با فعالیت پروتئازی بالاتر، مقدار MCA/PA نسبت به روش تخمیر حالت جامد کاهش می‌یابد [۳۷، ۳۸ و ۳۹]. از طرف دیگر رنین تولید شده از نظر فعالیت لخته‌کنندگی نیز فعالیت کمتری نسبت به آنزیم حاصل از تخمیر حالت جامد دارد به طور کلی، تخمیر حالت جامد در تولید رنین از *رایزوموکور میهی*، به دلیل بهره‌وری حجمی بالاتر و مطلوب بودن کیفیت رنین تولیدی از نظر MCA/PA در مقایسه با کشت مایع از کارایی بالاتری برخوردار است [٦، ۳۸ و ۳۹].

۵- نتیجه گیری کلی

یک محیط مایع ساده برای تولید رنین از قارچ *رایزوموکور میهی* پیشنهاد شده و تأثیر یون‌های فلزی مختلف بر تولید رنین و فعالیت آن مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج این تحقیق شرایط کشت (از قبیل دمای تخمیر، مدت زمان تخمیر و رطوبت محیط کشت) نقش مهمی در میزان تولید و فعالیت آنزیم رنین قارچ *رایزوموکور میهی* دارد. بطوری‌که بیشترین فعالیت لخته‌کنندگی و نسبت MCA/PA به همراه کمترین فعالیت پروتئازی عصاره آنزیمی در محیط کشت جامد با رطوبت ۵ درصد در مدت زمان ۱۰ روز تخمیر در دماهای ۳۰ $^{\circ}C$ تا ۴۲ $^{\circ}C$ بدست آمد. فعالیت لخته‌کنندگی عصاره آنزیمی قارچ *رایزوموکور میهی* در محیط کشت جامد بیشتر از محیط مایع است. فعالیت پروتئازی آنزیم رنین تولید شده در محیط کشت مایع افزایش و قدرت لخته‌کنندگی آنزیم کاهش یافته که باعث کاهش کیفیت پنیر تولیدی (نرمی پنیر و افزایش تلخی) می‌شود. با این حال اضافه کردن یون‌های فلزی به محیط کشت قارچ *رایزوموکور میهی* باعث بهبود قدرت لخته‌کنندگی گردید.

٦- منابع

[1] Sousa, M., and Malcata, F. 2000. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. Lait, 82: 151–170.

[2] Ekstrand, B., Larsson-Raznikiewicz, M., and Perlmann, C. 1980. Casein micelle size and composition related to the enzymatic coagulation process. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 630(3): 361-366.

[3] Fox, PF., McSweeney, PLH., Cogan, TM., and Guinee, TP. 2000. Fundamentals of Cheese Science. Gaithersburg, M.D., USA: Aspen Publishers, Inc. 588p.

[4] Yegin, S., Fernandez-Lahore, M., Guvenc, U., and Goksungur, Y. 2011. Production of extracellular aspartic protease in submerged fermentation with *Mucor mucedo* DSM809. African Journal of Biotechnology, 9: 6380–6386.

[5] Mohanty, A., Mukhopadhyay, U., Grover, S., and Batish, V. 1999. Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. Biotechnology Advances, 17(2), 205-217.

[6] Arima, KY. 1970. Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus*. Methods in Enzymology, 19: 446-459.

[7] Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A., and Shirkot, C. K. 2016. Optimization of milk-clotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 isolated from apple rhizosphere. Bioresources and Bioprocessing, 3:30- 39.

[8] Narwal, RK., Bhushan, BA., and Malhotra, SP. 2016. Optimization of upstream process parameters for enhanced production of thermostable milk clotting enzyme from *Bacillus Subtilis* MTCC 10422. Journal of Food Process Engineering, doi:10.1111/jfpe.12356.

[9] Jacob, M., Jaros, D., and Rohm, H. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. International Journal of Dairy Technology, 64 (1): 14-33.

[10] Neelakantan, S., Mohanty, A., and Kaushik, JK. 1999. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. Current Science, 77(1):143-148.

[11] Ahmed, S., and Helmy, W. 2012. Comparative evaluation of Bacillus licheniformis and Aloe variegata milk-clotting enzymes. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 29 (1): 69-76.

[12] Bailey, MJ., and Siika-Aho, M. 1988. Production of microbial rennin. Biotechnology Letter, 10: 161-166.

[13] Foda, MS., Moharam, ME., Ramadan, A., and El-Bendary, MA. 2012. Over production of milk clotting enzyme from R*hizomucor miehei* through adjustment of growth under solid state fermentation conditions. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 6(8): 579-589.

[14] Sathya, R., Pradeep BV., Angayarkanni, J. and Palaniswamy M.2009. Production of Milk Clotting Protease by a Local Isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using Agro-industrial Wastes. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14: 788-794.

[15] Silveira, GG. 2005. Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48: 931-937.

[16] Thakur, MS.and Karanth, NG. 1990. Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 32: 409-413.

[17] Preetha, S., and Boopathy, R. 1994. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 13: 573.

[18] Cupp-Enyard, C. 2008. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. Journal of Visualized Experiments: JoVE, (19), 899. http://doi.org/10.3791/899.

[19] Pandey, ACR., Soccol, P., Nigam, D., Brand, R., Mohan, S. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochemical Engineering Journal, 6: 153-162.

[20] Vishwanata, KS., Rao, SA., Singh, AG. 2010. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Applied Microbiology and Biotechnology, 85: 1849-1859.

[21] Preetha, S., Boopathy, R. 1997. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 13:573–578.

[22] Nouani, A., Moulti- Mati, S., Belbraouet, MM. 2011. Purification and characterization of a milk- clotting protease from *Mucor pusillus:* Method comparison. African Journal Biotechnology, 10 (9): 1655- 1665.

[23] Pei-Jing, Yu., and Cheng-Chun, Chou. 2005. Factors affecting the growth and production of milk-clotting enzyme by *Amylomyces rouxii* in rice liquid medium. Food Technology and Biotechnology, 43 (3): 283–288 .

[24] Holker, U., and Lenz, J. 2005. Solid-state fermentation-are there any biotechnological advantages?. Current Opinion in Microbiology, 8: 301-306.

[25] Sathya, R., Pradeep, BD., Angayarkanni, J., and Palaniswamy, M. 2009. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14: 788-794.

[26] Nouani, AN., Belhamiche, R., Slamani, F., fazouane, S., belbraouet, MM. 2009. Purification et characterization electrophoretique d'une protease coagulant le lait de *Mucor pusillus*: comparasion de methods. African Journal of Biotechnology, 35, 512-521.

[27] Sato, S., Tokuda, H., Koizumi, T., Nakanishi, K. 2004. Purification and characterization of an extracellular proteinase having milk-clotting activity from *Enterococcus faecalis* TUA2495L. Food Science Technology Research, 10(1): 44-50.

[28] Sushil, K., Neeru, SS., Mukh, RS., Randhir, S. 2005. Process Biochemistry, 40: 1701-1705.

[29] Magda, AE., Maysa, EM., Thanaa, HA. 2007. Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme Produced by *Bacillus sphaericus*. Journal of Applied Sciences Research, 3(8): 695-9.

[30] Vaysari, AK., kheirolomoom, A., Arjmand, M., and Habibollahi, M. 2002. Optimization of *Mucor miehei* rennin production and recovery. Scientia Iranica, 9: 99 – 104.

[31] Lekha, PK., and Lonsane, BK. 1994. Comparative titres, location, and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL104 in solid state, liquid surface, and submerged fermentation. Process Biochemistry, 29; 497-503.

[32] Zandrazil, F., and Brunert, H. 1981. Investigation of physical parameters important for solid-state fermentation of straw by white rot fungi. European journal of applied microbiology and biotechnology, 11; 183-188.

[33] Krishnawamy, MA., Nagaraja Rao, KS., Sreekantiah, KR., and Mannar, MC. 1976. Production of fungal rennet substitute for cheese making. Journal of Food Science and Technology,13: 187-191.

[34] Nigam, JN., Pillai, KR., and Baruah, JN. 1981. Baruah, Effect of carbon and nitrogen sources on neutral proteinase production by *Pseudomonas aeruginosa*. Folia Microbiologica, 26; 358–363.

[35] Kazemi-Vaaysari, A., Kheirolomoom, M., Arjmand, G., and Habibollahi, H. 2002. Optimization of *Mucor miehie* Rennin Production and Recovery. Scientia Iranica, 99-104.

[36] Silva, BL., Geraldes, FM., Murari, CS., Gomes, E., and Da-Silva, R. 2014. Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. Applied Biochemistry and Biotechnology, 172 (4): 1999–2011.

[37] Lasure, LL. 1980. Regulation of extercelular acid protease in *Mucor miehei*. Mycologia, 72: 483-493.

[38] Thakur, MS. 1991. Production of fungal rennets by *Mucor miehei* using solid state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 32: 409-413.

[39] Ibrahim, MK. 1973. Stady on microbial rennet product by *Mucor miehei*. Journal of Dairy Science, 1: 127-140.

Factors affecting milk- clotting enzyme production and activity from *Rhizomucor miehei*

Rashedi, P. [1], Zare, N. [2*], Fathi-Achachlouei, B. [3], Asgarie Zacaria, R.[2]

1. MSc. Graduated student of Agricultural Biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2. Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

(Received: 2016/08/20 Accepted:2017/08/13)

Rennin produced by *Rhizomucor miehei* due to the higher milk- clotting activity and heat resistance, and lower protease activity has been attracted the most attention in cheese production industry in comparison with other fungal proteases. In this study, the effects of different factors including moisture content of solid medium (5, 10 and 20 %), culture temperature (30 ˚C, 37 ˚C and 42 ˚C), metal ions (magnesium chloride, copper sulfate, manganese chloride) in liquid medium and culture period (5 and 10 days) on production of milk- clotting enzyme in *Rhizomucor miehei* were investigated. The results showed that milk- clotting and protease activity, and MCA/PA ratio of *Rhizomucor miehei* rennin were significantly influenced by aforementioned factors. The milk- clotting activity and MCA/PA ratio of rennin obtained from solidified medium were significantly higher than those of liquid medium. Rennin production by *Rhizomucor miehei and its* milk- clotting activity was improved by addition of metal ions to the liquid medium. Among the liquid media, medium containing magnesium chloride led to the higher clotting activity as compared with media without metal ions and supplemented with copper sulfate and manganese chloride. The highest milk- clotting activity was achieved on solid medium with 5% moisture content and 10 days culture at 30, 37 or 42 ˚C, which was significantly higher than that of other treatments.

Keywords: Rennin enzyme, Cheese, Milk- clotting activity, Protease activity

* Corresponding Author E-Mail Address: zaren@uma.ac.ir