جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الانبار
كلية العلوم التطبيقية – هيت
قسم الكيمياء التطبيقية

الفعاليات التطبيقية الصناعية للإنزيمات المستخلصة

بحث تقدم به الطلاب

عبد الملك ناصر عبد الدايم

حسن فالح عبد الحسن

وسام صالح حميد

الى مجلس كلية العلوم التطبيقية هيت كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في الكيمياء التطبيقية

الأشراف

ا.د بلال جاسر محمد الراوي

م.م مسلمة محمود

2024م 1445هـ

بسم الله الرحمن الرحيم

(وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُو مِنْهُ مِن قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ ۚ وَمَا يَعْزُبُ عَن رَّبِّكَ مِن مِّثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِن ذَٰلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُّبِينٍ)

صدق الله العلي العظيم

سورة يونس الايه 61

الاهداء

الحمد لله حُبا وشكرا وامتنانا , ما كنت لأفعل هذا لولا فضل الله فالحمد لله على البدء وعلى الختام

(وَآخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنِ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ)

من قال أنا لها "نالها "

وأنا لها وان ابت رغما عنها أتيت بها

لم تكن رحلة قصيرة ولاينبغي لها أن تكون , لم يكن الحلم قريبا ولا الطريق كان محفوفا بالتسهيلات لكنني فعلتها ونلتها

أهدي هذا النجاح لنفسي أولا ثم الى كل من سعى معي لأتمام هذه المسيرة , دُمتم لي سندا لاعُمر له

أهدي ثواب هذا البحث الى من لاينفصل اسمي عن اسمائهما الى مأمني الوحيد فرحتي الدائمة الى مصدر قوتي الذي طالما عاهدتهم بهذا النجاح ها أنا أتممت وعدي واهديته اليكما

"والدي"

والى من كانوا بفكرهم علماء وبتواضعهم رفعاء وبترافعهم كبراء اساتذتي الكرام كل باسمه ولقبة وكما أتقدم

بالشكر الخاص لدكتور (بلال جاسر) والست (مسلمه محمود) لما قدماه لي من توجيه وارشاد في اعداد هذا البحث

الشكر والتقدير

قال تعالى (وَمَن يَشْكُرْ فَإِنَّمَا يَشْكُرُ لِنَفْسِهِۦ)

الشكر والثناء لله عز وجل الذي وفقنا لإتمام هذا البحث العلمي والذي اكرمنا الصحة والعافية والعزيمة فالحمد لله حتى الحمد منتهاه

ثم نتقدم بالشكر والتقدير وعظيم الامتنان الى كل من

السيد عميد الكلية الأستاذ الدكتور تحسين علي زيدان

وصاحب العقل النير الدكتور بلال جاسر محمد المشرف على البحث

والست مسلمه محمود المساعدة في اعداد هذا البحث لتفضلها الكريم بالإشراف على هذا البحث وعلى كل ما قدماه لنا من توجيهات ومعلومات قيمه ساهمت في اثراء موضوع دراستنا في جوانبها المختلفة

كما نشكر الدكتورة الفاضلة هدى عل كل ما قدمته لأجل نجاح هذا البحث

كما نشكر جميع الأساتذة والزملاء الذين قدموا لنا المساعدة مهما كانت طبيعتها والى كل من قدم لنا تشجيعا مهما بلغت درجته

الملخص

الأنزيمات عباره عن محفزات بيولوجية للتفاعلات الكيميائية والتي تستخدم في العديد من الصناعات الحالية ومن بين هذه الأنزيمات أنزيم البروتياز القلوي وهو الأنزيم الذي يعمل كمحفز حيوي لتحلل البروتينات إلى ببتيدات وأحماض أمينية وللبروتياز القلوي تطبيق واسع النطاق في مختلف الصناعات مثل صناعة المنظفات والجلود والورق والصناعة الغذائية واسترداد الفضة وغيرها ذلك بسبب أهميتها الحيوية وسهولة الحصول عليها حيث تكون هذه الأنزيمات موجودة في جميع الكائنات الحية مثل النباتات والحيوانات والأحياء الميكروبية وتعد الأحياء الميكروبية أفضلها ذلك لأنها مصدر فعال وغير مكلف ويمكنها أنتاج أمدادات مستمرة من المنتج المطلوب وأيضاً تكون متوفرة في أغلب الأماكن مثل التربة والماء والحليب وغيرها في هذه الدراسة تم استخلاص أنزيم البروتياز القلوي من بكتريا B. subtilis وتم اختبار فعاليته ليدخل في صناعة المنظفات وصناعة الجلود واسترداد الفضة من أفلام الأشعة السينية وأظهر الأنزيم القلوي نتائج ممتازة في أزالة البقع البروتينية الموجودة على قطع القماش بعد عمليات نقع وتجفيف متفاوتة من 5-30 دقيقة كما أزال الأنزيم شعر جلد الماعز بالكامل خلال فترة حضانة مدتها 24 ساعة وحقق نتائج جيدة في استرداد الفضة من أفلام الأشعة السينية في فترة حضانة 24 ساعة.

كلمات مفتاحية :

الانزيمات , بكتريا , البروتياز القلوي , صناعات المنظفات , إزالة الشعر

إقرار المشرف

اشهد ان اعداد هذا البحث **(الفعاليات التطبيقية الصناعية للإنزيمات المستخلصة) دراسة تطبيقية والتي قدمها ثلاث من طلاب (حسن فالح ,عبد الملك ناصر , وسام صالح) ولقد تم اجراء البحث تحت اشرافي في جامعة الأنبار_كلية العلوم التطبيقية _ هيت وهي جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في الكيمياء التطبيقية .**

ا.د بلال جاسر محمد

التوقيع :

بناءا على التوصيات المتوافرة ارشح هذا البحث للمناقشة

م.م مسلمة محمود

التوقيع :-

رئيس قسم الكيمياء التطبيقية أ.م.د مروان محمد فرحان

التوقيع :-

تاريخ :- / / 2024

الفهرست

الآية الكريمة I
الاهداء II
شكر وتقدر.....III
الملخص IV
اقرا المشرف V
فهرس المحتويات.....VI
الفصل الأول 1
1.1المقدمة 2
1.2 هدف البحث 1.3أهمية البحث ,.....3
الفصل الثاني : مراجعة المصادر.....4
2.1 الانزيمات 2.2 خصائص الانزيمات 5
2.3 اهميه الانزيمات في الصناعه 2.4 تطبيقات الانزيمات في الصناعة 6
2.5 البكتريا 7
2.6 فصل وتنقية الانزيمات 7
2.7 أنواع Bacillus 8
2.8البروتياز القلوي 8
2.9 تطبيقات البروتياز القلوي في الصناعة 9
2.10 تحسين انتاج البروتياز القلوي 12
2.11 العوامل المؤثره على انتاج البروتياز القلوي 12
2.12 بعض الحقائق التاريخية 13
الفصل الثالث 14
3.1 المواد وطرق العمل 14
3.1.1عزل البكتريا وإنتاج الانزيم 15
3.1.2 التجارب العملية للانزيم 16
3.1.3 إزالة الشعر.....17
3.1.4 استراد الفضه من أفلام الاشعه السينه 18
3.2 النتائج والمناقشة 19
3.3 الاستنتاجات والتوصيات 20
المصادر 23

الفصل الأول

1.1المقدمة

1.2هدف البحث

1.3 أهمية البحث

1.1 المقدمة:

بأعتبارها واحدة من الإنزيمات الأكثر استخدامًا على نطاق واسع، تعتبر البروتياز من الإنزيمات الأكثر قيمة وقوة حيث تمثل حوالي 60٪ من استخدام الإنزيم العالمي بسبب كفاءتها في تحطيم مركبات البروتين المعقدة إلى أحماض أمينية وببتيدات [48]. تعتبر البكتيريا المصدر الأكثر امتيازا لإنتاج ثلاثة أنواع رئيسية من البروتياز الحمضية والمحايدة والقلوية من بينها وتتمتع البروتياز المحايدة والقلوية بإمكانية تطبيق كبيرة في صناعة المنظفات الإنزيمية وصناعة الجلود بسبب الاتجاه المتزايد لتطوير التقنيات الصديقة للبيئة (9).

يتم تصنيف البروتياز أو الببتيدات على أنها إنزيمات محللة للبروتين. التحلل البروتيني :هو إجراء يتم من خلالها التحلل المائي للروابط الببتيدية [67]. للبروتياز تطبيقات صناعية ديناميكية والبروتياز القلوي يحتل من بينها 52% من إجمالي الجزيئات بين الأجزاء الرئيسية لمجموعة الإنزيمات هذه [18]. تلك المجموعات من الإنزيمات التي تظل نشطة عند درجة حموضة قلوية عالية من 7 إلى 11 مع درجة حموضة مثالية 9 هي البروتياز القلوي(68) ولا بد أن ننوه على أن العديد من العمليات الصناعية لا تحظى بقبول المجتمع لأنها تسبب العديد من المشاكل البيئية. تعتبر صناعة الجلود من الصناعات التي رفضتها الكثير من المجتمعات وذلك بسبب تلوث الهواء والرائحة الكريهة[44]. ولإنهم بحاجة إلى مواد كيميائية في مراحل مختلفة من عمليتها للقضاء على الرائحة الكريهة وتلوث الهواء. يمكن أن يساهم الإنزيم في هذا الدور عن طريق إزالة الروائح الكريهة بكفاءة وتقليل تلوث الهواء. تساهم الإنزيمات بدور كبير في التطبيقات المختلفة [48]. يعد الإجراء الأنزيمي أحد البدائل القابلة للصيانة والمواتية للإجراءات التقليدية [69].

يعد استخدام الطاقة منخفضة التكلفة والحد من التلوث البيئي من المزايا الرئيسية للإنزيمات [60]. تساهم البروتياز بحوالي 60-65% من إجمالي قيمة الإنزيم بسبب قابليتها للتطبيق التي لا تعد ولا تحصى في صناعات مختلفة مثل الجلود واللب والورق والمنظفات والأغذية ومعالجة اللحوم وصناعة الجبن والمعالجة الحيوية واستخلاص الفضة من الأفلام الفوتوغرافية. وبالمثل في العلاجات ، يمكن أيضًا استخدام هذه الإنزيمات لعلاج الآفات الضارة والالتهابات [40,70]. تمت تنقية العديد من البروتياز وتمييزها من مصادر مختلفة. تعتبر البكتيريا والفطريات هي الأكثر أهمية من جميع مصادر البروتياز الأخرى. تُظهر البروتياز الميكروبي أنشطة تحلل للبروتين في نطاق واسع من الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة مقارنةً بالبروتياز المعزول من مصادر الحيوانات والنباتات [61]. في الغالب تكون الإنزيمات الميكروبية خارج الخلية وتفرز مباشرة في وسط الإنتاج؛ ومن ثم يتم عادةً فصل الخلايا الميكروبية عن وسط الاستزراع عن طريق عملية الطرد المركزي أو في بعض الحالات عن طريق تقنيات الترشيح، مما يترك الإنزيم الخام في شكل طاف من المرشحات.

وتتركز مكونات البكتريا عن طريق التمليح. يتم تقليل قابلية ذوبان البروتينات المرغوبة بواسطة كبريتات الأمونيوم وهي العوامل المعتادة المستخدمة في الترسيب [71]. تزيد الأنشطة النوعية لإنزيمات البروتياز الخام إلى عدة أضعاف عند 70% من مستوى تشبع كبريتات الأمونيوم [72]. على المستوى التجاري B. subtilis تعتبر المنتج الرئيسي للبروتياز القلوي (7).

تحتوي البروتياز القلوية على كتلة جزيئية متنوعة تتراوح بين 20 إلى 130 كيلو دالتون [7,24]. عادةً ما يتم العثور على تشكيلة الأس الهيدروجيني المثالية للبروتياز القلوي في نطاق الأس الهيدروجيني 8-11 [12]. في حالات قليلة تم الإبلاغ عن الرقم الهيدروجيني الأمثل 12 [11]. تتراوح درجة الحرارة المثلى للبروتياز القلوي من المصادر الميكروبية بين 50-70 درجة مئوية (21) أجريت هذه الدراسة على تنقية وتوصيف البروتياز القلوي المنتج من البكتريا لأختبار فعاليته في صناعة المنظفات وصناعة الجلود وأسترداد الفضة من أفلام الأشعة السينية.

1.2 هدف البحث:

أنتاج البروتياز القلوي من السلالات البكتيرية المعزولة من التربة وأجراء أختبارات لفعالية الأنزيم في صناعة المنظفات والجلود وأسترداد الفضة من أفلام الأشعة السينية.

1.3 أهمية البحث :

تكمُن أهمية هذا البحث في أيجاد طرق صناعية جديدة صديقة للبيئة وقليلة الكلفة وذات قدرة إنتاجية عالية حيث أثبتت الأنزيمات ومن بينها البروتياز القلوي قدرتها الواسعة في العديد من الصناعات من بينها أزالة البقع البروتينية، أزالة شعر جلد الماعز واسترداد الفضة من أفلام الأشعة السينية وأظهرت نتائج ممتازة في هذا المجال.

الفصل الثاني

مراجعة المصادر

2.1 . الانزيمات

2.2 . خصائص الانزيمات

2.3. اهمية الانزيمات في الصناعة

2.4. تطبيقات الانزيمات في الصناعة

2.5. البكتيريا

2.6.طرق عزل الإنزيمات في البكتيريا

2.7. أنواع Bacillus

2.8. البروتياز القلوي Alkaline protease

2.9.تطبيقات في الصناعة Alkaline protease

2.10. تحسين انتاج Alklaine proteas

2.11العوامل المؤثرة على إنتاج البروتياز القلوي

2.12بعض الحقائق التاريخية

2.1.الانزيمات:

عُرفت الانزيمات على انها جزيئات عضوية من اصل بروتيني لتحفيز التفاعلات الكيميائية الحيوية ولا تشارك بشكل فعال في التفاعلات ككاشف(٤١)

وهي تتكون أساساً من جزأين ولتوضيح ذلك:

اولآ : الجزء البروتيني المسمى (apoenzyme)

ثانياً : الجزء غير البروتيني المسمى العامل المساعد (cofactor) وربما يكون العامل المساعد أيون معدني أو جزء غير عضوي واللذان يؤديان معاً إلى ظهور الأنزيم الوظيفي الكامل(holonzyme) (٣١)

ومن زاوية أخرى تعتبر الأنزيمات مساعدات بيولوجية طبيعية غروية متغيره بالحرارة ذات طبيعة بروتينية تخلق بواسطة الخلايا الحيه وهي عوامل متخصصة في عملها أي كل أنزيم يساعد على تفاعل معين ولا يفوتنا أن ننوه على أن الأنزيمات تدخل في العديد من المجالات مثل الاستعمالات الطبية، الزراعية، الصناعية، البحوث الأكاديمية وغيرها من التطبيقات العديدة.(٦٣)

2.2.خصائص الانزيمات:

للأنزيمات خصائص مهمه ولابد من الأشارة إلى تلك الخصائص

١-الحفز catalysis: يعتبر الأنزيم محفز كيميائي وهو مسؤول عن تسريع معدل التفاعل الكيميائي

٢-الخصوصيةspecificity: هي السمه المميزة لمعظم التفاعلات البيولوجية على سبيل المثال تتفاعل الجزيئات مثل المستقبلات والأجسام المضادة بشكل خاص مع نظيراتها المشابهة(٥٨)

٣-التنظيمregulation: السمة الثالثة للأنزيمات هي قدرتها على العمل كنقاط تنظيمية لعملية التمثيل الغذائي وحري بنا التطرق إلى أن كل أنزيم هو عبارة عن عالم بنيوي مصغر قادر على التحفيز والنوعية والتنظيم ولا بد من التأكيد على أن التفاعلات الكيميائية الذي يقوم بها الأنزيم تحدث على مكان محدد من البروتين يسمى الموقع النشط حيث يتم تجميع المواد المتفاعلة(الركائز) في موقع الأنزيم النشط.(٣٥)

2.3.اهمية الانزيمات في الصناعة:

أستناداً إلى ماسبق إن الأنزيمات هي عبارة عن محفزات عالية الكفاءة تم بحثها من أجل التحفيز على المستوى الصناعي بسبب مزايها العديدة المتميزة التي تتراوح بين تشغيلها في ظروف تفاعل أكثر إعتدالاً وإنتقائية المنتج الأستثنائية وميزتها البيئية والفسيولوجية المنخفضة(٥٤)(٣٤) وبناءً على ذالك من المزايا المذكورة أعلاه قد تبين أن الأنزيمات تسبب انخفاض تكاليف التشغيل إذا تم أستعمالها كمحفزات حيوية في العمليات الكيميائية ذلك بسبب متطلباتها المنخفضة من الطاقة وتخفيف توليد النفايات وطرق الإنتاج المبسطة(٣٨)(١٥) ونتيجة لذلك تم استعمال الأنزيمات في العديد من الصناعات مثل الصناعات الدوائية والأغذية والمشروبات وغيرها.(٢٥)(٤٦)

2,4.تطبيقات الانزيمات في الصناعة:

كما ذكرنا سابقاً أن الأنزيمات تستعمل في العديد من الصناعات مثل الصناعات الدوائية والغذائية وغيرها لذا ومن هذا المنطلق فيما يلي جدول يوضح بعض التطبيقات الصناعية للأنزيمات

الصناعة	الانزيم	التطبيق	المصادر
المستحضرات الصيدلانية	نيتريل هيدراتاز، ترانساميناز، أوكسيديز أحادي الأمين، ليباز، بنسلين أسيلاز.	توليف المواد الوسيطة لإنتاج المكونات الصيدلانية الفعالة	١٦
معالجة الغذاء	التربسين، الأميليز، الجلوكوز إيزوميراز، غراء، البكتيناز	تحويل النشا إلى جلوكوز، الإنتاج إنتاج شراب عالي الفركتوز البريبايوتكس، debittering عصير الفاكهة	٦
منظف	البروتياز، الليباز، الأميليز، السليوليز	إزالة البقع وإزالة الدهون والزيوت، الاحتفاظ بالألوان	١٤
الوقود الحيوي	الليباز، السليوليز، الزيلاناز	إنتاج استرات ميثيل الأحماض الدهنية، تحلل المواد اللجينية الخلوية لإنتاج الإيثانول الحيوية	٣٠

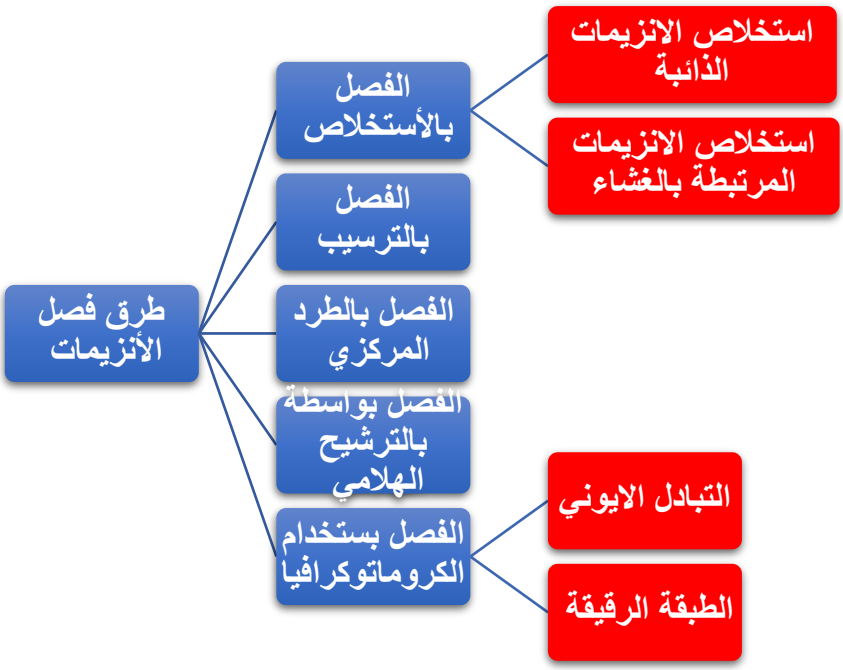
2.5. البكتيريا:

يتم انتاج البروتياز القلوي من الاحياء الميكروبية والنباتات والحيوانات وتعتبر البكتريا افضلها والتي هي عبارة عن أحياء دقيقة بدائية النواة تنتشر هذه الأحياء في جميع البيئات على سطح الأرض ولابد من الشارة إلى أن البكتريا تؤدي

دوراً مهماً في العديد من الصناعات وتقسم البكتريا إلى ثلاث أقسام تبعاً لحاجتها للأوكسجين أولاً بكتريا هوائية مثل B. subtilis ثانياً لاهوائية مثل clostridium ثالثاً أختيارية مثل Entrococcus انتروكوكس(٦٢) تعتبر البكتريا من أهم المصادر لأنتاج الأنزيمات وخصوصاً أنزيمات البروتياز حيث تنتج ثلاث أنواع منها الحمضية والمتعادلة والقلوية ومن بين هذه الأنواع يتمتع البروتياز القلوي بأمكانية تطبيق كبيرة في صناعات المنظفات والجلود بسبب الحاجة لتطوير تقنيات جديدة صديقة للبيئة ولايفوتنا أن ننوه أن من بين أنواع البكتريا العديدة تعد بكتريا B. subtilis المنتج الرئيسي للبروتياز القلوي.(٧)

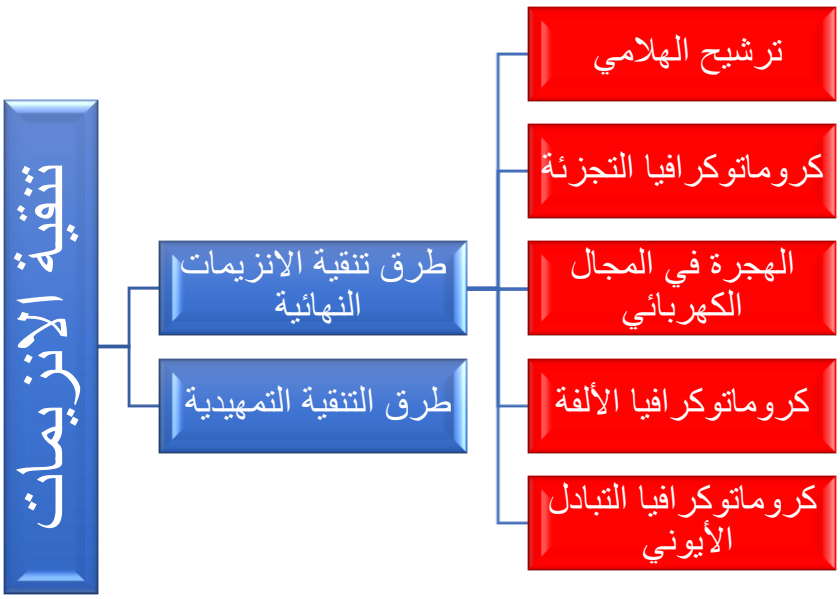
2.6 فصل وتنقية الانزيمات

اولا:



(٦٣)

ثانيا:



(٦٣)

7.2: بعض انواع Bacillus

البكتريا	مصدر العزله	PH (الأمثل)	درجةالحرارة(المثلى)	المصادر
Bacillus firmus 7728	التربة المأخوه من مصانع الجلود	9	40C°	١٩
Bacillus licheniformis YP1A	التربة الملوثة بالنفط الخام	9.5	60C°	١٣
Bacillus megaterium	المرق المخمر من صلصة سمك التايلاندية	10	50C°	٢٩
Bacillus sp	التربة	9	40C°	١
Bacillus sp. B001	السماد	10	60C°	٥
Bacillus pumilus MK6-5.	عينه من تربة الصودا	11.5	55-60C°	١٠
Bacillus cereus RS3	التربة الصحراوية	9	45C°	٢٣

2.8. البروتياز القلوي Alkalineprotease

البروتياز هي الأنزيمات المهمة التي تكسر روابط الببتيد في البروتينات وتحللها إلى ببتيدات صغيرة وأحماض أمينية وتمثل حوالي 65% من أجمالي سوق الأنزيمات الصناعية (٢٧)ولعله من المفيد أن نؤكد على أن أنزيمات البروتياز هي الفئات الرئيسية للأنزيمات الصناعية التي تنتجها مجموعة واسعة من الميكروبات مثل البكتريا والعفن والخمائر وتتواجد أيضاً في النباتات والأنسجة الحيوانية المختلفة (٦١)وفضلاً عن ذلك تشكل البروتياز ذات الأصل الميكروبي حوالي 40% من الأنتاج العالمي للأنزيمات حيث تنتج البكتريا البروتياز خارج الخلية بكميات كبيرة والتي تنشط عند PH عالي وعلاوة على ذلك فأنه أنزيمات البروتياز الناتجة من البكتريا مهمة في الصناعات مثل الجلود والمنظفات والأدوية وغيرها من الصناعات العديدة(١١)(٣٧) وتماشياً مع ماتم ذكره فأن من بين هذه الأنزيمات البروتياز القلوي (Alkalineprotease) الذي يتمتع بأمكانية تطبيق كبيرة في المنظفات الأنزيمية وصناعة الجلود بسبب الأتجاه المتزايد لتطوير التقنيات الصديقة للبيئة (٩)(٥٣)وناهيك عن ذلك فأن البروتياز القلوي يحتل نسبة 52% من بين تطبيقات أنزيمات البروتياز الصناعية والديناميكية(١٨) كذلك يتمتع البروتياز القلوي بكتلة جزيئية تتراوح من 20 إلى 130 KD (٢٤)بينما الأس الهيدروجيني الأمثل PH لأنتاج البروتياز القلوي من 8 إلى11 (١٢)ودرجات الحرارة المثلى بين 50 إلى 70 درجة مئوية.(٢١)

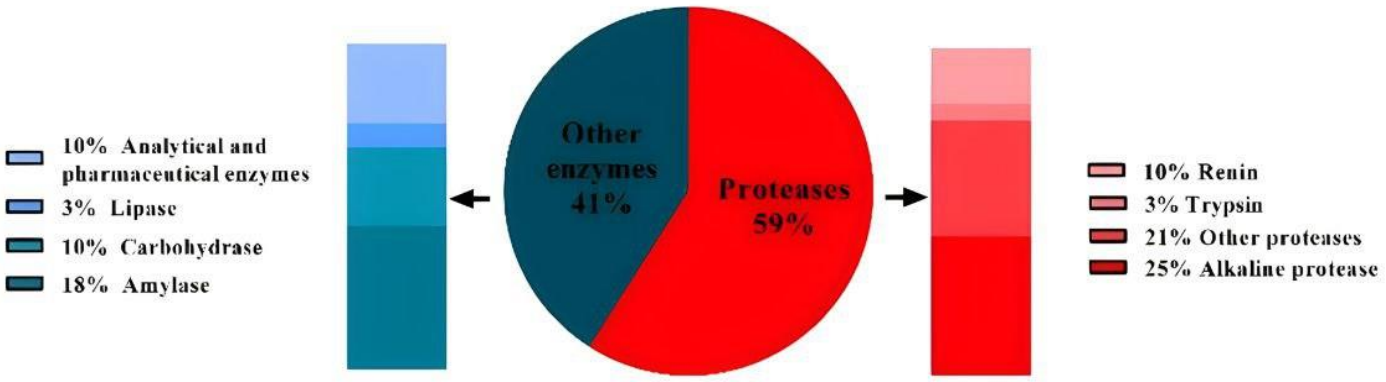


FIGURE 1
Contribution of types of proteases (red portion) in annual sales of the total enzyme. Source: adapted and modified from reference (Rao et al., 1998).

(٥٢)

2.9 تطبيقات البروتياز القلوي في الصناعة

في مستهل الحديث العديد من العمليات الصناعية لاتحظى بقبول في المجتمع لأنها تسبب العديد من المشاكل البيئية حيث تعتبر صناعة الجلود من الصناعات التي رفضتها الكثير من المجتمعات وذلك بسبب تلوث الهواء والرائحة الكريهة(٤٤) حيث أنهم بحاجة كبيرة إلى مواد كيميائية في مراحل مختلفة لحل هذه المشاكل لا سيما أن الأنزيم يمكنه أن يساهم بهذا الدور ذلك لأن الأنزيمات تساهم في العديد من التطبيقات المختلفة (٤٨)حيث يعد أستخدام الطاقة منخفضة التكلفة والحد من التلوث البيئي من المزايا الرئيسية للأنزيمات (٦٠)ومن هذا المنطلق سنذكر بعض تطبيقات البروتياز القلوي في الصناعة

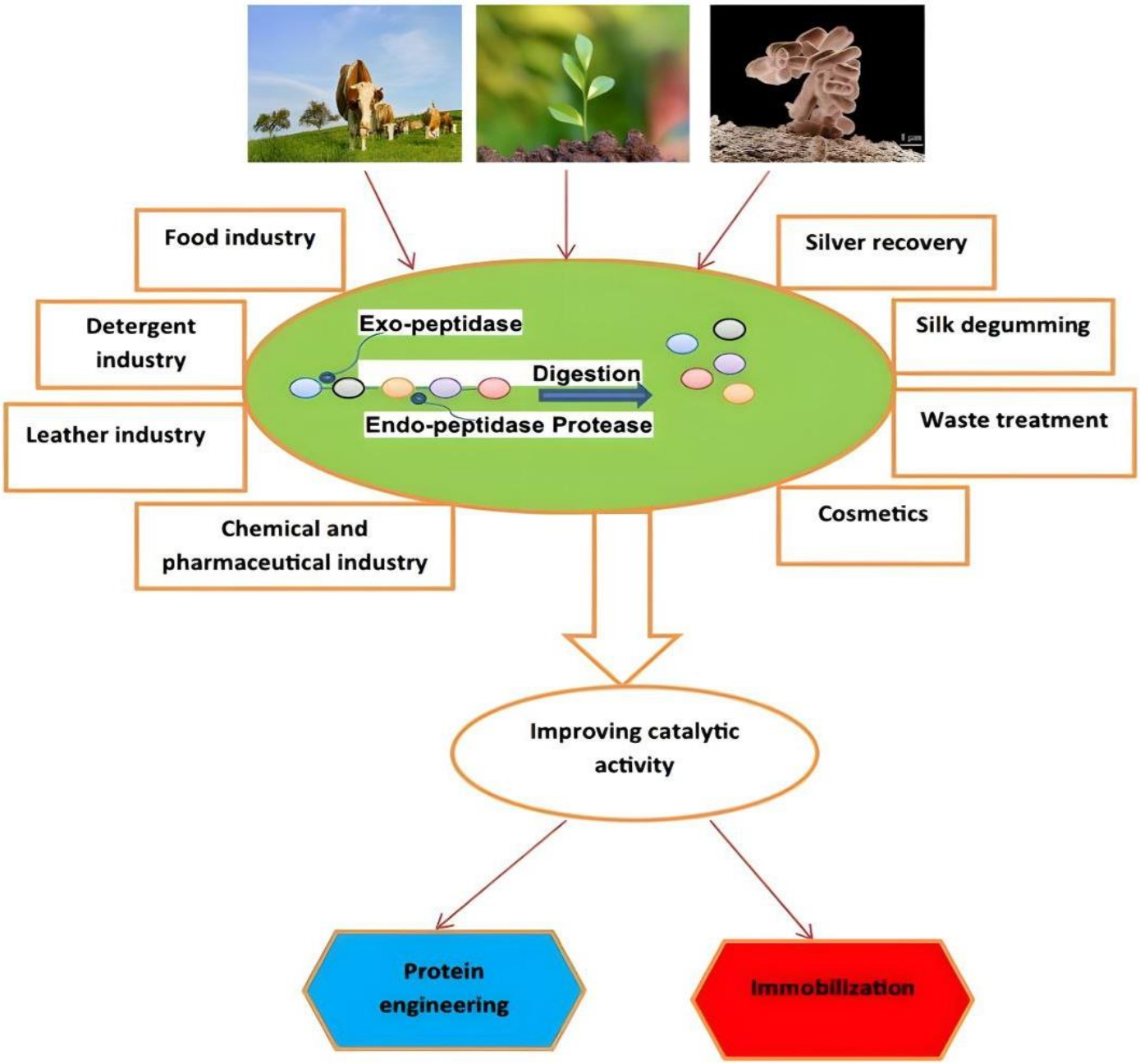
١-صناعة المنظفات: تعتبر الأنزيمات من الأضافات الأساسية والقياسية في المنظفات حيث يمكنها أزالة جميع أنواع المواد البروتينية وعلاوة على ذلك تعمل انزيمات البروتياز ضد مجموعة واسعة من الركائز مما يجعل من المفيد أزالة بقع الأطعمة والدم ودرجة حرارة الجسم والقدرة على تحمل المواد الخافضة للتوتر السطحي وهذا إن دل على شيء إنما يدل على أن البروتياز القلوي مرشحاً لا غنى عنه في التطبيقات الصناعية(٤٧)

٢-صناعة الجلود: يكون للبروتياز القلوي تطبيقات واسعة النطاق في عمليات مختلفة مثل النقع وأزالة الشعر من الجلود حيث أن هذا العلاج الأنزيمي يزيل غير المرغوب فيه ويزيد من مساحة الجلد وينتج بشرة نظيفه(٣٣)

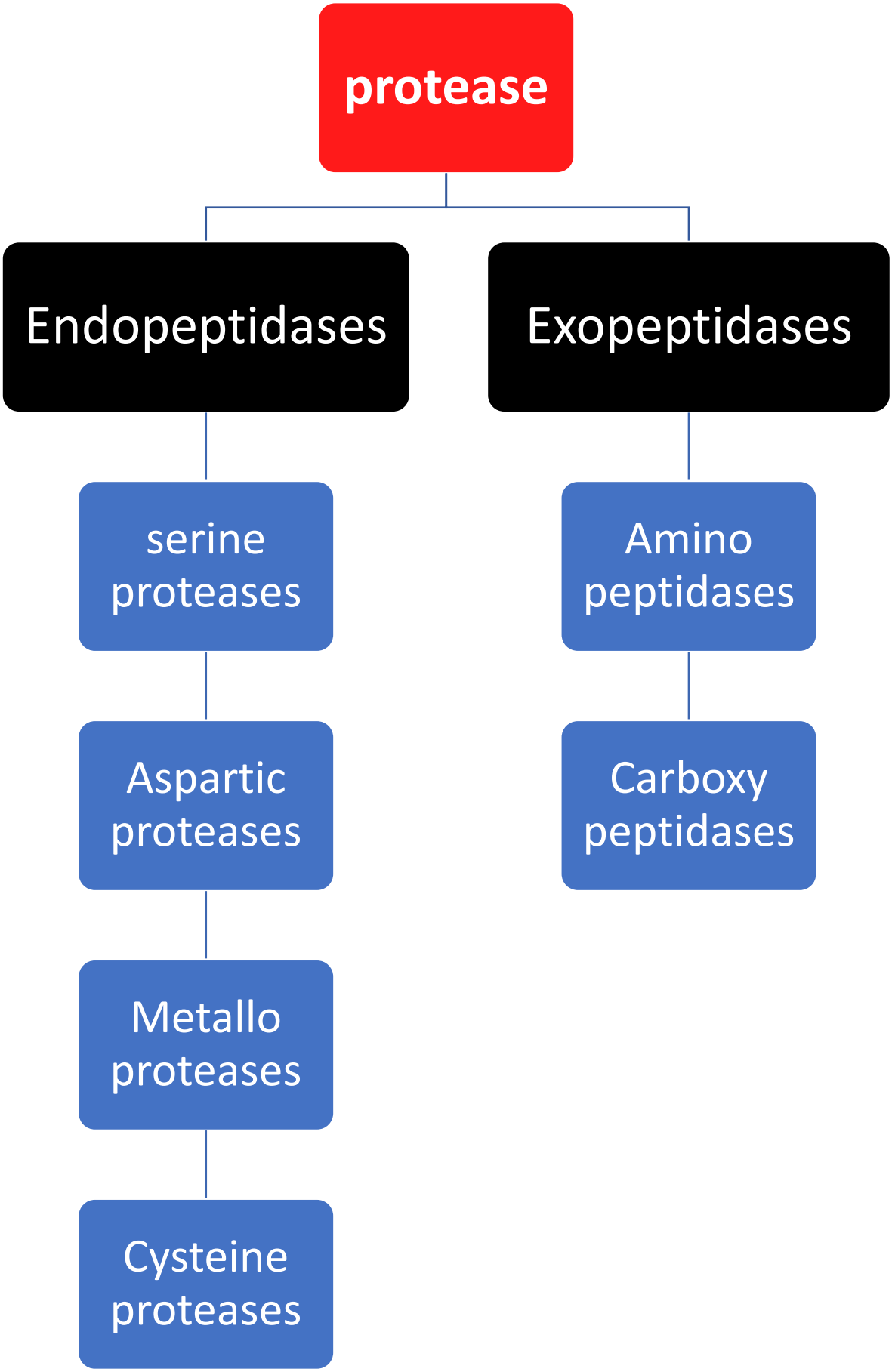
3-صناعة المواد الغذائية: يعتبر أنتاج الجبن هو التطبيق الأساسي للبروتياز في صناعة الألبان للحصول على نكهة جيدة(٤٢).

4- صناعة المستحضرات الصيدلانية: يعد التنوع الكبير للبروتياز من المزايا المهمه في تطوير عوامل علاجية فعالة ولتوضيح ذلك تم استخدام البروتياز القلوي لعلاج اضطرابات الجهاز الهضمي عن طريق تناوله عبر الفم(٥١)

5-أسترداد الفضة: يمكن أستخدام التحلل المائي للجيلاتين الموجود في أفلام الأشعه السينية بأستخدام البروتياز القلوي كخيار بديل لأستعادة الفضة(٥٧)



مخطط يوضح مصادر البروتياز القلوي وتطبيقاته في الصناعة



مخطط يوضح تصنيف البروتياز القلوي

2.10تحسين انتاج البروتياز القلوي

لتحسين إنتاج البروتياز القلوي نحتاج إلى عدة خطوات :

أولها :تعين الرقم الهيدروجيني الأمثل للبروتياز القلوي والذي يكون من ٨ إلى ١١(١٢)

ثانيا: ًتعين درجة الحرارة المثلى للأنزيم والتي يكون نطاقها من 25إلى٤٥ (٤٣)

ثالثا: ًفترة الزراعة والتي تلعب دورا ًمهما ًفي أنتاج الأنزيم البروتيني القلوي (٤٩)رابعا ًوجد أن عند وجود أيونات المعادن Ca^{+2} Mg^{+2} Mn^{+2}, , يزداد نشاط الأنزيم وفي المقابل ينخفض نشاطه عند وجود Fe^{+3} Cu^{+2} Hg^{+2} (32)

خامسا ً:أستخدام مصادر النيتروجين والكربون المناسبة حيث أن الأنزيم يتأثر بمصادر الكربون والنيتروجين المستعملة في الوسائط(٥٥)(٥٦)

سادسا: ًتركيز كبريتات الأمونيوم المناسب والتي تزيد من نشاط الأنزيم عندما يكون تركيزها 70%(٢)

2.11 العوامل المؤثره على انتاج البروتياز القلوي

1. تأثير فترة الحضانة على الأنزيم: تؤثر فترة الحضانة على أنتاج البروتياز القلوي حيث كشفت دراسة الدورة الزمنية في تخمير دورق الرج مع الوسائط القاعدية أن فترة الزراعة لأنتاج أكبر كمية من الأنزيم كانت عند 24 ساعة لكل من العزلات البكتيرية B. subilis .و E. indicum وبعد 24 ساعة أنخفض نشاط الأنزيم ربما يكون ذلك بسبب تمسخ الطبيعة وتحللها ذاتياً(٣٦)

2. تأثير مصادر الكربون والنيتروجين على الأنزيم: يتأثر البروتياز القلوي بمصادر النيتروجين والكربون كونها ثؤثر على أنتاجيته حيث أظهرت النتيجة التي تحتوي على 1% كلوكوز كمصدر للكربون تدعم أنتاج البروتياز القلوي أكثر من المصادر الأخرى(٥٩)

3. تأثير درجة الحرارة على الأنزيم: من المؤثرات المهمه على الأنزيم هي درجة الحرارة حيث أشارة بعض الدراسات أنه يمكن أستخدام نطاق واسع من درجات الحرارة لأنتاج الأنزيم لكن المثلى كانت عند 40 درجه مئويه ومن الضروري ذكر أن درجات الحرارة المثلى تختلف بأختلاف العزلات البكتيرية(٤٥)

4. تأثير الرقم الهيدروجيني PHعلى الأنزيم: بالنسبة للرقم الهيدروجيني PH وجد أن المثلى يكون بين 7 إلى 12 لكن أقصى نشاط يكون عند 9 وبخلاف ذلك قد يفقد الأنزيم نشاطه (٣٩)

5. تأثير أيونات المعادن على الأنزيم: أظهرت بعض الدراسات إلى زيادة ملحوظه بنشاط الأنزيم عند وجود أيونات المعادن التاليه Mg^{+2} Ca^{+2} K^{+2} حيث أزداد نشاط البروتياز القلوي بنسبة 20 إلى 25% بينما وجود Fe^{+3} و Hg^{+2} أدى إلى تثبيط الأنزيم (٥٠)

2.12 نظرة تاريخية :

سنة البحث واسماء الباحثين	الصناعة	الاستخدام
فضيلة (2016)	صناعة الاغذية	في صناعة الخبز يتم استخدام في تحلل البروتين لتصنيع الرقائق المخبوزه والكعك والبسكويت من الدقيق(٤٠)
Thakur,Goyal,Sharma(2018)	صناعة المنظفات	تم استخدامه في الولايات المتحده في صناعه المنظفات حيث تحتوي 25% من المنظفات على الأنزيمات المحلله للبروتينات والببتيدات الموجوده على الملابس(٢٦)
(2017) Wahab, Ahmad	صناعة الجلود	تم استعمال الانزيمات مثل البروتياوز القلوي بدلا من المواد الكيمياوية كونها تعتبر طريقة صديقة للبيئه ومطلبا اساسيا لازاله البروتين غير المرغوب به (٢٨)
Chahali,Gandhi,joda(2017)	المستحضرات الصيدلانية	تم استخدامه البروتياز الناتج من الاحياء الميكروبية لعلاج الامراض مثل القرح الجلدية والسرطان والتليف الكيسي واضطرابات الجهاز الهضمي (٣)
Dasaliva RR(2017)	مستحضرات تجميل	تم استخدامه في تنعيم وتقشير الجلد حيث ترتبط وظيفة البروتياز بتجديد الخلايا وازاله الخلايا الميته (٤)
Romsomsa, Chim-anagae Jangchud(2010)	ازالة صمغ الحرير	تم استعماله في ازاله صمغ الحرير للتخلص من الماده البروتينية مثل السيريسين الذي يشكل غطاء الياف الحرير(٢٠)
Nakiboglu,Toscali,Yasa(2001)	استعاده الفضة	يستخدم الأنزيم المحلل للبروتين مثل البروتياز لتكسير الطبقة المعلقه المكونه من الفضة والتي تحتوي على بروتين الجيلاتين (١٧)
Gupta,Khare(2007)	الصناعات الكيميائية	تم استخدام البروتياز القلوي في الصناعات الكيميائية لانه يتمتع بقدره فريده على انتاج الاسترات والببتيدات في وسط المذيب (٨)
Sharma, Gat,Arya(2019)	ادارة النفايات	في الوقت الحالي فتحت فتره جديده لاستخدام البروتياز في ادارة النفايات في مختلف الانشطه المنزلية والصناعية ذالك لان البروتياز على اذابة النفايات البروتينية (٢٢)

الفصل الثالث

3.1 المواد وطرق العمل

3.2 **النتائج والمناقشة**

3.3 **الاستنتاجات والتوصيات**

3.1.1 عزل البكتريا وإنتاج الانزيم

عُزلت بكتريا B. subtilis من انواع مختلفة من التربة عُلقت عينات التربة في الماء المقطر بواقع 1 غم إلى 9 مل ماء مقطر. عُوملت العزلات بدرجة حرارة 80 مْ لمدة 10 دقائق. بعد ذلك زُرعت العينات على وسط Nutrient agar وتم حضنها بدرجة حرارة 37 مْ لمدة تتراوح من 24 إلى 48 ساعة واعتمادا على حجم الهالة الشفافة اختيرت العزلة التي أعطت اكبر هالة شفافة وتم استخلاص الأنزيم منها .

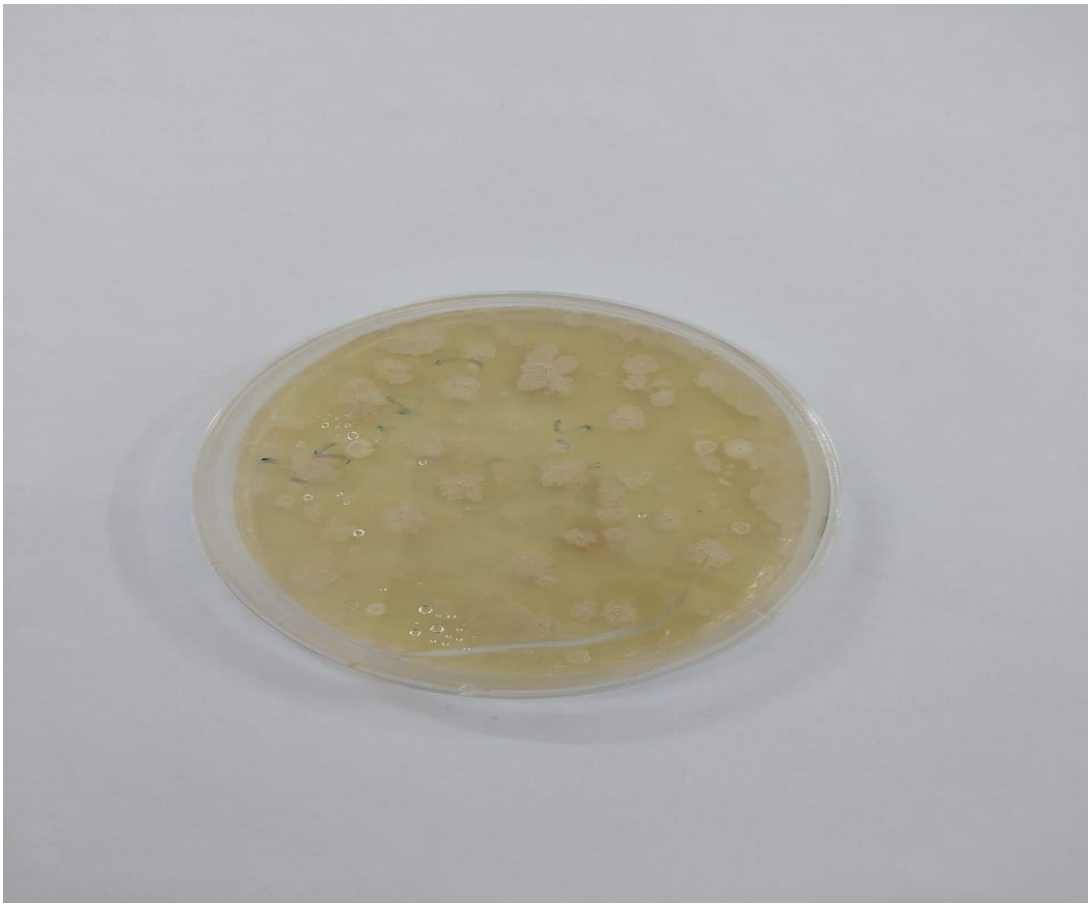
أنتاج الأنزيم:

استخدمت العزلة المحلية B. subtilis لأنتاج أنزيم البروتياز القلوي باستخدام الوسط السائل المتكون من :

Feso4 /0.2g/L
casein 5.5g/L
Znso40.2g/L
KH2Po4 1g/L
Caco3 1g/L
glucose 1%

خلاصه الخميرة 1%

محلول بفْر(TrisHCl) لحفظ محلول الانزيم وفي درجة PH 9 ودرجة حرارة 37 مْ ومدة تخمر 48 ساعة باستخدام الحاضنة الهزازة بسرعة 140(دورة/دقيقة) فُصلت الخلايا البكتيرية بالتثقيل بسرعة rpm10000 لمدة 15 دقيقة ودرجة حرارة 4 مْ. أستخدم المحلول الرائق كمصدر للأنزيم الخام



3.1.2 التجارب العملية للإنزيم :

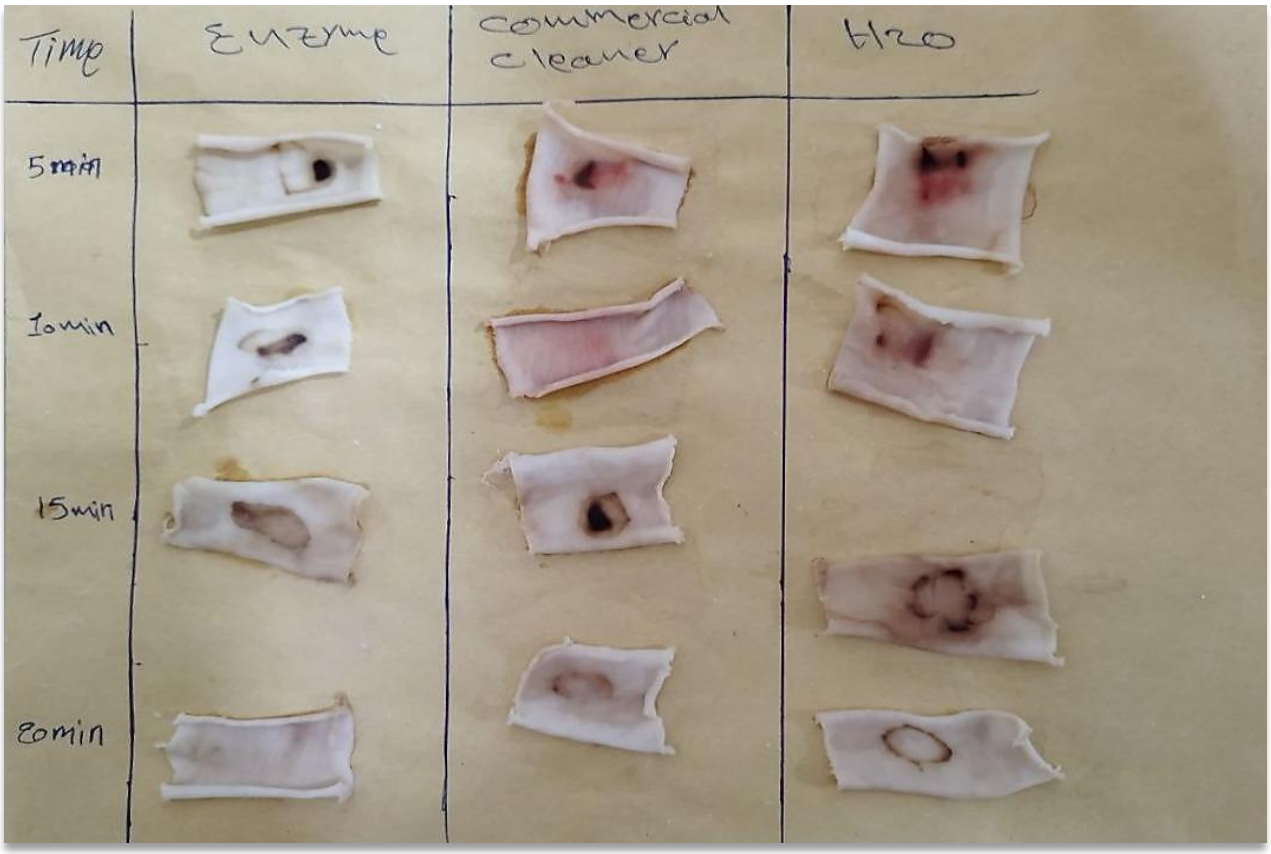
أولا: المنظفات

أ- تم تحديد قدرة الإنزيم على إزالة بقع الدم من خلال إجراء عدة تجارب تم قطع القماش القطني بأبعاد 5 × 5 سم وصبغه بقطرة دم ثم تم تجفيف الملابس الملطخة في الفرن (90 درجة مئوية / 5 دقائق) قبل بدء الاختبارات.

تم إجراء ثلاث مجموعات :
1- 100 مل من الماء المقطر كعنصر تحكم لغرض اختبارها على قطعة قماش الملطخة بالدم
2- 100مل من الماء المقطر مع 2 مل من الأنزيم الخام لغرض اختباره على قطعة القماش الملطخة بالدم
3- 100من الماء المقطر مع 2 مل من المنظف لغرض اختباره على قطعة القماش الملطخة بالدم .
احتوت كل مجموعة من التجارب على عدة أكواب وتم تحضينها جميعها عند درجة حرارة 50 درجة مئوية. أثناء الحضانة، يتم أخذ الملابس كل 5 دقائق وشطفها بالماء العلوي لإزالة الإنزيم أو المنظف. تم تجفيفها في درجة حرارة الغرفة وتصويرها.

ب- تم تلطيخ الأقمشة القطنية البيضاء التي تبلغ أبعادها حوالي 3 × 3 سم² بما يصل إلى 100 ميكرو لتر من البيض والشوكولاتة والكولا. بعد جفاف البقع على قطع القماش عند 60 درجة مئوية لمدة 60 دقيقة، تم غمرها في محلول مجموعة واحده من التجارب كانت المجموعات هي عباره عن 1- محلول منظف 2- محلول انزيمي

ثم تم وضعها في الحاضنة عند درجة حراره 25 مئوية لمده 60 دقيقة وبحلول نهاية فتره الحضانه تم غسلها بماء الصنبور ثم تجفيفها في ظروف المختبر وتم تحديد فعالية إزالة البقع من خلال الفحص البصري لكثافة لون القماش .

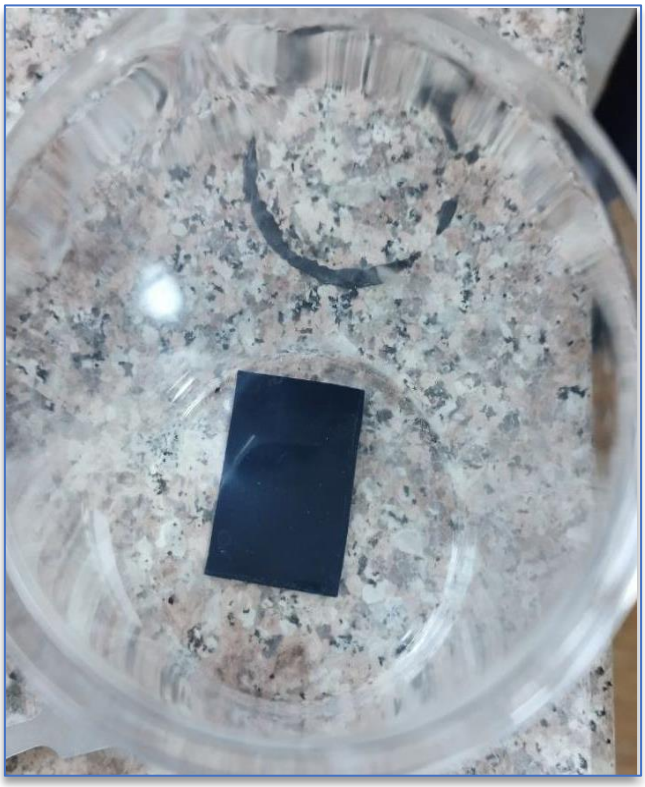


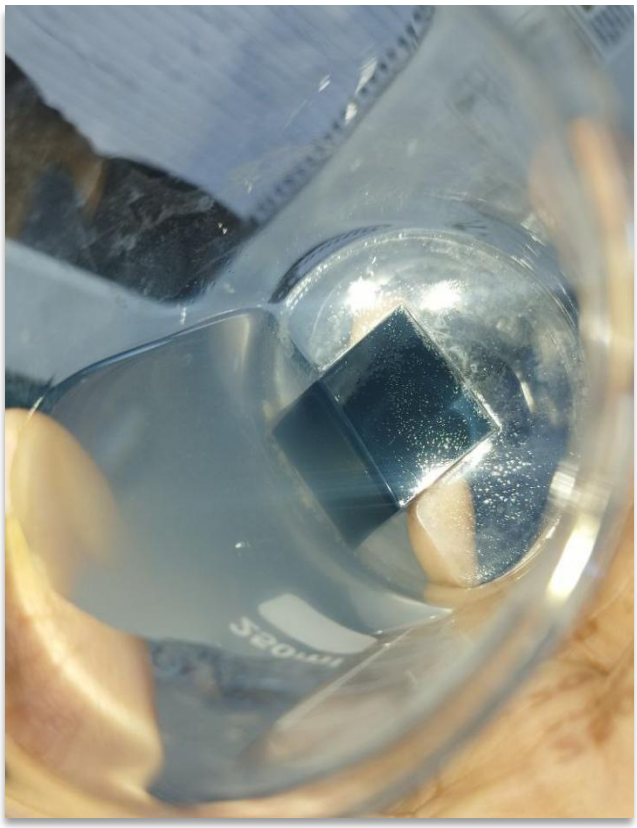
3.1.3 إزالة الشعر :

تم اختيار جلد الماعز وغسله بالماء لإزالة الملح والأوساخ الأخرى ثم تركه يجف لمده تحت اشعة الشمس لمدة لاتزيد عن ثلاث ساعات . تم تقطيعه إلى قطع صغيرة (5 × 5 سم) ومعالجته بالإنزيم المنقى جزئيًا وكبريتيد الصوديوم 7٪ لمدة 24 ساعة تمت معالجة قطع جلد الماعز التي كانت تعتبر عناصر تحكم سلبية فقط بالماء المقطر. تم تعديل الرقم الهيدروجيني الى 9.0 بواسطة محلول منظم عبارة عن(Tris-HCl تم الحضن عند 40 درجة مئوية بعد عملية النقع في المحلول الانزيمي يتم تقييم فعالية إزالة الشعر من خلال فحص الميزات مثل اللون وإزالة الشعر والمظهر العام للجلد .

3.1.4 استرداد الفضة من أفلام الأشعة السينية :

تم غسل أفلام الأشعة السينية المستخدمة بالماء المقطر ومسحها بالقطن وتشريبها بالإيثانول وتقطيعها إلى قطع مقاس 4 × 4 سم بعد تجفيفها في فرن عند درجة حرارة 40 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة تم غمر كل فيلم في سلسلة 100 مل من مستخلص إنزيم المخزون وتم ضبط الرقم الهيدروجيني للمحلول إلى 8.0. تم تقليب المحلول مع الفيلم المغمور عند درجة حرارة 50 درجة مئوية في حمام مائي حتى يتم تجريد طبقة الجيلاتين-الفضة . ثم بعد ذلك تم فحصها بالمجهر الإلكتروني.

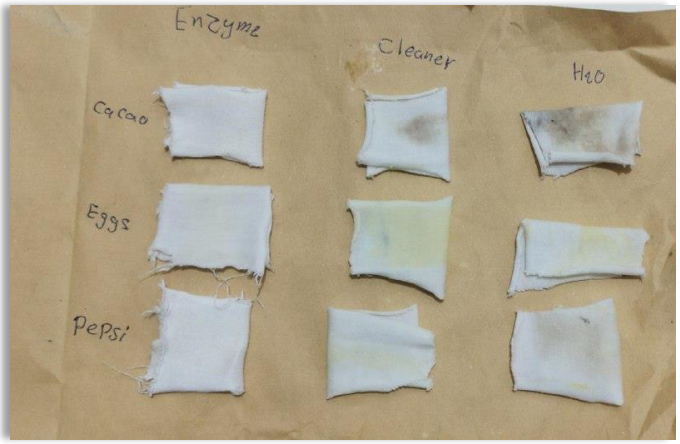


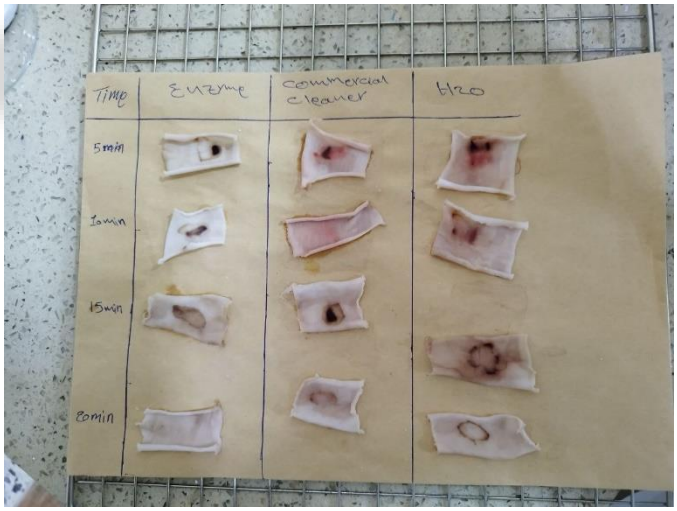


3.2 النتائج والمناقشة :

1- فعالية الأنزيم في أزاله البقع

أظهر الأنزيم المعزول من البكتريا نتائج ممتازة في أزاله البقع البروتينية حيث يعمل البروتياز القلوي على تحلل البروتينات إلى ببتيدات وأحماض أمينية. أن تطبيق البروتياز القلوي كإضافات حيوية للمنظفات لتحل محل إضافات الفوسفات يجعلها صديقة للبيئة وأكثر فعالية من حيث التكلفة.(٦٤)



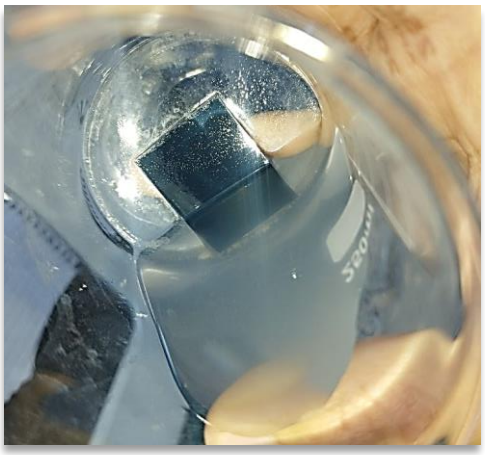


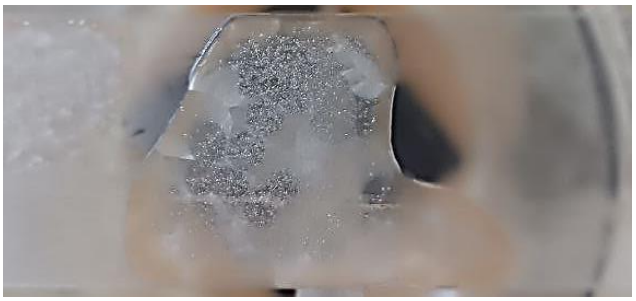
2- فعالية أزالة الشعر:

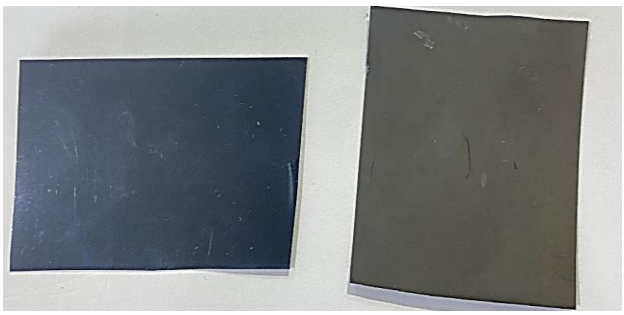
في مرحلة إزالة الشعر تتعرض جلود الحيوانات للعديد من المواد الكيميائية مثل كبريتيد الصوديوم والتي تتسرب مع الفضلات السائلة إلى المسطحات المائية مما يؤدي إلى تلوث البيئة وآثار ضارة على الكائنات الحية(٦٦) ولهذا السبب هناك اهتمام متزايد باستخدام البروتياز القلوي الذي يعمل على أزالة الشعر بالكامل حيث تم اختبار فعاليته على عدة قطع من جلد الماعز وأظهر نتائج ممتازة خلال فترة حضانة مدتها 24 ساعة .

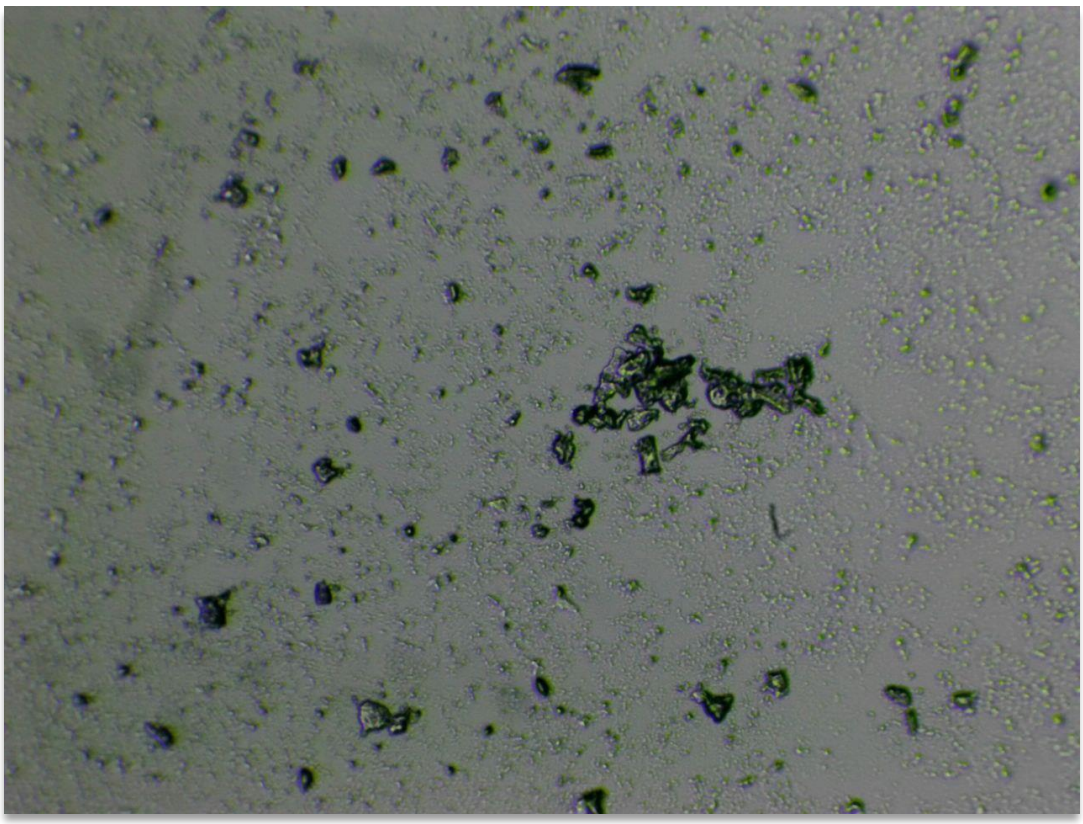
3- فعالية أسترداد الفضة:

نجح البروتياز القلوي بتحلل طبقة الجلاتين على جانبي فلم الأشعة السينية بعد فترة حضانة من 18-24 ساعة وبدرجة حموضة PH=9 حيث تم أسترداد الفضة ورؤيتها بوضوح من خلال المجهر الألكتروني. أن أرتفاع الطلب على الفضة في العالم وخاصة في تطبيق المجالات الطبية يجعل من الصعب الحصول على الفضة وتصنيعها ولذلك تم الأهتمام مؤخراً بصناعة أسترداد الفضة من أفلام الأشعة السينية حيث أصبحت هذه الأفلام تساهم في حوالي 20% من صناعة الفضة على مستوى العالم تتضمن الطريقة العادية لأسترداد الفضة بحرق الأفلام وهذا يسبب تلوث للهواء ورائحة كريهة بينما يعد أستخدام البروتياز القلوي في التحلل المائي لأفلام الأشعة السينية بديلاً واعداً لأستعادة الفضة (٦٥).









3.3.1 الاستنتاجات :

تتمتع البروتيازات القلوية التي تنتجها سلالات بكتيرية بقيمة تجارية كبيرة بسبب تنوعها البيوكيميائية الكبير وثباتها وتطبيقاتها المتنوعة في مجالات مختلفة بما في ذلك الغذاء والدواء والمنظفات واستخلاص الفضة ومعالجة النفايات. هذه الخصائص تجعل البروتياز القلوي هو المرشح الأفضل والملائم للتطبيقات الصناعية التي تستخدم درجات حرارة أعلى مع أوقات تفاعل أقصر ومخاطر منخفضة للتلوث. وبتعبير أدق، فإن تحملها للأس الهيدروجيني القلوي يجعل هذه العزلات أكثر أهمية للعمل كمحفزات حيوية وجعلها أكثر فائدة للقطاع الصناعي المحلي.
لخصت نتائج هذه الدراسة إلى أن إنزيم البروتياز الذي تم إنتاجه بواسطة بكتيرياB.subtilis المعزولة محليا له قدره واسعه للاستعمالات الصناعية كما
أظهر البحث الحالي أن الإنزيمات التي تنتجها بكتيريا B.subtilis صالحة للاستغلال التجاري كعامل لإزالة الشعر في الصناعات الجلدية وصناعة المنظفات واسترداد الفضة من أفلام الأشعة السينية. ويمكن استكشافه بشكل أكبر لتطبيقات أخرى أيضًا في العديد من الصناعات.

3.3.2 التوصيات :

1- **تحضير ودراسة بروتياز القلوي من البكتريا وتطبيقة في الصناعات .**
2- **استخدام الأوساط الطبيعية لتنمية البكتريا كونها اقل تكلفة اقتصاديا .**
3- **استغلال البروتياز القلوي الذي تنتجه بكتريا B.subtilis في الصناعات الأخرى مثل صناعة الأغذية والصناعات الدوائية.**
4- **استعمال الطرق الكيميائية الخضراء (اللإنزيمية)في صناعة المنظفات وإزالة الشعر واسترداد الفضة للحد من التلوث البيئي.**

المصادر :

1. **. Agrawal R, Singh R, Verma A, Panwar P, Verma AK. Partial purification and characterization of alkaline protease from Bacillus sp. isolated from soil. World J Agri Sci 2012;8:129–133.**
2. **. Bhat, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol. Adv. 2000, 18, 355–383. [CrossRef]**
3. **. Chanalia P, Gandhi D, Jodha D et al (2011) Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. Rev Med Microbiol 22(4):96–101**
4. **. Da Silva RR (2017) Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. Appl Biochem Biotechnol 183(1):1–19**
5. **. Deng A, Wu J, Zhang Y, Zhang G, Wen T. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from Bacillus sp. B001. Bioresour Technol 2010;101: 7100–7106.**
6. **. Elavarasan, K.; Shamasundar, B.A. Effect of oven drying and freeze drying on the antioxidant and functional properties of protein hydrosylates derived from freshwater fish (Cirrhinus mrigala) using papain enzyme. J. Food Sci. Technol. 2016, 53, 1303–1311. [CrossRef] [PubMed**
7. **. Giménez, M.I.; Studdert, C.A.; Sánchez, J.J.; de Castro, R.E. Extracellular protease of Natrialba magadii: Purification and biochemical characterization, Extremophiles. Microbe 2000, 4, 181–188. [CrossRef] 21**
8. **. Gupta A, Khare S (2007) Enhanced production and charac- terization of a solvent stable protease from solvent tolerant Pseudomonas aeruginosa PseA. Enzyme Microbial Technol 42(1):11–16**
9. **. Ibrahim, A.S.S.; Al-Salamah, A.A.; El-Badawi, Y.B.; El-Tayeb, M.A. Detergent-, solvent- and salt-compatible thermoactive alkaline serine protease from halotolerant alkaliphilic Bacillus sp. NPST-AK15: Purification and characterization. Extremophiles 2015, 19, 961–971. [CrossRef] 8**
10. **.. Kumar C. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic Bacillus pumilus. Lett Appl Microbiol 2002;34:13–17.**
11. **.. Kumar R.S., Ananthan G. and Prabhu A.S., Optimization of medium composition for alkaline protease production by Marinobacter sp. GA CAS9 using response surface methodology- A statistical approach, Biocatal. Agric. Biotechnol., 3(2), 191–197 (2014)**
12. **.. Kumar, C.G.; Takagi, H. Microbial alkaline proteases: From a bio industrial viewpoint. Biotechnol. Adv. 1999, 17, 561–594. [CrossRef]**
13. **.. Li S, He B, Bai Z, Ouyang P. A novel organic solvent-stable alkaline protease from organic solvent–tolerant Bacillus licheniformis YP1A. J Mol Catal B: Enzym 2009;56:85–88.**
14. **.. Li, S.; Yang, X.; Yang, S.; Zhu, M.; Wang, X. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. Comput. Struct. Biotechnol. J. 2012, 2, e201209017. [CrossRef] [PubMed]**
15. **.. Madhavan, A.; Sindhu, R.; Binod, P.; Sukumaran, R.K.; Pandey, A. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. Bioresour. Technol. 2017, 245, 1304–1313. [CrossRef] [PubMed]**

16.. Marouf, H.M. Effect of Pregabalin Premedication on Emergence Agitation in Children after Sevoflurane Anesthesia: A Randomized Controlled Study. Anesth. Essays Res. 2018, 12, 31–35. [CrossRef] [PubMed]

17.. Nakiboglu N, Toscali D, Yasa I (2001) Silver recovery from waste photographic flms by using enzymatic method. Turk J Chem 25(3):349–353

18.. Naveed, M.; Nadeem, F.; Mehmood, T.; Bilal, M.; Zahid, A.; Fazeha, A. Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. Catal. Lett. 2021, 151, 307–323. [CrossRef

19.. Rao K, Narasu ML. Alkaline protease from Bacillus firmus 7728. Afr J Biotechnol 2017;6:2493–2496.

20.. Romsomsa N, Chim-anagae P, Jangchud A (2010) Optimization of silk degumming protease production from Bacillus subtilis C4 using Plackett-Burman design and response surface methodol- ogy. Sci Asia 36:118–124

21.. Shankar, S.; Rao, M.; Laxman, R.S. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of Beauveria sp. Process Biochem. 2011, 46, 579–585. [CrossRef]

22.. Sharma M, Gat Y, Arya S et al (2019) A review on micro- bial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. Indus Biotech 15(2):69–78

23.. Shine K, Kanimozhi K, Panneerselvam A, Muthukumar C, Thajuddin N. Production and optimization of alkaline protease by Bacillus cereus RS3 isolated from desert soil. Int J Adv Res Biol Sci 2016;3:193–202.

24.. Studdert, C.A.; Seitz, M.K.H.; Gil, M.I.P.; Sanchez, J.J.; de Castro, R.E. Purification and biochemical characterization of the haloalkaliphilic archaeon Natronococcus occultus extracellular serine protease. J. Basic Microbiol. 2001, 41, 375–383. [CrossRef]

25.. Sun, H.; Zhang, H.; Ang, E.L.; Zhao, H. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. Bioorgan. Med. Chem. 2017, 26, 1275–1284. [CrossRef] [PubMed]

26.. Thakur N, Goyal M, Sharma S et al (2018) Proteases: industrial applications and approaches used in strain improvement. Biol Forum J 10(1):158–167

27.. Turk B., Targeting proteases: successes, failures and future prospects, Nat Rev Drug Discov., 5(9), 785–799 (2006)

28.. Wahab WAA, Ahmed SA (2017) Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain Aspergillus niger WA. Int J Biol Macromol 115:447–458

29.. Yossana S, Reungsangb A, Yasudac M. Purification and characterization of alkaline protease from Bacillus megaterium isolated from Thai fish sauce fermentation process. Sci Asia 2006;32:377–383.

30.. Zhang, B.; Weng, Y.; Xu, H.; Mao, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. Appl. Microbial. Biotechnol. 2012, 93, 61–67. [CrossRef] [PubMed]

1009.1000178.

31. Ahmad, R., & Sardar, M. (2015). Enzyme immobilization: an overview on alimentos de Fennema (4ª ed.). Porto Alegre: Artmed.

Amylase from an Extremophile-Bacillus sp. FW2 and Its Possibility in Food Waste Degradation. Fermentation 2022, 8, 12. [CrossRef]

32.Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Sahu, S. K., & Balasubramanian, T. (2014). Purification and characterization of solvent stable, alkaline protease from Bacillus firmus CAS 7 by microbial conversion of marine wastes and molecular mechanism underlying solvent stability. Process Biochemistry, 49(6), 1012–1019.
33.Arora, D. K.. Handbook of Fungal Biotechnology. Boca Raton: CRC press. (2003). 287–297.
Biochemistry, 4(2), e1000178. http://dx.doi.org/10.4172/2161-
34.Bommarius, A.S.; Paye, M.F. Stabilizing biocatalysts. Chem. Soc. Rev. 2013, 42, 6534–6565. [CrossRef] [PubMed]
35.Bretz SL, Linenberger KJ (2012) Development of the enzyme-substrate interactions concept inventory. BMBEd 40:229–233
Characterization of Strong Simultaneous Enzyme Production of Protease and α-
36.Chu, I.-M., Lee, C., Li, T.-S., 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of Bacillus subtilis ATCC 14416. Enzym. Microb. Technol. 14 (9), 755e761.
37. Chutmanop Jarun, Sinsupha Chuichulcherm, Yusuf Chisti and Penjit Srinophakun, Protease production by Aspergillus oryzae in solid-state fermentation using agro-industrial substrates, J. Chem. Technol. Biotechnol., 83(7), 1012-1018 (2008)
38.DiCosimo, R.; McAuliffe, J.; Poulose, A.J.; Bohlmann, G. Industrial use of immobilized enzymes. Chem. Soc. Rev. 2013, 42, 6437–6474. [CrossRef] [PubMed]
39.El Hadj-Ali, N., Agrebi, R., Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun, S., Nasri, M., 2007. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated Bacillus licheniformis NH1. Enzym. Microb. Technol. 40 (4), 515e523.
40. Fazilat A (2016) Production, isolation, purifcation and partial characterization of an extracellular acid protease from Aspergil- lus niger. Int J Adv Res Biol Sci 3(3):32–38
41.Fennema, O. R., Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2010). Química de
42.Fox, P. F. (1982). Proteolysis in milk and dairy products. Biochem. Soc. Trans. 10, 282–284. doi: 10.1042/bst0100282
43.Gouda, M.K., 2006. Optimization and purification of alkaline proteases produced by marine Bacillus sp. MIG newly isolated from Eastern Harbour of Alexandria. Pol. J. Microbiol. 55 (2), 119e126.
44.Hadush, M.; Andualem, B.; Kebede, A.; Gopalakrishnan, V.K.; Chaithanya, K.K. Isolation of Protease Producing Bacteria (Bacillus spp.) From Soil and Water Samples of Gondar Town. Ethiopia. Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. 2017, 8, 211–222.
45.Iqbal, A., Hakim, A., Hossain, M.S., Rahman, M.R., Islam, K., Azim, M.F., Ahmed, J., Assaduzzaman, M., Hoq, M.M., Azad, A.K., 2018. Partial purification and characterization of serine protease produced through fermentation of organic municipal solid wastes by Serratia marcescens A3 and Pseudomonas putida A2. J. Genet. Eng. Biotechnol. 16 (2018), 29e37.
46. Kapoor, S.; Rafiq, A.; Sharma, S. Protein engineering and its applications in food industry. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2017, 57, 2321–2329. [CrossRef] [PubMed]

nanoparticles as immobilization matrix. Biochemistry and Analytical

47. **Nehra, K. S., Dhillon, S., Chaudhary, K., and Singh, R. (2002). Production of alkaline protease by aspergillus sp. under submerged and solid substrate fermentation. Indian J. Microbiol. 42, 43–47.**
48. **Pham, V.H.T.; Kim, J.; Shim, J.; Chang, S.; Chung, W. Purification Characterization of Strong Simultaneous Enzyme Production of Protease and α-Amylase from an Extremophile-Bacillus sp. FW2 and Its Possibility in Food Waste Degradation. Fermentation 2022, 8, 12. [CrossRef**
49. **Rahman, R.N.Z.A., Geok, L.P., Basri, M., Salleh, A.B., 2005. Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by Pseudomonas aer- uginosa strain K. Bioresour. Technol. 96 (4), 429e436.**
50. **Rajkumar, R., Kothilmozhian, J., Ramasamy, R., 2011. Production and character- ization of a novel protease from Bacillus sp. RRM1 under solid state fermentation. J. Microbiol. Biotechnol. 21 (6), 627e636.**
51. **Rani, M. R., Prasad, N. N., and Sambasivarao, K. R. (2012). Optimization of cultural conditions for the production of alkaline protease from a mutant aspergillus Flavus AS2. Asian J. Exp. Biol. Sci. 3, 565–576.**
52. **Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 597–635. doi: 10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998**
53. **Raval, V.H.; Pillai, S.; Rawal, C.M.; Signgh, S.P. Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. Process Biochem. 2014, 49, 955–962. [CrossRef]**
54. **Roy, I.; Prasad, S. Converting Enzymes into Tools of Industrial Importance. Recent Pat. Biotechnol. 2017, 12, 33–56.**
55. **Sen, S., Veeranki, V.D., Mandal, B., 2009. Effect of physical parameters, carbon and nitrogen sources on the production of alkaline protease from a newly isolated Bacillus pseudofirmus SVB1. Ann. Microbiol. 59 (3), 531e538.**
56. **Sharma, K.M., Kumar, R., Panwar, S., Kumar, A., 2017. Microbial alkaline prote- ases: optimization of production parameters and their properties. J. Genet. Eng. Biotechnol.**
57. **Sharma, N. (2019). A review on fungal alkaline protease. J. Emerg. Technol. Innov. Res. 6, 261–273. doi: 10.1729/Journal.22354**
58. **Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2018 N. S. Punekar, ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms**
59. **Vijayaraghavan, P., Vijayan, A., Arun, A., Jenisha, J.K., Vincent, S.G.P., 2012. Cow dung: a potential biomass substrate for the production of detergent-stable de- hairing protease by alkaliphilic Bacillus subtilis strain VV. SpringerPlus 1 (1), 76. eCollection 2012.**
60. **Wahab, W.A.A.; Ahmed, S.A. Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt, and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain Aspergillus niger WA. Int. J. Biol. Macromol. 2017, 115, 447–458. [CrossRef] [PubMed]**
61. **Walsh K.A. and Wilcox P.E., Methods in Enzymology, GE Perlmann L Lorand, Eds., Academic Press, New York (1970)**
62. **2022 تفاعل بين الاحياء الدقيقة للدكتور عبد الله بن مساعد بن خلف الفالح**

63.2015 كيمياء الانزيمات للدكتور جاسم محمد جندل الطبعه الاولى
.64 Zhang, H.; Li, H.; Liu, H.; Lang, D.A.; Xu, H.; Zhu, H. The application of a halotolerant metalloprotease from marine bacterium Vibrio sp LA-05 in liquid detergent formulations. Int. Biodeterior. Biodegrad
65. Masui, A.; Yasuda, M.; Fujiwara, N.; Ishikawa, H. Enzymatic hydrolysis of gelatin layers on used lith film using thermostable alkaline protease for recovery of silver and PET film. Biotechnol. Prog. 2004, 20, 1267–1269
66. Sivasubramanian, S.; Murali Manohar, B.; Rajaram, A.; Puvanakrishnan, R. Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease. Chemosphere 2008, 70, 1015–1024.
67. Tan, S.J. Isolation and Characterization of Enzyme Protease from Pumpkin and .Its Affinity to Different Protein Substrates
Final. Year Proj. UTAR 2016. Available online
68. Godswill, A.C.; Somtochukwu, I.V. Industrial waste management: Brief survey and advice to cottage, small and medium scale

.industries in Uganda. Int. J. Adv. Acad. Res. 2017, 3, 26–43

69. Jegannathan, K.R.; Nielsen, P.H. Environmental assessment of enzyme uses in industrial production—A literature reviews.
J. Clean. Prod. 2013, 42, 228–240. [CrossRef]

70. Raveendran, S.; Parameswaran, B.; Beevi Ummalyma, S.; Abraham, A.; Kuruvilla Mathew, A.; Madhavan, A.; Pandey, A.
Applications of microbial enzymes in food industry. Food Technol. Biotechnol. 2018, 56, 16–30. [CrossRef] [PubMed]

71. Nassar, F.R.; Abdelhafez, A.A.; El-Tayeb, T.S.; Abu-Hussein, S.H. Purification, Characterization and Applications of Proteases
Produced by Bacillus amyloliquefaciens 35s Isolated from Soil of the Nile Delta of Egypt. Microbiol. Res. J. Int. 2015, 6, 286–302.
[CrossRef]

72. Oda, K. New families of carboxyl peptidases: Serine carboxyl peptidases and glutamic peptidases. J. Bio. Chem. 2012, 151, 13–25.
[CrossRef