

عنوان البحث

لمحة عامة عن بروتين الاسبارتك من التصنيف الى التوصيف

صادق فنجان حسناوي<sup>1,2</sup>، زينة كاظم اليونس<sup>1</sup>، علاء جبار عبد المنهل<sup>1</sup>

<sup>1</sup> قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة، البصرة 61004، العراق.

<sup>2</sup> قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة ميسان، ميسان 62004، العراق.

بريد الكتروني: pgsagr.sadeq.hasnawi@uobasrah.edu.iq ; zena.issa@uobasrah.edu.iq ; alaa.abd@uobasrah.edu.iq

HNSJ, 2024, 5(4); <https://doi.org/10.53796/hnsj54/3>

تاريخ القبول: 2024/03/08م

تاريخ النشر: 2024/04/01م

المستخلص

يتزايد الطلب على الإنزيمات في القطاعات الصناعية بسرعة بسبب مزاياها الاقتصادية والبيئية ، أذ تنتج الكائنات الحية الدقيقة أنواعًا مختلفة من الإنزيمات ومن بين هذه الإنزيمات هي إنزيمات البروتيازات المنتجة من مصادر ميكروبية نتيجة لأنخفاض التكلفة وارتفاع معدل الإنتاج والتي اكتسبت اهتمامًا خاصًا في القطاعات الصناعية ، في هذه المراجعة قمنا بتلخيص المعلومات حول تصنيف البروتيازات اعتمادًا على الأحماض الأمينية الموجودة في الموقع الفعال او على اساس متطلباتها المعدنية أذ قسمت البروتيازات الى اربع مجاميع وهي بروتيازات الاسبارتك aspartic والسيرين serine والسستين cystein والثريونين threonine ، كما قسمت البروتيازات حسب الرقم الهيدروجيني الى ثلاثة اقسام هي البروتيازات الحامضية والقاعدية والمتعادلة ، وكذلك تحديد أهم مصادر انتاج البروتيازات ودراسة تركيب والية عمل بروتين الاسبارتك والعوامل المؤثرة في انتاج البروتيازات من الفطريات وتنقية وتوصيف بروتين الاسبارتك.

الكلمات المفتاحية: بروتين الاسبارتك، البروتيازات الحامضية درجة الحموضة، ودرجة الحرارة، المادة الخاضعة

## RESEARCH TITLE

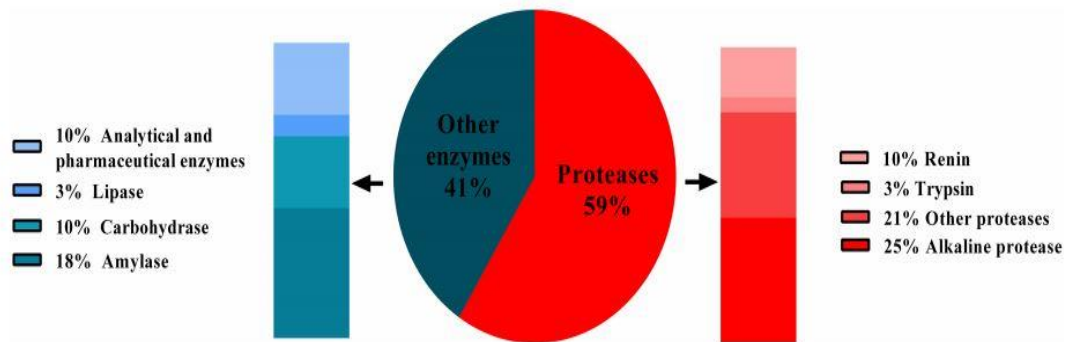
**AN OVERVIEW OF ASPARTIC PROTEASE FROM  
CLASSIFICATION TO CHARACTERIZATION****Sadeq Fenjan Hasnawi<sup>1,2</sup>, Zena Kadhim AL-Younis<sup>1</sup>, Alaa Jabbar  
Abd Al-Manhel <sup>1</sup>**<sup>1</sup>Department of Food Science, College of Agriculture, University of Basrah, Basrah 61004, Iraq;<sup>2</sup>Department of Animal Production, College of Agriculture, University of Misan, Misan 62004, Iraq[pgsagr.sadeq.hasnawi@uobasrah.edu.iq](mailto:pgsagr.sadeq.hasnawi@uobasrah.edu.iq) ; [zena.issa@uobasrah.edu.iq](mailto:zena.issa@uobasrah.edu.iq) ; [alaa.abd@uobasrah.edu.iq](mailto:alaa.abd@uobasrah.edu.iq)HNSJ, 2024, 5(4); <https://doi.org/10.53796/hnsj54/3>**Published at 01/04/2024****Accepted at 08/03/2024****Abstract**

The demand for enzymes in industrial sectors is increasing rapidly due to their economic and environmental advantages , Microorganisms produce different types of enzymes, and among these enzymes are protease enzymes produced from microbial sources as a result of the low cost and high production rate, which have gained special interest in the industrial sectors ,In this review, we summarized the information about the classification of proteases based on the amino acids present in the active site or on the basis of their mineral requirements. The proteases were divided into four groups, which are aspartic proteases, serine, cysteine, and threonine. Proteases were also divided according to pH into three sections: proteases. Acidic, basic and neutral , As well as identifying the most important sources of protease production, studying the structure and mechanism of action of aspartic protease, the factors affecting the production of protease from fungi, and purifying and characterizing aspartic protease.

## المقدمة

تعد الإنزيمات محفزات حيوية تشارك تقريباً في جميع التفاعلات البيولوجية داخل الأنظمة الحية ، والتي استعملت في صناعة البيرة ، الخل و الجبن منذ عصور ما قبل التاريخ ، وأنتجت الإنزيمات من سلالات مختارة من الكائنات الحية الدقيقة على نطاق واسع واستعملت طرق متطور في تنقيتها (Sharma, 2019) . وهذا أسهم بشكل كبير في تصحيح العمليات الصناعية وحدث ثورة في تطوير التكنولوجيا الحيوية نظراً لكفاءتها وفعاليتها كمحفزات عند اقل تركيز (Gimenes *et al.*, 2021).

استعملت العديد من الإنزيمات في الصناعات المختلفة مثل اللايبيز ، والبروتيز ، والأميليز ، والسليوليز ، والزليلز وغيرها ، ومع ذلك ، تبقى انزيمات البروتيز هي النوع السائد لأنها ذات قيمة كبيرة من خلال تطبيقاتها الواسعة في مختلف المجالات منها منتجات الألبان والأغذية والورق والمنظفات ، إذ تشكل البروتيزات حوالي 60 % من إجمالي المبيعات للإنزيمات التجارية في كل عام (Pawar *et al.*, 2023) وكما مبين في الشكل (1)، إذ بلغ السوق العالمي للبروتيزات في عام 2019 ما يقارب 2.76 مليار دولار أمريكي ، ومن المتوقع أن يزداد خلال الفترة من 2019-2024 بمعدل نمو سنوي قدره 6.1% (Choudhary *et al.*, 2022) .



الشكل (1) المبيعات السنوية للإنزيمات (Pawar *et al.*, 2023)

ان البروتيزات او ما تسمى بببتيدات التحلل المائي، هي انزيمات لها القدرة على كسر الروابط الببتيدية في البروتينات (Koistinen *et al.*, 2023) . وهي تلعب دور مهم في العديد من العمليات البيولوجية (Couture, 2023) ، بما في ذلك الهضم (Kalaiselvan *et al.*, 2023) ، تخثر الدم (Dasari *et al.*, 2023) ، الاستجابة المناعية (Dudani *et al.*, 2018) ، وتشارك أيضا في تنظيم نمو الخلايا فضلاً عن العديد من الوظائف المهمة للكائنات الحية (Erekat, 2022; Zhang *et al.*, 2023). توجد هذه الانزيمات في جميع الكائنات الحية ، مثل الحيوانات، النباتات، البكتريا والفطريات (Naveed *et al.*, 2021) . تعمل البروتيزات على الاصرة الببتيدية الموجودة في البروتينات وتطلها مائياً Proteolysis enzyme الى بببتيدات واحماض امينية، وبصورة عامه فانها اما ان تكون بروتيزات حامضية اوقاعدية اومتعادلة، كما تعتبر البروتيزات الحامضية من اهم البروتيزات المستعملة في التصنيع الغذائي (Patil *et al.*, 2012; Al-Manhel., 2017) . لذا فان الهدف من هذه الدراسة هو معرفة تصنيف ومصادر البروتيزات كذلك دراسة تركيب والية عمل بروتيز الاسبارتك لندرة الدراسات التي تناولت هذا الانزيم بشكل مفصل على الرغم من اهميته وتطبيقاته الواسعة فضلا عن توفير فهم أفضل للعوامل المختلفة المؤثرة في انتاج البروتيزات بشكل عام من الفطريات .

### تصنيف البروتيزات Classification of protease

وفقاً للجنة التسمية التابعة للاتحاد الدولي للكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) ، تم تصنيف البروتيزات ضمن المجموعة الثالثة المتمثلة بأنزيمات التحلل المائي hydrolases ، كما قسمت البروتيزات تبعا لفعالها التخصصي بحيث تكون اما داخلية Endopeptidases او خارجية Exopeptidases (Pawar *et al.*, 2023) .

**Exopeptidases** الببتايديزات الخارجية

تعمل الببتايديزات الخارجية بالقرب من النهايات الطرفية في السلسلة الببتيدية بناءً على موقع عملها والتي تقوم بتحليل جزيئة البروتين من خلال تكسير الأواصر الببتيدية الطرفية محررة بالتعاقب الأحماض الأمينية الحرة إلى وسط التفاعل، تقسم الببتايديزات الخارجية الى نوعين اعتماداً على موقع عملها في السلسلة الببتيدية الأولى تسمى الببتايديزات الأمينية Amino Peptidase والتي تعمل على النهاية الطرفية N في السلسلة الببتيدية، اما الثانية تدعى الببتايديزات الكاربوكسيلية Carboxyl Peptidase والتي تعمل على النهاية الطرفية C في السلسلة الببتيدية (Mienda *et al.*, 2014).

**Endopeptidases** الببتايديزات الداخلية

تعمل الببتايديزات الداخلية على الاواصر الببتيدية في المواقع الداخلية من السلسلة الببتيدية بعيداً عن النهايات الطرفية N و C (Mienda *et al.*, 2014) والتي عندها يسمى الانزيم (proteinase)، هذا النوع من البروتيازات (EC 3.4.11-24) يقسم الى اربع مجاميع وهي بروتيازات الاسبارتك aspartic والسيرين serine والسستين cystein والثريونين threonine اعتماداً على الاحماض الامينية الموجودة في الموقع الفعال او على اساس متطلباتها المعدنية (Mamo and Assefa., 2018 , Rawlings and Salvesen., 2013).

**1- بروتيازات الاسبارتك (EC 3.4.23) Aspartic protease**

ينتمي بروتينز الاسبارتك الى مجموعة من البروتيازات التي تعتمد على النشاط التحفيزي لوحديتين من حامض الاسبارتك (Gurumallesh *et al.*, 2019). ويطلق على هذا النوع من البروتيازات بالبروتيازات الحامضية Acid Proteases او البروتيازات الكاربوكسيلية Carboxylic Proteases (Majid, 2017) والتي تعمل في وسط حامضي على تحليل الاصرة الببتيدية التي تربط بين الاحماض الامينية، اذ تحتوي هذه الأنزيمات على حامض الاسبارتيك والتايروسين في موقعها الفعال ويكون الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها (3-5) والوزن الجزيئي يتراوح بين (30 - 45) كيلودالتون ودرجة الحرارة المثلى (40-55) م° (Mamo and Assefa, 2018 ; Gimenes *et al.*, 2021) ، واستعملت البروتيازات الحامضية في ازالة العكارة من البيرة وعصير الفاكهة وايضاً في تطرية اللحوم وكذلك في معالجة حالات عسر الهضم ، تتواجد في الحيوانات والنباتات والفطريات والفايروسات ، غالباً ما تنتج خارج الخلية عن طريق الانواع الفطرية مثل *Aspergillus niger* ، *Aspergillus oryzae* ، *Aspergillus awamori* ، *Aspergillus fumigates* ، *Aspergillus saitoi* ونادراً ما توجد في البكتريا والابتدائيات (Wei *et al.*, 2023)، وهي غير حساسة لمثبطات الأنزيمات الأخرى، الا انها تثبط تماماً عند وجود مادة الببستاتين pepstatin (Mamo *et al.*, 2020).

**2- البروتيازات المعدنية (EC 3.4.24) Metallo protease**

تتطلب هذه المجموعة من الإنزيمات أيون فلز ثنائي التكافؤ لعملها ، مثل الزنك أو الكوبالت أو المنغنيز لذلك تسمى بالبروتيازات الفلزية، وهي بهذا تكون حساسة للعوامل المخلبية مثل Ethylene diamine tetra ( EDTA ) acetic acid والتي تعمل على ازالة الايون المعدني من الانزيم مما يؤدي الى تثبيطه (Singh *et al.*, 2016) ، تحتوي هذه الأنزيمات على الحامض الاميني فينيل الأنين أو ليوسين في موقعها الفعال ويكون الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها (5-7) والوزن الجزيئي يتراوح بين (19-37) كيلودالتون ودرجة الحرارة المثلى (65-85) م° (Mamo and Assefa, 2018) ، ومن انزيمات هذه المجموعة هو انزيم Thermolysin المنتج من بكتريا *Bacillus thermoprotolyticus* والذي يحتوي على ايون الزنك  $Zn^{+2}$  في موقعه الفعال (Razzaq *et al.*, 2019).

**3- بروتيازات السيرين (EC 3.4.21) Serein protease**

تحتوي هذه الأنزيمات على الحامض الاميني (السيرين أو الهستيدين أو الأسبارتك) في الموقع الفعال (Majid, 2017) وتثبط عند وجود مركب EDTA و triamino acetic acid وهي بروتيازات قاعدية يكون رقمها الهيدروجيني

الأمثل لفعاليتها بين (6-11) اما الوزن الجزيئي له فيتراوح من ( 18 - 35 ) كيلودالتون ودرجة الحرارة المثلى لعملها بين (50-70) م ( Mamo and Assefa, 2018 ) ، تعد بروتيازات السيرين من اهم البروتيازات التي تم فصلها وتنقيتها من الاجزاء النباتية المختلفة (Majid, 2017) ، في حين ان البكتريا هي الاكثر شيوعاً في انتاج هذا النوع من البروتيازات مقارنة مع الاحياء المجهرية الاخرى ومن أهم الاجناس البكتيرية السائدة هي *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter photobacterium* , *Vibrio* , *halobacillus* , *Bacillus* , *Microbulbifer* , and *shewanella*. تعود بعضها الى الانواع *Bacillus sp. CEMB10370* , *Vibrio etschnikovii* ، *Bacillus* sp. CEMB10370 ، *Bacillus* sp. CEMB10370 ، *Vibrio etschnikovii* ، *Bacillus alcalophilus* LW8 ، *Pseudomonas* sp. *Aspergillus tamari* ( Banerjee & Ray, 2017 ) .

#### 4- بروتيازات السستين (Cysteine protease) ( EC 3.4.22 )

تحتوي هذه الأنزيمات على الحامض الاميني السستين والهستدين في الموقع الفعال ( Mamo and Assefa, 2018 ) وتسمى أيضا بروتيازات الثايول Thiol او بروتيازات السلفهايدريل Sulfhydryl وهي حساسة لمركبات السلفهيدريل (sulfhydryl reagent) مثل *iodoacetamide* و *iodoacetic acid* و TLCK والفلزات الثقيلة، وتنشط بالعوامل المختزلة كالمواد المخلبية والسستائين وسيانيد البوتاسيوم (chelating agent) مثل EDTA (Majid, 2017)، وتكون هذه الانزيمات نشطة عند درجة الحموضة المتعادلة وتقع الفعالية المثلى لمعظم هذه الأنزيمات ضمن مدى من الأرقام الهيدروجينية التي تتراوح بين (5-8) ووزنها الجزيئي (34-35) كيلودالتون ودرجة الحرارة المثلى (40-55) م ( Mamo and Assefa, 2018 )، انتجت من بعض الاجناس البكتيرية مثل *Bacillus spp.* (Razzaq et al.,2019)، كما وجدت هذه الانزيمات في مجموعة من النباتات تحت اسم الباباين Papain والبروملين bromelain والكيومباباين Chymopapain والفيسين ficin والكاريكين Caricain أيضا في الفيروسات والطفيليات والحشرات (Majid, 2017). وبصورة عامة يبين جدول (1) خواص وصفات بروتيازات الاسبارتك والسستين والمعدنية والسيرين .

جدول (1) خواص انواع البروتيازات الاربعة من مصادر مختلفة

( Mamo and Assefa, 2018 ; Gurumalles et al.;2019 ;Majid.,2017 )

| البروتياز                        | EC     | الوزن الجزيئي KDa | pH الامثل | درجة الحرارة المثلى | الحامض الاميني الفعال            | المتبط                      | مصدر البروتياز   |
|----------------------------------|--------|-------------------|-----------|---------------------|----------------------------------|-----------------------------|--|
| بروتياز السيرين                  | 3.4.21 | 35-18             | 11-6      | 70-50               | السيرين او الهستدين او الاسبارتك | EDTA , triamino acetic acid | <i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , Animal tissue (gut), <i>Tritirachium album</i> (thermostable)   |
| بروتياز السستين او الثايول       | 3.4.22 | 35-34             | 8-5       | 55-40               | السستين والهستدين                | Iodoacetamide, p-CMB        | <i>Aspergillus</i> , stem of pineapple ( <i>Ananas comosus</i> ), latex of fig tree ( <i>Ficus</i> sp), papaya ( <i>Carica papaya</i> ), <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i> |
| بروتياز الاسبارتك او الكاربوكسيل | 3.4.23 | 45-30             | 5-2       | 55-40               | الاسبارتك ، الاسبارتك            | Pepstatin                   | <i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Endothia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Pencillium</i> , <i>Neurospora</i> , animal tissue (stomach)  |
| البروتياز المعدني                | 3.4.24 | 37-19             | 7-5       | 85-65               | فينيل النين او ليوسين            | EDTA and EGTA               | <i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pencillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i>  |

## التصنيف حسب الرقم الهيدروجيني

قسمت البروتيازات حسب الرقم الهيدروجيني الى ثلاثة اقسام هي: (Solanki et al., 2021 , Gimenes et al., 2021) :  
:al.,2021)

## 1- البروتيازات الحامضية Acid proteases :

وتشمل البروتيازات المنتجة من الحيوانات مثل الرنين renin و الببسين pepsin ، والبروتيازات المنتجة من النباتات مثل البابين papain والبروملين bromelain والفيسين ficin ، تعمل هذه البروتيازات عند رقم هيدروجيني ( 3 - 5.6 ) (Machado et al., 2016; Razzaq et al., 2019) . تُعد الفطريات المصدر الرئيسي لأنتاج البروتياز الحامضي ، وان الاجناس الاكثر شيوعاً في انتاجه هي *Aspergillus* و *Penicillium* و *Endothia* و *Mucor* (Mammo and Assefa, 2018). هناك العديد من الابحاث التي أكدت على اهمية انتاج البروتيازات الحامضية بواسطة الاعفان (Mandujano-González et al. 2016) . اذ انتج (da Silva et al. (2016) بروتينز الاسبارتك من عفن *Rhizomucor miehei* ، والذي يمكن أن يكون بمثابة إنزيم بديل لأنزيم تخثر الحليب أثناء إنتاج الجبن، كما لاحظ Souza et al. (2017) عند توصيف البروتياز الحامضي المنتج من عفن *Aspergillus foetidus* ان الرقم الهيدروجيني الامثل لنشاط البروتياز (5) عند درجة حرارة مثلى (55) م .

## 2- البروتيازات المتعادلة Neutral proteases :

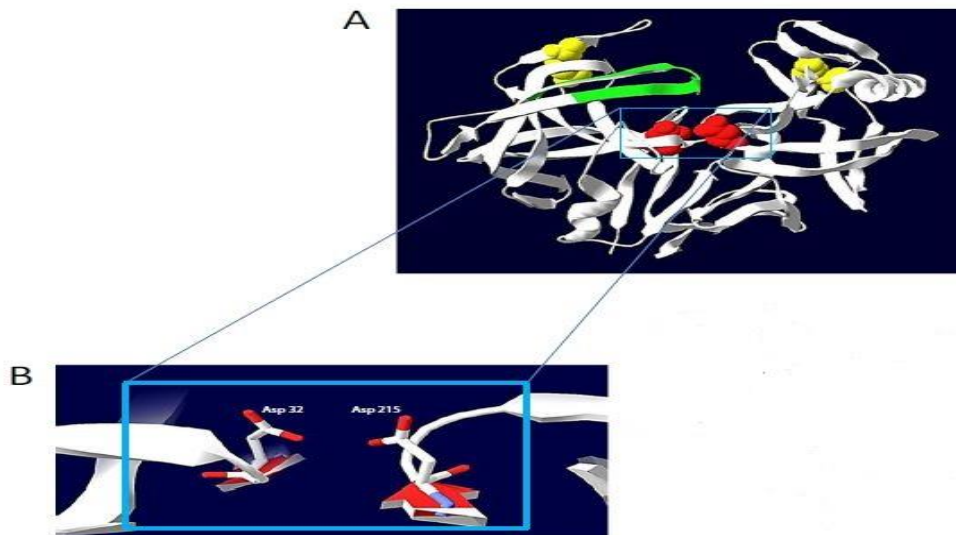
وهي البروتيازات المنتجة من البكتريا والفطريات والتي تعمل عند رقم هيدروجيني (7) ، وتشمل البروتيازات المعدنية التي تتطلب اثناء نشاطها وجود ايون موجب الشحنة ثنائي التكافؤ (Contesini et al. 2017; Razzaq et al. 2019) . استعملت البروتيازات المتعادلة لأغراض مختلفة منها صناعة الخبز والاجبان والادوية والمنظفات وغيرها (Razzaq et al. 2019) . وقد عمل (Ao et al. (2018) على انتاج وتوصيف البروتياز المتعادل من عفن *Aspergillus oryzae* Y1 المعزول من الفاصوليا العريضة المخمرة ، اذ لاحظ امتلاكه وزن جزيئي (45) كيلودالتون ورقم هيدروجيني (7) ودرجة حرارة مثلى (55) م . كما اشار (De Oliveira et al. (2020) عند إنتاج البروتياز المتعادل من عفن *Moorella speciosa* ان الرقم الهيدروجيني الامثل لعمل الانزيم هو (7) .

## 2- البروتيازات القاعدية Alkaline proteases :

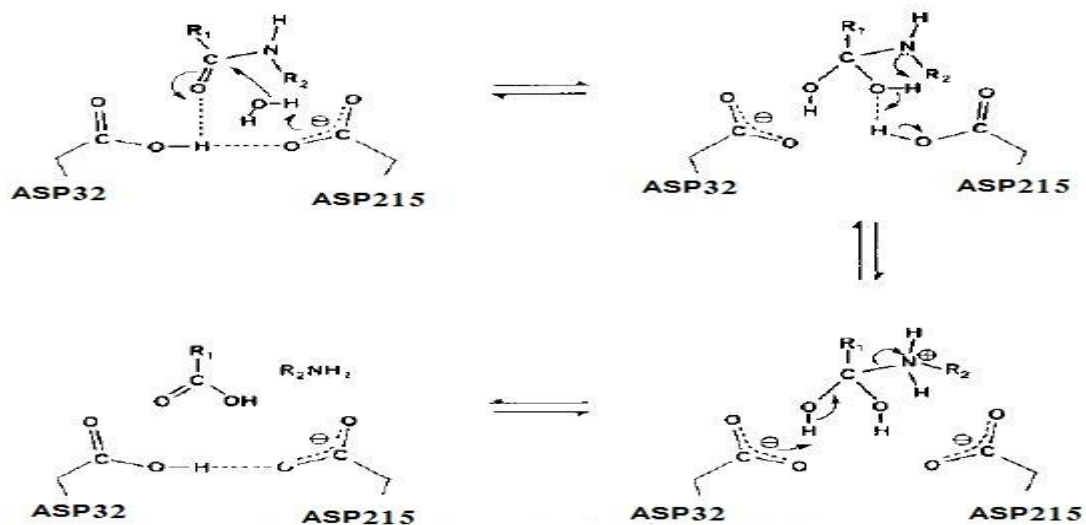
تنتج هذه البروتيازات من الحيوانات والنباتات والبكتريا والفطريات والتي تعمل عند رقم هيدروجيني (8 - 12) ومن أهم انواع البروتيازات القاعدية هي subtilisin و Carlsberg ، subtilisin و التي أنتجت من بكتريا *Bacillus* (Contesini et al. 2017) . إذ إن البروتيازات القاعدية المنتجة من جنس *B. subtilis* والمستخدمه للأغراض التجارية تعد آمنة (Zhang et al. 2017) . هناك العديد من الأبحاث التي تناولت إنتاج البروتيازات القاعدية من جنس *Bacillus* ، إذ قام (Mothe and Sultanpuram (2016) بتتقية وتوصيف البروتياز القاعدي المنتج من بكتريا *B. caseinilyticus* . على الرغم من أن البروتياز القاعدي المنتج من جنس *Bacillus* هو الأكثر انتشاراً واستخداماً، إلا أن هناك الكثير من الابحاث التي اشارت الى امكانية انتاج البروتياز القاعدي من انواع اخرى من الاحياء المجهرية مثل بكتريا *Streptomyces* sp. (Solanki et al., 2021) . والفطريات (Sharma ., 2019)، اذ انتج (da Silva et al. (2018) البروتيازات القاعدية من عفن *Aspergillus tamaris URM4634* وكان افضل نشاط للبروتياز عند رقم هيدروجيني (8) .

## تركيب وألية عمل انزيم بروتينز الاسبارتك

التركيب الاولي لأنزيم البروتياز المنتج من خميرة *Candida tropicalis* يتكون من 320-340 حامض اميني ، والموقع الفعال في انزيم البروتياز يحتوي على وحدتين من حامض الاسبارتك احدهما تقع في الموقع 215 والآخر يقع في الموقع 32 ، اما التركيب الثانوي له فيتكون من شق عميق يحتوي على خمسة خيوط ( $\beta$ - sheet) محاطة بستة من التراكيب الحلزونية ( $\alpha$  - helices) كما مبين في الشكل (2) (Theron.,2014) .



الشكل (2) تركيب انزيم البروتيز المنتج من خميرة *Candida tropicalis* (Theron,2014) يُعد بروتين الاسبارتك من البروتيازات التي لها القدرة على كسر الروابط الببتيدية في البروتينات وتحللها مائياً الى ببتيدات واحماض امينية (Couture, 2023). اقترح عدد من الآليات المختلفة لعمل الانزيمات وهي التحفيز الحامضي \_ القاعدي Acid – base catalysis ، التحفيز التساهمي Covalent catalysis ، التحفيز الايوني المعدني Metal ion catalysis ، التحفيز الالكتروستاتيكي Electrostatic catalysis ، الأ إن الطريقة الأكثر قبولاً على نطاق واسع لألية عمل بروتيز الاسبارتك هي آلية تحفيز القاعدة والحامض Acid–base catalysis إذ يتضمن التحفيز الحامضي قيام حامض الاسبارتك الموجود في الموقع الفعال بمنح البروتون للمادة الخاضعة ، اما في التحفيز القاعدي يعمل حامض الاسبارتك الموجود في الموقع الفعال باستقبال البروتون من المادة الخاضعة وكما موضح في الشكل (3) ، إذ إن الموقع الفعال في الإنزيم يحتوي على وحدتين من حامض الاسبارتك احدهما يقع في الموقع 32 من السلسلة الببتيدية الذي يعمل على منح البروتون للمادة الخاضعة ، بينما الاخر يقع في الموقع 215 من السلسلة الببتيدية، والذي يعمل على سحب البروتون من الماء وتكوين النيوكوفيل السالب الشحنة (OH<sup>-</sup>) مما يؤدي الى مهاجمة المادة الخاضعة وبالتالي كسر الرابطة بين النروجين والكربون وتكون الببتيد الاول ، اما حامض الاسبارتك الثاني الذي يقع في الموقع 32 من السلسلة الببتيدية يعمل على سحب البروتون من مجموعة الكربونيل للجزء الاخر من المادة الخاضعة، وبذلك ينتج الببتيد الثاني للمادة الخاضعة (Brik and Wong , 2003 , Coates *et al*,2008 , Wangsell ,2006) .



الشكل (3) الآلية المقترحة لعمل انزيم بروتيز الاسبارتك ( Coates *et al*,2008)

## مصادر انتاج البروتيز Sources of protease production

تلعب البروتيزات دوراً مهماً في كل الكائنات الحية لذلك فهي توجد في مدى واسع من المصادر مثل الحيوانية والنباتية والميكروبية (Naveed *et al.*, 2021).

### 1- المصادر الحيوانية

تعد انزيمات التريسين Trypsin ، الكيموتريسين Chemotrypsin ، الرنين Renein والببسين Pepsin من اكثر البروتيزات الحيوانية شيوعاً واستعمالاً في مجالات مختلفة ، إذ يعد التريسين الانزيم الهضمي المعوي المسؤول عن التحلل المائي لبروتينات الغذاء (Singh *et al.*, 2016). اما انزيم الرنين المستخلص من المعدة الرابعة للعجول الرضيعة فقد استعمل في صناعة الاجبان المختلفة (Gimenes *et al.*, 2021). في حين استبدل انزيم الكيموتريسين المستخلص من منطقة البنكرياس في التطبيقات التشخيصية والتحليلية ، اما انزيم الببسين الذي يوجد في معدة جميع انواع الفقريات تقريباً فإنه ادخل في صناعة المنظفات (N Jisha *et al.*, 2013). ولقد لاحظ (Dadshahi *et al.*, 2016) عند استخلاص وتنقية البروتيزات من الروبيان بانها ثابتة تجاه الحرارة العالية وتعمل عند الرقم الهيدروجيني (7-9) .

### 2- المصادر النباتية

استعملت البروتيزات النباتية على نطاق واسع في التطبيقات المختلفة مثل تطرية اللحوم وتخرن الحليب والهضم ولعلاج بعض الأمراض الفيروسية والسرطانية (Singh *et al.*, 2016). تعد انزيمات البروميلين والباباين من أبرز الإنزيمات النباتية المحللة للبروتينات ، وهما من عائلة الأناناس *Bromeliaceae* و *Carica papaya* على التوالي ، ومن اهم مصادر انتاج انزيم البروميلين هي سيقان الأناناس ولحاءه وأوراقه ، اما مصادر انتاج انزيم الباباين فهي نبات البابايا (Gimenes *et al.*, 2021) . ومن البروتيزات المهمة ايضاً هي انزيمات الكيراتينيز Keratinase، التي استعملت في تحلل بروتينات الشعر والصوف وأنتاج الأحماض الأمينية الأساسية ، اكتسبت البروتيزات النباتية اهتماماً متزايداً ، على الرغم من أن عملية إنتاج البروتيز من النباتات تستغرق وقتاً طويلاً أو قد تكون مكلفة من الناحية الاقتصادية (Singh *et al.*, 2016). لاحظ (Sun *et al.*, 2016) عند تقييم ما يقارب من تسعين مصدراً نباتياً؛ إن أعلى الإنزيمات المحللة للبروتين موجودة في الأناناس والتين والبابايا .

### 3- المصادر الميكروبية

تعد الكائنات الحية الدقيقة من المصادر المهمة لأنتاج البروتيزات لما تتميز به من مزايا تتمثل في سرعة الانتاج ومساحة نموها المحدودة وبالتالي قلة التكاليف فضلاً عن سهولة التلاعب الجيني في تركيبها الوراثي وعدم تأثرها بالظروف المناخية (Bhatia *et al.* 2021 ; Putatunda *et al.* 2019). أما من الناحية التجارية ، فأن البروتيزات البكتيرية والفطرية قد حظيت بالكثير من الاهتمام (Gurumallesha *et al.*; 2019) ، إذ تشكل البروتيزات الميكروبية ثلثي إجمالي البروتيزات المستعملة في الصناعات المختلفة ، ومن اهم هذه البروتيزات هي البروتيز القاعدي البكتيري والبروتيز الحامضي الفطري ، إذ تم عزل الكائنات الحية الدقيقة المنتجة للبروتيز من مجموعة متنوعة من البيئات مثل الجذور والتربة مثل تربة المسالخ والصرف الصحي والمخلفات الصناعية والزراعية وما إلى ذلك (Jadhav *et al.* 2020; Hakim *et al.* 2018; Ash *et al.* 2018; Prajapati *et al.* 2017).

تستعمل البروتيزات الميكروبية في مدى واسع من التطبيقات المختلفة ، وتنتج بطرق مختلفة اعتماداً على نوع الكائن الحي المجهرى المستعمل ولعل أفضل الطرق هي استعمال تقنية تخمرات الحالة الصلبة (Usman *et al.*, 2021) وذلك لأنها عادة ما تكون أنزيماتها خارجية اي تفرز خارج خلايا الأحياء المجهرية (Mamo *etal.*, 2020) ، ولسهولة تنمية هذه الاحياء والتعامل معها وامكانية السيطرة على ظروف الانتاج وقصر مدته كذلك امكانية تسخير الامكانيات



المحلية لإنتاجه بأقل التكاليف من خلال الاستفادة من المخلفات الزراعية والصناعية كالنخالة والكسبة وقشور الرز وغيرها (Novelli *et al.*, 2016).

تعد الفطريات من الكائنات المجهرية التي تميزت في إنتاجها للبروتيازات الحامضية (Yin *et al.*, 2020; Patil *et al.*, 2012) مقارنة مع الاحياء المجهرية الاخرى ولها خواص مشابهة للانزيمات الحيوانية ، والتي بدورها تقسم الى نوعين ,الاول هي البروتيازات الشبيهة بالببسين Pepsin like acid protease والتي تميز عن *Aspergillus* (aspergillopepsin, EC 3.4.23.18) و *Penicillium* و *Rhizopus* ( rhizopuspepsin, EC 3.4.23.21 ) في إنتاجها (Souza *et al.*, 2017) اما النوع الثاني هي البروتيازات الشبيهة بانزيم الرنين Rennin like acid protease والتي انتجت من قبل عنف *Mucor* و *Rhizomucor* ( mucorpepsin, EC 3.4.23.23) و *Endothia parasitica* (endothiapepsin, EC 3.4.23.22) (Aljmmas *et al.*, 2018; Daudi *et al.*, 2015;) تعد البروتيازات الحامضية او ما يسمى ببروتيازات الاسبارتك aspartic proteases ( EC 3.4.23) والتي تميزت الاعفان في إنتاجها (Mamo *et al.*, 2020) الأكثر استعمالاً في الصناعات الغذائية كصناعة الاجبان وتطريه اللحوم وتحضير المتحللات البروتينية وترويق العصائر وتكون فعاليتها القصوى وثباتيتها عندما يكون الرقم الهيدروجيني (2-5) الا انها تعمل عندا رقم هيدروجيني (6) (Mamo and Assefa, 2018; Sun *et al.*, 2018; Purushothaman *et al.*, 2019; Yujie *et al.*, 2019).

#### العوامل المؤثرة في إنتاج البروتيازات الحامضية ( الاسبارتك) من الفطريات

تلعب الظروف المثلى دوراً مهماً في إنتاج الإنزيمات إذ يشكل الوسط الزراعي 30% من الكلفة الكلية لعملية التخمير وبالتالي فهو يعتبر عاملاً مهماً في نمو الاحياء المجهرية المنتجة للإنزيمات (dos *et al.*, 2018). ان التغيرات في درجة الحموضة، ودرجة الحرارة، والمادة الخاضعة ، ومحتوى الماء، وحجم اللقاح، وما إلى ذلك لها تأثير كبير على الأنشطة الأيضية للكائنات الحية الدقيقة، وتختلف هذه المعايير بشكل كبير من نوع إلى آخر، ولذلك فإن معرفة الظروف المثلى لنمو الفطريات لإنتاج معظم الإنزيمات يعد أمراً ضرورياً (Othman *et al.*, 2023). إذ ان حاجة الكائنات الحية لمصادر الكربون والنيتروجين تختلف من كائن حي إلى آخر، أو حتى بين نفس الأنواع المعزولة من مصادر مختلفة (Hamza *et al.*, 2023). الوسط الزراعي يجب ان يحتوي على مصدر كاربوني ومصدر نيتروجيني ، فالمصدر الكاربوني يعتبر محفزاً لإنتاج الإنزيمات اومثبطاً لها وهذا يعتمد على نوع المصدر الكاربوني وتركيزه في الوسط ، وكذلك نوع الكائن المجهرى المستخدم للإنتاج ، كما ان المصدر النيتروجيني يزود الوسط الزراعي اما بالأملح اللاعضوية التي قد تكون مثبّطاً لإنتاج الانزيم عند اضافتها للوسط مثل كلوريد الامونيوم NH<sub>4</sub>Cl، او تجهز الوسط الزراعي بالمصادر العضوية التي تحفز نمو الكائن المجهرى مثل البروتين والاحماض الامينية وغيرها، وبالتالي فإنها تلعب دوراً كبيراً في تخليق الإنزيمات، هناك بعض الاملاح تضاف الى الوسط الزراعي بتركيز معينة والتي تكون مصدراً للمعادن النادرة فضلاً عن الكبريت والفسفات والكالسيوم مثل (CaCl<sub>2</sub>) للمحافظة على درجة الحموضة وبالتالي تحافظ على ثباتيه الانزيم (Aunstrup *et al.*, 1979). اشار (Othman *et al.*, 2023) في دراسته لأنتاج انزيم البروتيز الحامضي من عزلة *Aspergillus niger* بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة ، الى ان إضافة مصادر الكربون والنيتروجين إلى الوسط الصلب أدت إلى زيادة إنتاج الإنزيمات وتوليفها، كأستعمال الكازين كمصدر للنيتروجين والفركتوز كمصدر للكربون. كما لاحظ (Bano *et al.*, 2016) ارتفاع معدل إنتاج انزيم البروتيز عند تنمية فطر *Pleurotus eryngii* في وسط معدني يحتوي على 0.5% سكروز و1% كازين . ان الاختلاف في نسبة محلول الترطيب المستخدمة في تخمرات الحالة الصلبة يؤثر بشكل كبير على نمو وايض الاحياء المجهرية مما يؤثر سلباً ويجاباً على إنتاجيتها لأنزيم

بروتيز الاسبارتك (Bensmail *et al.*, 2015) ، اذ ان انخفاض وارتفاع نسبة محلول الترطيب يسبب قلة المغذيات وبالتالي يوفر بيئة غير ملائمة لنمو ونشاط الاحياء المجهرية اذ ان رطوبة المادة الصلبة يجب ان لا تقل عن 12 - 15 % والتي تعد الحد الأدنى لتوقف الفعاليات الحيوية للأحياء المجهرية (Luti *et al.*, 2014). وأشار Othman *et al.* (2023) في دراسته لإنتاج انزيم البروتيز الحامضي من عزلة *Aspergillus niger* بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة ، الى ان افضل نسبة لمحلول الترطيب في انتاج الانزيم هي 1:0.75 .

كذلك تُعد الأنشطة الأيضية للكائنات الحية الدقيقة حساسة للغاية لتغيرات الرقم الهيدروجيني، كونه يؤثر على العديد من العمليات الأنزيمية ونقل العناصر الغذائية المختلفة عبر غشاء الخلية مما يضمن نمو وإنتاج المنتجات الأيضية ، تؤدي هذه الأنشطة حتمًا إلى تحول أيضي في توازن أيونات الهيدروجين وبالتالي الرقم الهيدروجيني للوسط الزراعي ( Othman *et al.* 2023) ، وان التباين في قيم الرقم الهيدروجيني يؤثر على ذائبية المغذيات وجاهزيتها في الوسط الزراعي وهذا ينعكس سلباً وإيجاباً على سير العمليات الأيضية وبالتالي تخليق وإنتاج الانزيم (Whitaker , 1972) .

اوضح (Bensmail *et al.* 2015) بأن اقصى إنتاج لإنزيم البروتيز بواسطة عفن *A. niger* FFB1 كان عند رقم هيدروجيني 4 ، في حين انخفضت الانتاجية عند جميع قيم الرقم الهيدروجيني الأعلى من 4 ، في المقابل ذكر (Chahrazad *et al.* 2021) ان درجة الحموضة المثلى لإنتاج انزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus niger* كان عند (pH=3) ، وأشارت النتائج إلى أن السلالة المختارة كان لها أيضًا نشاط تحلل بروتيني عند درجة حموضة محايدة، لكنه كان أقل أهمية، وقد يقترح أن السلالة أنتجت على الأقل اثنان من البروتيز، أحدهما حامضي بدرجة حموضة مثالية 3 والآخر قلوي عند درجة حموضة 7 . كما بين (Mamo *et al.* 2020) ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج انزيم البروتيز الحامضي من عزلة *Aspergillus oryzae* DRDFS13 هو (pH =5) . وكذلك تُعد درجة الحرارة من العوامل الأساسية المؤثرة بشكل كبير على معدلات نمو وإنتاج الاحياء المجهرية اذ تختلف درجات الحرارة حسب نوع الكائن المجهرى المستخدم (Banerjee *et al.*, 2017) ، كما تؤثر على معظم التفاعلات الأيضية للأحياء المجهرية بالأخص النشاطات الأنزيمية في الخلية من خلال تأثيرها على الصفات الفيزيائية للغشاء الخلوي، إذ بين (Othman *et al.* 2023) ان الحد الأقصى لإنتاج انزيم البروتيز الحامضي من عفن *Aspergillus niger* كان عند درجة حرارة 35 م° الا ان الارتفاع عن هذه الدرجة يؤدي الى الانخفاض في انتاجية الانزيم حتى يفقد فعاليته عند 45 م° بسبب إطلاق الحرارة الأيضية التي تسبب تجفيف الوسط الزراعي وبالتالي انخفاض النشاط المائي الذي يؤدي الى انخفاض توافر العناصر الغذائية، مما يقيد التهوية ويقلل من نمو وإنتاج الاحياء المجهرية أو قد يكون ناتج عن دنثرة البروتينات وتثبيط الإنزيم وانخفاض نمو الفطريات . كما لاحظ كلاً من (Khademi *et al.* 2013) و (Foda *et al.* 2012) أن إنتاج البروتيز من *A. niger* باستخدام تخمرات الحالة الصلبة يحدث بشكل أفضل عند درجة الحرارة (30) م°، أشار (Chimbekujwo *et al.* 2020) إن درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus brasiliensis* BCW2 عن طريق استعمال تخمرات الحالة الصلبة هي 30 م°، ايضاً يختلف حجم اللقاح المستعمل باختلاف نوع وسلالة الكائن المجهرى فضلاً عن طبيعة عملية التخمر، اذ يعد وسيلة لقياس نمو الكائنات الحية الدقيقة وأمرًا حيويًا لتحقيق أقصى كمية من الناتج المرغوب ، كما أن انخفاض حجم اللقاح المضاف قد لا يكون كافيًا لبدء نمو الاحياء المجهرية أو أنه يستغرق وقتًا طويلاً لنمو وتكاثر الاحياء المجهرية ، من ناحية أخرى ، بالمقابل يؤدي ارتفاع حجم اللقاح إلى تقييد حركة الاحياء المجهرية مع تثبيط نموها وتقليل إنتاجية التخمر (Othman *et al.* 2023). اذ استعمل (Chimbekujwo *et al.* 2020) 1 مل من حجم اللقاح لإنتاج انزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus brasiliensis* ، كما ذكر (Bensmail *et al.* 2015) أن حجم اللقاح الأمثل لإنتاج انزيم البروتيز من عفن

*Aspergillus niger* كان  $10^6 \times 1$  بوغ / مل . كما ان هناك ارتباطاً وثيقاً ما بين إنتاج الإنزيمات الميكروبية ومدة التحضين وهذا يعود لوجود علاقة ما بين انتاج الانزيمات ونمو الخلايا ، إذ تُعد مدة الحضانة من العوامل المهمة التي تؤثر على نمو وانتاج الأحياء المجهرية ، وفترة التحضين المثلى لنمو الكائن المجهرى لإنتاج الإنزيمات تتأثر بعدة عوامل منها مكونات الوسط الزراعي ونوع الكائن المجهرى (Park *et al.* 1979). إذ تختلف فترة التحضين للحصول على أقصى إنتاجية للإنزيم بين الأنواع المختلفة أو حتى في نفس الأنواع المعزولة من مصادر مختلفة ، فقد اشار (Chimbekujwo *et al.* 2020) ان فترة التحضين المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus brasiliensis* BCW2 هي عند 72 ساعة ، كما ذكر (Usman *et al.* 2021) إن أفضل مدة حضانة لإنتاج إنزيم البروتيز الحامضي من الفطريات الخيطية كانت 120 ساعة .

### تنقية الإنزيم

وهي سلسلة متتابعة من الخطوات التي يمكن بها فصل الإنزيم عن بقية المواد والبروتينات الأخرى الموجودة في المستخلص الخام والتي يمكن من خلالها ان تزداد الفعالية النوعية للإنزيم ، ولقد استخدمت عدة طرق لتنقية الإنزيم (Banerjee *et al.*, 2020) ، ومنها الترسيب بواسطة الاملاح مثل كبريتات الامونيوم والتي تعتمد على اساس معادلة الشحنات على سطح البروتين ، إذ تم اختيارها بسبب الذوبانية العالية لها في الماء حيث يزداد تركيز الملح في كل مرحلة لكي يتم ترسيب البروتينات الأخرى والتي يتم التخلص منها فيما بعد ، وبعد ذلك يذاب الإنزيم باستخدام داريء معين او بالماء المقطر عن طريق النضح الغشائي بواسطة استخدام اكياس الدليزة ، ويمكن ترسيب الإنزيمات ايضاً عن طريق استخدام المذيبات العضوية مثل الاسيتون والكحول الايثيلي من خلال خفض نقطة التعادل الكهربائي مما يؤدي الى زيادة قوة الجذب بين جزيئات البروتين وبالتالي ترسيبه (Fairouz *et al.*, 2021)، والقسم الآخر من طرق التنقية والتي تعتمد على اساس الوزن الجزيئي مثل طريقة النضح الغشائي Dialysis وطريقة الترشيح الفائق Ultra Filtration وطريقة الترشيح الهلامي Gel filtration . والبعض الآخر منها يعتمد على مبدأ الشحنات مثل طريقة الترحيل الكهربائي Electrophoresis وطريقة كروماتوغرافيا التبادل الايوني Ion-exchange chromatography (Kamal *et al.* 2017). قام (Mamo *et al.* 2020) بتنقية إنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 تحت تخمرات الحالة الصلبة بواسطة تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني (IEC) باستعمال عمود DEAE Sepharose fast flow بفعالية انزيمية (477.11) وحدة / مل وفعالية نوعية (183.50) وحدة / ملغم بعدد مرات تنقية 6.20 وبحصيلة انزيمية 9.2% . كما تمكن (Hsiao *et al.* 2014) بتنقية إنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Rhizopus oryzae* بواسطة تقنية AKTA Purifier 10 على عمود Q Sepharose بعدد مرات تنقية 22 وبحصيلة انزيمية 90.6% ومن ثم استخدم عمود Phenyl Sepharose بعدد مرات تنقية 3.4 وبحصيلة انزيمية 58.8% .

### توصيف إنزيم البروتيز

#### 1- الوزن الجزيئي

تختلف البروتينات في اوزانها الجزيئية نتيجة لأختلاف المصادر المستخلصة منها ، اذ تستعمل عدة طرق لتحديد الاوزان الجزيئية مثل الترشيح الهلامي Gel-Filtration والترحيل الكهربائي Electrophoresis بوجود المادة الماسخة SDS والنبد الفائق السرعة Ultracentrifuge ، ويعد الترحيل الكهربائي والترشيح الهلامي هي من اكثر الطرق المستخدمة لقياس الوزن الجزيئي (Devi and Hemalatha, 2014).

أشار (Wei *et al.* 2023) الى ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus*

*niger* هو 50 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis وبأستعمال SDS – PAGE . لاحظ (Ao et al., 2018) ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتين الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* Y1 هو 45 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis . لاحظ (Chimbekujwo et al., 2020) ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتين الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus brasiliensis* BCW2 هو 68 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis وبوجود المادة الماسخة SDS – PAGE . لاحظ (Tarek et al., 2023) ان الوزن الجزيئي للبروتين المستخلص من بكتريا *Bacillus siamensis* CSB55 هو 25 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis . اشار (Karray et al., 2021) الى ان الوزن الجزيئي للبروتين المنتج من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* هو 28 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis . كما لاحظ (Devi and Hemalatha, 2014) ان الوزن الجزيئي للبروتين المستخلص من بذور نبات البطيخ هو 54 كيلودالتون بأستعمال طريقة الترشيح الهلامي Gel- Filtration وباستخدام عمود Sephadex G-200 . وأوضح (Al-Soufi, 2013) الى ان الوزن الجزيئي للبروتين المستخلص من اوراق نبات الخس الشوكي *Lactuca serriola* L. هو 31000 دالتون بأستعمال طريقة الترشيح الهلامي Gel- Filtration وباستخدام عمود Sephadex G-200 . لاحظ (Yadav, 2011) ان الوزن الجزيئي للبروتين المستخلص من نبات *Euphorbia nerifolia* Linn هو 35.24 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis وبوجود المادة الماسخة SDS – PAGE .

## 2- تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية الإنزيم وثباته

تتأثر فعالية وثباتية الإنزيم بالرقم الهيدروجيني ، وتكون الفعالية القصوى لكل إنزيم عند رقم هيدروجيني معين يسمى بالرقم الهيدروجيني الأمثل وتقل فعالية الإنزيم عند الانحراف عن هذا الرقم (Kuddus., 2018) ، إذ تعتمد الأرقام الهيدروجينية المثلى للأنزيمات على عدة عوامل مثل طبيعة المحلول الدارىء والقوة الأيونية ودرجة الحرارة والمادة الخاضعة وتركيز ومصدر الإنزيم وتركيز المثبطات والمنشطات للإنزيم ، وقد يسبب التغير في الرقم الهيدروجيني الى حدوث مسخ Denaturation في تركيب البروتين مما يؤدي الى التأثير في طبيعة الإنزيم وفعاليتها ، وللرقم الهيدروجيني تأثير على أيونية الأحماض الأمينية الموجودة في الموقع الفعال للإنزيم مما يؤثر على الفعالية الإنزيمية الكلية نتيجة لتأين مكونات وسط التفاعل مثل تأين معقد الإنزيم والمادة الخاضعة وتأين المادة الخاضعة فضلاً عن تأثيره الكبير في ثباته الإنزيم (Segel,1976) . إذ أشار (Mamo et al., 2020) ان ثبات فعالية الإنزيم المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين ( 4.5 - 6.5 ) في حين ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لأنزيم البروتين كان 5 . وأكد (Guo et al., 2021) ان ثباته إنزيم البروتين المنتج من عزلة *Penicillium* sp. XT7 كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين ( 3-6 )، بينما أظهر أعلى نشاط له عند الرقم الهيدروجيني 3 .

وذكر (Karray et al., 2021) ان ثبات فعالية أنزيم البروتين المنتج من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين ( 7 - 11 ) في حين ان الرقم الهيدروجيني الأمثل كان 10 . وأشار (Wei et al., 2023) ان ثباته فعالية أنزيم البروتين المنتج من عفن *Aspergillus niger* في رقم هيدروجيني يتراوح بين ( 2 - 5 ) والرقم الهيدروجيني الأمثل للأنزيم كان 3 . وكما ذكر (Hsiao et al., 2014) ان ثباتية فعالية أنزيم البروتين المنتج من عفن *Rhizopus oryzae* كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين ( 3 - 3.6 ) في حين ان الرقم الهيدروجيني الأمثل للأنزيم كان (3.4) . وأشار (Chimbekujwo et al., 2020) ان ثباتية إنزيم

البروتينز المنتج من عفن *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2 كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين ( 4- 6 )  
( بينما كان الرقم الهيدروجيني الأمثل للأنزيم كان 9 .  
3- تأثير درجة الحرارة على فعالية الإنزيم وثباته

تؤثر درجة الحرارة في سرعة التفاعل الإنزيمي نتيجة لتأين المجاميع الفعالة لكل من الإنزيم والمادة الخاضعة ، وتكون الفعالية القصوى لكل إنزيم عند درجة حرارة معينة تسمى بدرجة الحرارة المثلى ، ويعتمد تأثير درجة الحرارة في فعالية الإنزيم على تركيز المادة الخاضعة وثباتها وطبيعة بروتين الإنزيم وثباته والألفة بين الإنزيم والمادة الخاضعة والقوة الأيونية ووجود المنشطات والمثبطات والرقم الهيدروجيني ، فضلاً عن ان وجود بعض المواد الأخرى مع الإنزيم مثل الكربوهيدرات والبروتينات التي تعطي حماية للأنزيم وتجعله اكثر مقاومة للحرارة ، فالإنزيمات النقية لا تستطيع مقاومة الارتفاع في درجات الحرارة بينما الإنزيمات غير النقية تكون اكثر مقاومة للحرارة ( Segel ,1976 ; Whitaker ,1972 ) .

اشار ( Wei et al . ( 2023 ) ان درجة الحرارة المثلى للأنزيم البروتينز المنتج من عفن *Aspergillus niger* كانت 50 م واحتفظ الإنزيم بنشاطه بنسبة 81% عند درجة حرارة 60 م ، لكن لم يظهر اي نشاط للأنزيم عند درجة حرارة 65 م وعندما تم تحضين الإنزيم عند درجة حرارة 30- 50 م لمدة 3 ساعات، أظهر الإنزيم ثباتاً عالياً، بينما انخفض نشاط الإنزيم بشكل ملحوظ إلى ما بعد 50 م ، وتم تعطيله تماماً بعد 10 دقائق من التحضين عند 60 م . لاحظ ( 2021 ) .  
Guo et al ان درجة الحرارة المثلى للأنزيم البروتينز المنتج من عذلة *Penicillium sp. XT7* كانت 30 درجة مئوية واحتفظ الإنزيم بنسبة 86.8% من الحد الأقصى للنشاط عند 20 درجة مئوية وانخفض نشاطه المتبقي بشكل ملحوظ بعد الحضانة عند 50 درجة مئوية. كما أشار ( Souza et al. (2017 عند توصيف البروتينز الحامضي المنتج من عفن *Aspergillus foetidus* ان درجة الحرارة المثلى للأنزيم البروتينز هو ( 55 ) م وان ثباتية الإنزيم تكون عند مدى واسع من درجات الحرارة تتراوح بين (30-60 ) م .

ولاحظ ( Sampaio et al. (2011 عند دراسته تأثير درجة الحرارة على الأنزيم البروتيني الحامضي المنقى والمنتج من عفن *Aspergillus clavatus* عند مدى واسع من درجات الحرارة تراوحت بين ( 20-65 ) م ان درجة الحرارة المثلى للأنزيم البروتينز هو ( 55 ) م وان ثباتية الإنزيم تكون عند مدى من درجات الحرارة تراوحت بين (30-60 ) م . اشار ( Tarek et al . ( 2023 ) ان درجة الحرارة المثلى للأنزيم البروتينز المنتج من عفن *Bacillus siamensis* CSB55 كانت 55 م وان ثباتية الإنزيم تكون عند مدى من درجات الحرارة تراوحت بين (30-80 ) م واحتفظ الإنزيم بنشاطه بنسبة 80% عند درجة حرارة 40 و 50 و 60 و 70 و 80 م لمدة 16 و 14 و 10 و 6 و 4 ساعات على التوالي ، واحتفظ الإنزيم بنشاطه بنسبة 50% عند حوضه عند درجة حرارة 80 و 90 م لمدة 4 و 2 ساعة على التوالي .

#### 4- تأثير الثوابت الحركية

تعد الثوابت الحركية والتي تشمل السرعة القصوى (Vmax) وثابت ميكالس (Km) من القيم المهمة للتفاعلات الإنزيمية ، ، اذ يعرف ثابت ميكالس (Km) بأنه تركيز المادة الخاضعة التي تكون عندها سرعة التفاعل الإنزيمي تساوي نصف السرعة القصوى ، وتعتبر قيمة ثابت ميكالس (Km) عن الألفة بين الإنزيم والمادة الخاضعة ، اذ ان الفعالية الإنزيمية تكون عالية للأنزيمات التي تكون فيها قيمة ثابت ميكالس واطنة وعلى العكس من ذلك تكون الفعالية الإنزيمية واطنة للأنزيمات التي تكون فيها قيمة ثابت ميكالس عالية ( Copeland .,2000 ) .

بين ( Purushothaman et al . (2019 من خلال احتواء خليط التفاعل على تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة (الهيموكلوبين ) تراوحت بين ( 0- 2 % ) وبأستعمال طريقة Lineweaver- Burk plot، ان قيم الثوابت الحركية (Km) و (Vmax) للأنزيم بروتينز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus niger* كانت 6.3 ملغم / مل

98.52 مايكرومتر) ، و 50 مايكرومول / دقيقة على التوالي عند رقم هيدروجيني 4 ودرجة حرارة 60 م . ولاحظ  $A_0$  (2018) *et al.* عند استعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة ( الكازين ) تراوحت بين ( 0.5 - 3 ) غرام / لتر عند رقم هيدروجيني 7 ودرجة حرارة 55 م وباستخدام طريقة Lineweaver- Burk ، ان قيم الثوابت الحركية  $K_m$  و  $V_{max}$  لأنزيم البروتين المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* Y1 كانت 20.0769 ملغم / مل و 256.4103 غرام / مل في الدقيقة على التوالي . و اشار ( Wei *et al.* ( 2023 ) عند استعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة ( الكازين ) تراوحت بين ( 0.2 - 3 ) غرام / لتر عند رقم هيدروجيني 3 ودرجة حرارة 40 م وباستخدام طريقة Lineweaver- Burk ، ان قيم الثوابت الحركية ( $K_m$ ) و ( $V_{max}$ ) لأنزيم البروتين المنتج من عفن *Aspergillus niger* كانت 2.44 ملغم / مل و 83.54 وحدة / ملغم على التوالي . كما استطاع ( Niyonzima *et al.* ( 2015 ) من تحديد قيمة الثوابت الحركية ( $K_m$ ) و ( $V_{max}$ ) لأنزيم البروتين المنتج من عفن *Aspergillus terreus* gr وكانت 5.4 ملغم / مل و 12.8 وحدة لكل مل على التوالي عند رقم هيدروجيني 11 ودرجة حرارة 50 م وباستخدام طريقة Lineweaver- Burk .

##### 5- تأثير العناصر المعدنية والمنشطات والمثبطات على فعالية انزيم بروتين الاسبارتك

تؤثر المركبات والايونات المعدنية على فعالية الإنزيمات ، فبعضها يرتبط بالإنزيم ويزيد من فعاليته وتسمى بالمنشطات Activators والبعض الاخر يقلل من فعالية الانزيم وتسمى بالمثبطات Inhibitor ، ( Usharani *et al.*, 2010) . ان تأثير المثبطات على المادة الخاضعة يكون من خلال ارتباطها بالموقع الفعال مما يؤدي الى تقليل الالفة بين المادة الخاضعة والانزيم ، اذ ان عملية تثبيط الانزيم تعتمد على تركيز المثبط وتركيز المادة الخاضعة وطبيعتها وتركيز الإنزيم ومصدره ووقت التفاعل ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والقوة الأيونية Panesar *et al.*, 2006) .

أشار ( Song *et al.* ( 2020 ) الى ان ايونات  $Cu^{2+}$  و  $Mn^{2+}$  كان لها تأثير في زيادة فعالية انزيم البروتين المنتج من عفن *Aspergillus niger* F0215 في حين ان استعمال البيستاتين ادى الى تثبيط الانزيم بصورة كاملة . ذكر ( Devi and HemaLatha . ( 2014 ) ان انزيم البروتين المنتج من بذور *Cucumis melo* Var *agrestis* قد تُثبط بصورة كاملة عند حضنه مع 5 ملي مولاري من مادة PMSF بينما تأثر الانزيم قليلاً عند حضنه مع مادة EDTA . وفي دراسة قام بها ( Marcial *et al.* (2011) لأنتاج انزيم بروتين الاسبارتك من فطر *Amylomyces rouxii* ، اذ اظهرت النتائج ان استعمال 3 ملي مولاري من البيستاتين يعمل على تثبيط الانزيم بنسبة 73% ، الا ان استعمال 1 ملي مولاري من PMSF يعمل على تثبيط عمل الانزيم بنسبة 12% ، في حين ان استعمال 1 ملي مولاري من EDTA يعمل على تثبيط عمل الانزيم بنسبة 20% . كما لاحظ ( Hsiao *et al.* (2014) عدم وجود إي تأثير تثبيطي عند إضافة 10 ملي مولاري من EDTA لأنزيم البروتين المنتج من عفن *Rhizopus oryzae* عند الرقم الهيدروجيني 3.4 ودرجة حرارة 35 م ، بينما حصل تثبيط عمل الانزيم بشكل كامل عند استعمال مادة البيستاتين Pepstatin A ، في حين لم يكن لإضافة 1 ملي مولار  $Ca^{2+}$  أي تأثير على نشاط التحلل البروتيني، اما عند إضافة 1 ملي مولاري  $Zn^{2+}$  و  $Ni^{2+}$  و  $Cu^{2+}$  و  $Mn^{2+}$  و  $Co^{2+}$  أدت إلى تقليل نشاط الإنزيم بشكل طفيف .

##### الخاتمة

يتزايد الطلب على الإنزيمات في القطاعات الصناعية بسرعة بسبب مزاياها الاقتصادية والبيئية. إذ تنتج الكائنات الحية الدقيقة أنواعًا مختلفة من الإنزيمات ومن بين هذه الإنزيمات هي انزيمات البروتيازات المنتجة من مصادر ميكروبية نتيجة لانخفاض التكلفة وارتفاع معدل الإنتاج والتي اكتسبت اهتمامًا خاصًا في القطاعات الصناعية وتعد الفطريات هي مصادر جيدة لأنتاج أنزيمات البروتياز وخاصة بروتين الاسبارتك الذي ينتج من العزلات الفطرية التي تنتمي إلى جنس *Aspergillus* .

## المصادر

1. **Sharma, N.** (2019). A review on fungal alkaline protease. *J. Emerg. Technol. Innov. Res.* 6, 261–273. doi: 10.1729/Journal.22354
2. **Gimenes, N. C., Silveira, E., & Tambourgi, E. B.** (2021). An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. *Separation & Purification Reviews, 50(3)*, 223–243.
3. **Pawar, K. S., Singh, P. N., & Singh, S. K.** (2023). Fungal alkaline proteases and their potential applications in different industries. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1138401
4. **Choudhary, K., Mankar, M. K., and Sahay, S.** (2022). “Extremophilic enzymes: catalytic features and industrial applications” in *Extremophilic fungi: Ecology, Physiology and Applications* (Singapore: Springer Nature Singapore), 273–314.
5. **Koistinen, H., Kovanen, R. M., Hollenberg, M. D., Dufour, A., Radisky, E. S., Stenman, U. H., & Mirtti, T.** (2023). The roles of proteases in prostate cancer. *IUBMB life*.
6. **Kalaiselvan, P., Dutta, D., Konda, N. V., Sharma, S., Kumar, N., Stapleton, F., & Willcox, M. D.** (2023). Effect of Deposition and Protease Digestion on the Ex Vivo Activity of Antimicrobial Peptide-Coated Contact Lenses. *Nanomaterials*, 13(2), 349.
7. **Couture, F.** (2023). Therapeutic Targeting of the Proteolytic Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 521.
8. **Dasari, P. K., Gannamaneni, S. S., Jahnavi, B., Umadevi, B., Balaji, M. A., Meghana, N., & Sravani, R.** (2023). optimization and production of protease using *aspergillus cervinus*. *World Journal of Pharmaceutical Research* , 12(4) , 2063–2071.
9. **Dudani, J. S., Warren, A. D., & Bhatia, S. N.** (2018). Harnessing protease activity to improve cancer care. *Annual review of cancer biology*, 2, 353–376.
10. **Zhang, J., Qiao, W., & Luo, Y.** (2023). Mitochondrial quality control proteases and their modulation for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, 43(2), 399–436.
11. **Erekat, N. S.** (2022). Programmed cell death in cerebellar Purkinje neurons. *Journal of integrative neuroscience*, 21(1), 30,1–15.
12. **Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F.** (2021). Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. *Catalysis Letters*, 151, 307–323.
13. **Abd AL-MAnhel, A. J.** (2017). Production of exopolysaccharide from local fungal isolate. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 5(3), 338–46.

14. **Patil, P. M.**;Kulkarni A. A. and Kininge , P.(2012). Production of Milk Clotting Enzyme from *Aspergillus oryzae* under Solid–State Fermentation using Mixture of Wheat Bran and Rice Bran. International Journal of Scientific and Research Publications,2(10):1–12.
15. **Mienda, B. S.**, Yahya, A., Galadima, I. A., & Shamsir, M. S. (2014). An overview of microbial proteases for industrial applications. Res J Pharm Biol Chem Sci, 5(1), 388–396.
16. **Mamo,J.**; Assefa,F.(2018). The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries. Journal of Food Quality,2018:1–16.
17. **Rawlings, N. D.**, & **Salvesen, G.** (2013). Handbook of proteolytic enzymes (No. 8040). Academic press.
18. **Gurumallesh, P.**, Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. International journal of biological macromolecules, 128, 254–267.
19. **majid dakhil AL–Sefar, R.** (2017). Purification and Charactrization of protease for some plants sources. Al–Qadisiyah Journal of Pure Science, 22(4), 105–129.
20. **Gimenes, N. C.**, Silveira, E., & Tambourgi, E. B. (2021). An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. *Separation & Purification Reviews*, 50(3), 223–243.
21. **Wei, M.**, Chen, P., Zheng, P., Tao, X., Yu, X., & Wu, D. (2023). Purification and characterization of aspartic protease from *Aspergillus niger* and its efficient hydrolysis applications in soy protein degradation. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 42,1–9 .
22. **Mamo,J.**; Orellana,J.F.S.; Yeleman, V.; Kangwa,M.; Fernandez–Lahore,M.H and Assefa,F(2020). Purification and Characterization of Aspartic Protease Produced from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under Solid–State Fermentation. [bioRxiv, 2020,1–38](https://doi.org/10.1101/2020.11.18.381111)
23. **Singh, R.**, Mittal, A., Kumar, M., & Mehta, P. K. (2016). Microbial proteases in commercial applications. J Pharm Chem Biol Sci, 4(3), 365–374.
24. **Razzaq, A.**, Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 7, 110,1–20 .
25. **Banerjee, G.**, & Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 33(2), 119–143.
26. **Solanki, M. K.**, Abdelfattah, A., Sadhasivam, S., Zakin, V., Wisniewski, M., Droby, S., & Sionov, E. (2021). Analysis of stored wheat grain–associated microbiota reveals biocontrol activity among microorganisms against mycotoxigenic fungi. *Journal of Fungi*, 7(9), 781, 1–16.



27. **Machado**, A. R. G., Teixeira, M. F. S., de Souza Kirsch, L., Campelo, M. D. C. L., & de Aguiar Oliveira, I. M. (2016). Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23 (5), 621–627.
28. **Mandujano–González**, V., Villa–Tanaca, L., Anducho–Reyes, M. A., & Mercado–Flores, Y. (2016). Secreted fungal aspartic proteases: A review. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(2), 76–82.
29. **Da Silva**, R. R. (2017). Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 183, 1–19.
30. **Souza**, P. M., Werneck, G., Aliakbarian, B., Siqueira, F., Ferreira Filho, E. X., Perego, P., ... & Junior, A. P. (2017). Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1103–1110.
31. Contesini, F. J., Liberato, M. V., Rubio, M. V., Calzado, F., Zubieta, M. P., Riaño–Pachón, D. M., & Damasio, A. R. (2017). Structural and functional characterization of a highly secreted  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (GH62) from *Aspergillus nidulans* grown on sugarcane bagasse. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–proteins and proteomics*, 1865(12), 1758–1769.
32. **Ao**, X. L., Yu, X., Wu, D. T., Li, C., Zhang, T., Liu, S. L., Chen, S.J., He ,L., Zhou, K., Zou, L. K. (2018). Purification and characterization of neutral protease from *Aspergillus oryzae* Y1 isolated from naturally fermented broad beans. *AMB Express*, 8(1), 1–10.
33. **De Oliveira**, D. M., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(3), 10–1128.
34. **Zhang**, B., Sun, Q., Liu, H. J., Li, S. Z., & Jiang, Z. Q. (2017). Characterization of actinidin from Chinese kiwifruit cultivars and its applications in meat tenderization and production of angiotensin I–converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *LWT*, 78, 1–7.
35. **Mothe**, T., & Sultanpuram, V. R. (2016). Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. *3. Biotech*, 6(1), 53.
36. **Theron**, L. W., & Divol, B. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 8853–8868.
37. **Brik**, A., & Wong, C. H. (2003). HIV–1 protease: mechanism and drug discovery. *Organic & biomolecular chemistry*, 1(1), 5–14.

38. **Coates, L.**, Tuan, H. F., Tomanicek, S., Kovalevsky, A., Mustyakimov, M., Erskine, P., & Cooper, J. (2008). The catalytic mechanism of an aspartic proteinase explored with neutron and X-ray diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 130(23), 7235–7237.
39. **Wångsell, F.** (2006). *Design and Synthesis of Serine and Aspartic Protease Inhibitors* (Doctoral dissertation, Institutionen för fysik, kemi och biologi).
40. **Naveed, M.**, Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2021). Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. *Catalysis Letters*, 151, 307–323.
41. **N Jisha, V.**, B Smitha, R., Pradeep, S., Sreedevi, S., N Unni, K., Sajith, S., ... & Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in enzyme research*, 1(03), 39–51.
42. **Dadshahi, Z.**, Homaei, A., Zeinali, F., Sajedi, R. H., & Khajeh, K. (2016). Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Penaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. *Food Chemistry*, 202, 110–115.
43. **Sun, Q.**; Chen, F.; Geng, F.; Luo, Y.; Gong, S. and Jiang, Z. (2018). A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. *Food Chemistry*, 245:570–577.
44. **Putatunda, C.**, **Kundu, BS.**, **Bhatia, R** . (2019) Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus* sp. HD292. *Proc Natl Acad Sci India B Biol Sci* 89:957–965. <https://doi.org/10.1007/s40011-018-1011-z>
45. **Bhatia, RK.**, Ullah, S., Hoque, HZ., Ahmad, I., Yang, YH., Bhatt, AK., Bhatia, SK .(2021) Psychrophiles: a source of cold-adapted enzymes for energy efficient biotechnological industrial processes. *J Envir Chem Eng* 9:104607. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104607>
46. **Jadhav, H. P.**, Sonawane, M. S., Khairnar, M. H., and Sayyed, R. Z. (2020) Production of alkaline protease by rhizospheric *Bacillus cereus* HP\_RZ17 and *Paenibacillus xylanilyticus* HP\_RZ19. *Environ Sustain* 3:5–13. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00096-z>
47. **Hakim, A.**, Bhuiyan, F. R., Iqbal, A., Emon, T. H., Ahmed, J., & Azad, A. K. (2018) Production and partial characterization of dehairing alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKAL7 and *Exiguobacterium indicum* AKAL11 by using organic municipal solid wastes. *Heliyon* 4:e00646. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00646> .

48. **Ash, K.**, Sushma, Ramteke, PW. (2018) Optimization of extracellular alkaline protease production from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soil samples. Inter J Agric Environ Biotechnol 11:187–194. <https://doi.org/10.30954/0974-1712.2018.00178.24>
49. **Prajapati, V. S.**, Ray, S., Narayan, J., Joshi, C. C., Patel, K. C., Trivedi, U. B., & Patel, R. M. (2017) Draft genome sequence of a thermostable, alkaliphilic  $\alpha$ -amylase and protease producing *Bacillus amyloliquefaciens* strain KCP2. 3 Biotech (2017) 7:372 .
50. **Usman, A.**, Mohammed, S., & Mamo, J. (2021). Production, optimization, and characterization of an acid protease from a filamentous fungus by solid-state fermentation. International journal of microbiology, 2021.
51. **Novelli, P.K., Barros, M.M., Fleuri, L.F.**, (2016). Novel inexpensive fungiproteases: production by solid state fermentation and characterization. Food Chem. 198,119e124.
52. **Yin, F. W.**, Sun, X. L., Zheng, W. L., Yin, L. F., Luo, X., Zhang, Y. Y., Wang, Y.F., Fu, Y. Q. (2023). Development of a Strategy for L-Lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae* Using *Zizania latifolia* Waste and Cane Molasses as Carbon Sources. *Molecules*, 28(17), 6234.
53. **Patil, P. M.**; Kulkarni A. A. and Kininge , P.(2012). Production of Milk Clotting Enzyme from *Aspergillus oryzae* under Solid-State Fermentation using Mixture of Wheat Bran and Rice Bran. International Journal of Scientific and Research Publications,2(10):1–12.
54. **Daudi, S.**; Mukhtar, H.; Rehman, A.U. and UL-Haq, I.(2015). Production of rennin-like acid protease by *Mucor pusillus* through submerged fermentation .Pak.J.Bot.,47(3):1121–1127.
55. **Aljammas, H. A.**, Al Fathi, H., & Alkhalaf, W. (2018). Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using solid-state fermentations. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 213–216.
56. **Purushothaman, K.**, Bhat, S. K., Singh, S. A., Marathe, G. K., & Rao, A. R. G. A. (2019). Aspartic protease from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with pepstatin A. *International journal of biological macromolecules*, 139, 199–212.
57. **Yujie, G.**; Tao, T.; Peng, Y.; Yaru, W. ; Yaxin, R. ; Bin, Y. and L. Huiying, (2019). High-level expression and characterization of a novel aspartic protease from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 and its potential application in juice clarification, Food Chem. 281: 197–203.
58. **dos Santos Aguilar, J. G.**, & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253–262.

59. **Othman, B., & Sebo, N. H.** (2023). Utilization of Some Agro Wests for the Production of Acid Protease by *Aspergillus niger*. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 10(3S), 4319–4331.
60. **Hamza, T. A., & Woldesenbet, F.** (2017). Optimization of culture growth parameters for production of protease from bacteria, isolated from soil. *Biosci Bioeng*, 3, 1–0.
61. Aunstrup, K., Andersen, O., Falch, E. A. and Nielsen, T.K. ( 1979 ). Production of microbial enzymes, In *Microbiol Technology*, A.H. Rose, ed. Academic press, Inc, New York .
62. **Bano, S., Dahot, M. U., & Naqvi, S. H. A.** (2016). Optimization of culture conditions for the production of protease by *Pleurotus eryngii*. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 13(3), 193–198.
63. **Bensmail, S., Mechakra, A., & Fazouane–Naimi, F.** (2015). Optimization of milk–clotting protease production by a local isolate of *Aspergillus niger* ffb1 in solid–state fermentation. *The journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 4(5), 467.
64. **Luti, K., & Younis, R.** (2014). An induction of undecylprodigiosin production from *Streptomyces coelicolor* by elicitation with microbial cells using solid state fermentation. *Iraqi J. Sci*, 55, 553–1562.
65. **Chahrazad, B., & Habiba, Z.** (2021). Production and characterization of proteases from *Aspergillus niger* strain isolated from dried fruit and its effect on gliadin. *Algerian Journal of Nutrition and Food Sciences*, 1(4), 25–29
66. **Khademi, F., Abachi, S., Mortazavi, A., Ehsani, M. A., Tabatabaei, M. R., & Malekzadeh, F. A.** (2013). Optimization of fungal rennet production by local isolate of *Rhizomucor nainitalensis* under solid substrate fermentation system. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5(2), 115–121.
67. **Foda, M. S., Moharam, M. E., Ramadan, A., & El–Bendary, M. A.** (2012). Over production of milk clotting enzyme from *Rhizomucor miehei* through adjustment of growth under solid state fermentation conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(8), 579–589.
68. **Chimbekujwo, K. I., Ja’afaru, M. I., & Adeyemo, O. M.** (2020). Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Scientific African* 8: e00398.
69. **Park, Y. K., De Santi, M. S. S., & Pastore, G. M.** (1979). Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Science*, 44(1), 100–103.

70. **Fairooz**, H. A., Fairooz, N. A., & Chalooob, F. A. (2021). Extraction condition of protease from broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*) and study of Biochemical Characteristic from the selected source. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 2208–2219.
71. **Kamal**, S., Rehman, S., & Iqbal, H. M. (2017). Biotechnological valorization of proteases: from hyperproduction to industrial exploitation—a review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 36(2), 511–522.
72. **Hsiao**, N. W., Chen, Y., Kuan, Y. C., Lee, Y. C., Lee, S. K., Chan, H. H., & Kao, C. H. (2014). Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(2), 89–94.
73. **Devi**, B. G., & HemaLatha, K. P. J. (2014). Isolation, partial purification and characterization of alkaline serine protease from seeds of *Cucumis melo* var *agrestis*. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 3(6), 88–95.
74. **Tarek**, H., Nam, K. B., Kim, Y. K., Suchi, S. A., & Yoo, J. C. (2023). Biochemical Characterization and Application of a Detergent Stable, Antimicrobial and Antibiofilm Potential Protease from *Bacillus siamensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5774.
75. **Karray**, A., Alonazi, M., Horchani, H., & Ben Bacha, A. (2021). A novel thermostable and alkaline protease produced from *Bacillus stearothermophilus* isolated from olive oil mill sops suitable to industrial biotechnology. *Molecules*, 26(4), 1139.
76. **Al-Soufi**, M. A. (2013). Partial purification and estimated some characterization of protease from prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.) leaves and used it in some applications. *Iraqi Journal of Biotechnology*, 12(2), 1–18.
77. **Yadav**, R. P., Patel, A. K., & Jagannadham, M. V. (2011). Purification and biochemical characterization of a chymotrypsin-like serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn. *Process Biochemistry*, 46(8), 1654–1662.
78. **Kuddus**, M. (Ed.). (2018). Enzymes in food biotechnology: production, applications, and future prospects. 912 .
79. **Guo**, Y., Li, X., Jia, W., Huang, F., Liu, Y., & Zhang, C. (2021). Characterization of an intracellular aspartic protease (PsAPA) from *Penicillium* sp. XT7 and its application in collagen extraction. *Food Chemistry*, 345, 128834.
80. **Sampaio e Silva**, T. A., Knob, A., Tremacoldi, C. R., Brochetto-Braga, M. R., & Carmona, E. C. (2011). Purification and some properties of an extracellular acid protease from *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2491–2497.

81. Copeland, R. A. (2000). Kinetics of single-substrate enzyme reactions. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2, 137–139.
82. **Niyonzima**, F. N., & More, S. S. (2015). Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. *3 Biotech*, 5, 61–70.
83. **Usharani**, B., & Muthuraj, M. (2010). Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. *Afr. J. Microbiol. Res*, 4(11), 1057–1063.
84. **Panesar**, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(4), 530–543.
85. **Song**, P., Cheng, L., Tian, K., Zhang, M., Mchunu, N. P., Niu, D., ... & Wang, Z. X. (2020). Biochemical characterization of two new *Aspergillus niger* aspartic proteases. *3 Biotech*, 10, 1–9.
86. **Marcial**, J., Pérez De Los Santos, A. I., Fernández, F. J., Díaz-Godínez, G., Montiel-González, A. M., & Tomasini, A. (2011). Characterization of an aspartic protease produced by *Amylomyces rouxii*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(1), 9–16.