**دراسات كيميائية حيوية علي إنتاج وحركيات بعض إنزيمات التحليل المائي وتطبيقاتها في المجالات المختلفة**

**رسالة مقدمة من**

**وفاء راشد عبدالفتاح زغلول**

**بكالوريوس فى العلوم الزراعية - برنامج التكنولوجيا الحيوية الزراعية (تخصص الكيمياء الحيوية)**

**كلية الزراعة - جامعة بنها**

**2015**

**كجزء متمم لمتطلبات الحصول علي درجة الماجستير**

**في**

**العلوم الزراعية**

**تخصص الكيمياء الحيوية الزراعية**

**قسم الكيمياء الحيوية الزراعية**

**كلية الزراعة - جامعة بنها**

**(2020)**

**Biochemical studies on the production and kinetics of some hydrolyzed enzymes and its applications in different fields**

By

**Wafaa Rashed Abdelfattah Zaghloul**

B.Sc. Agric. Scie., Agric. Biotechnology program (Biochem.), Fac. of Agric. Moshtohor, Benha University

(2015)

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment**

**OF**

 **the Requirements For The Degree of**

**MASTER OF SCIENCE**

in

**Agricultural Biochemistry**

**Agricultural Biochemistry Department,**

**Faculty of Agriculture,**

**Benha University**

**(2020)**

**5. SUMMARY**

Microbial enzymes are widely used in industrial processes due to their low cost and large productivity by microorganisms. Also, the microbial enzymes are distinguished by chemical stability. The estimated value of world marketing is presently about US$ 2.7 billion. Detergents, cleaning of textiles, baking animal feeder and tanning are the main industries, which use about 75% of industrially produced enzymes. *Bacillus* species were considered the most significant industrial enzyme producers due to their ability to secrete large quantities of extracellular enzymes (amylases and proteases) by its various strains.

Therefore, this study was carried out to determine the environmental and nutritional factors affecting amylase and protease production by two previously identified bacterial strains *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis*, respectively. In addition, factors affecting on the reaction activity of produced amylase and protease by abovementioned bacterial strains were studied. So, the study was divided into two parts, the first part aimed to optimize the amylase production whereas, the second part aimed to optimize the protease production. The obtained results could be summarized as the following:

1. **Optimization of amylase production**

*Bacillus amyloliquefaciens* was able to hydrolyze starch as a result of its ability for amylase production.

The records of produced glucose and amylase activity were higher when the pH of fermentation medium ranged from 6.5-7.0 compared to other investigated pH values. The highest records of produced glucose (55.81 μg/ml) and amylase activity (31.01 μmol/min) were observed at pH 7.0.

Regarding the effect inoculum size on amylase activity, it was observed that the maximum activity values when the fermentation medium was inoculated with 150 μl/ml medium.

Produced glucose and amylase activity were increased with the increasing of incubation period to reach their maximum records (98.51 μg/ml and 54.73 μmol/min, respectively) at 72 h of incubation period.

Basal broth medium as a fermentation medium gave higher values of produced glucose and amylases activity rather than the using of starch broth medium. Moreover, results proved that the shaking method gave higher records of produced glucose and amylase activitybybacterial strain*B. amyloliquefaciens*compared to static method.

Concerning the effect of incubation temperature on amylase activity, results indicated that the activity was decreased with the increasing of temperature. The highest records of produced glucose and amylase activity (119.59 μg/ml and 66.44 μmol/min, respectively) were observed when the fermentation medium was incubated at 37oC.

Among the carbon and nitrogen sources, starch and tryptone gave the highest records of produced glucose and amylase activity.

From the obtained results, it could be mention that the enzyme production was 2.34-fold higher after optimization the production conditions compared to the using of each factor individually in basal medium.

In addition, obtained results clearly indicated that the values of amylase activity, protein content and specific amylase activity were 697.60 μmol, 57.14 mg/ml and 12.21 μmol/mg protein, respectively.

Concerning the factors affecting on the produced α- amylase activity, observed results in the current study showed that the value of amylase activity was reached its maximum at 65oC.

Moreover, the relative amylase activity was gradually increased with the increasing of pH value to reach its maximum record at pH 6.0.

Regarding the kinetic parameters of α-amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens*, the maximum reaction velocity (Vmax) for the produced α-amylase with varied concentrations of soluble starch as a standard substrate (0.4 to 4.0%) was determined and equal to 32.3 μmol/min. While, the Michael’s-Menten constant (Km) was found to be 0.0159 ml which can be obtained by the half point of Vmax at saturation curve of substrate. From the obtained data for Vmax and Km values using **Lineweaver -Burk** plots equation was almost equalled to the results obtained in the saturation curve of substrate.

Concerning the effect of sodium chloride concentration on amylase relative activity, results proved that the relative amylase activity was gradually increased with the increasing of sodium chloride concentration to reach their maximum records at 5%.

 As regard to the effect of metal ions on amylase relative activity, obtained results clearly indicated that amylase relative activity was higher at a concentration 1mM for all tested metal ions (Fe+3,Cu+2, Ca+2, Ni+2 and Mn+2) compared to the concentration of 5 mM from abovementioned metal ions.

**II. Optimization of protease production**

Regarding the effect of environmental and nutritional factors on protease productionby *Bacillus licheniformis*, the obtained results could be summarized as follows:

*B. licheniformis* was tested for protease detection qualitatively using plate assay method by employing clear zone technique; skimmed milk was used as a substrate. Results proved that *B. licheniformis was* able to hydrolyze skimmed milk due to its ability for protease production.

It is importance to mention that the higher pH values are most suitable for production of proteases by various microorganisms therefore, the highest record of protease production (15.72 μmol/min) by *B. licheniformis* was recorded at pH 8.5.

Protease activity (μmol/min) was increased with the increasing of inoculum size of *B. licheniformis* to reach their maximum value (16.12 μmol/min) when the fermentation medium was inoculated with 100 μl/ml.

Obtained results indicated that the values of bacterial growth of *B. licheniformis*, produced tyrosine and protease activity were increased with the increasing of incubation period to reach their maximum value (17.91 μmol/min) at 72 h.

Additionally, protease activity was higher when the Modified Luria broth medium was used as a fermentation medium rather than the using of Malik and Mathur medium. Also, observed data clearly indicate that the shaking method gave higher records of protease activity as compared to static method.

 Moreover, the protease activity was increased with the increasing of incubation temperature, the highest value (37.04 μmol/min) was recorded at 37°C.

Among the carbon sources, maltose and sucrose gave the highest and the lowest records of protease activity, respectively. Also, the highest and the lowest records of protease were observed when tryptone and ammonium chloride (NH4Cl) were used as a nitrogen source in fermentation medium.

From the obtained results, it could be mention that the protease production was 2.71-fold higher after optimization the production conditions compared to the using of each factor individually in modified Luria broth medium. Also, obtained results clearly indicate that the values of protease activity, protein content and specific protease activity were 426.2 μmol, 84.5 mg/ml and 5.04 μmol/mg, respectively.

Concerning the factors affecting protease activity, observed results in the current study show that the value of on the protease activity was reached its maximum values (100 %) at 70oC. Therefore,the produced enzyme (protease) in this study can be used in detergents and leather tanning industries.

The reaction and relative protease activities were gradually increased with the increasing of pH to reach their maximum record at pH 8.0.

The reaction activity of protease was increased with the increasing of casein concentration and reached its maximum value at 3.2% then gradually decreased. Regarding the kinetic parameters of protease produced by *B. licheniformis*. The maximum reaction velocity (Vmax) for the produced enzyme with varied concentrations of soluble casein as a standard substrate (0.4 to 4.0%) was determined and equal to 36.7 μmol/min. While, the Michael’s-Menten constant (Km) was found to be 0.014 ml which can be obtained by the half point of Vmax at saturation curve of substrate.

From the obtained data for Vmax and Km values using **Lineweaver -Burk** plots equation was almost equalled to the results obtained in the saturation curve of substrate.

The relative protease activity was gradually increased with the increasing of sodium chloride concentration to reach their maximum record at 2%.

Also, obtained results clearly indicate that the protease relative activity was higher at a concentration of 1 mM (Fe+3 and Cu+2) compared to the concentration of 5 mM from abovementioned metal ions and the protease relative activity was higher at a concentration of 5 mM (Ca+2, Ni+2 and Mn+2) compared to the concentration of 1 mM from abovementioned metal ions .

**Recommended and conclusion**

Finally, the *Bacillus* genus can be recommended to produce microbial enzymes such as amylase and proteinase. This is because these enzymes are thermally stable under high temperatures and various minerals. Therefore, it is worthy to recommend the use of these enzymes for industrial purposes.

**الملخص العربي**

من المعروف أن الإنزيمات الميكروبية تستخدم بكثرة في العمليات الصناعية المختلفة، ويرجع ذلك الي أن تكاليف إنتاجها منخفضة وتنتجها الميكروبات بكميات كبيرة، كذلك تتميز الإنزيمات الميكروبية بالثبات الكيميائي، وفي الوقت الحالي تقدر قيمة تسويق الإنزيمات الميكروبية علي مستوى العالم بحوالي 2.7 بليون دولار. وتعتبر صناعة المنظفات وتبيض المنسوجات وعملية الخبيز وإنتاج الأعلاف للحيوانات والدباغة وغيرها من الصناعات الهامة التي تستخدم فيها الإنزيمات الميكروبية بدرجة واضحة، حيث تعتمد هذه الصناعات بنسبة 75% علي الإنزيمات الميكروبية، وتعتبر أنواع *Bacillus* spp. من أهم الأنواع البكتيرية التي تستخدم في إنتاج الإنزيمات الميكروبية مثل الأميليز والبروتيز بكثرة علي النطاق التجاري.

لذلك فقد أقيمت هذه الدراسة بهدف تحديد الظروف البيئية والغذائية التي تؤثر علي إنتاجية إنزيمي الأميليز والبروتيز. في هذه الدراسة تم إستخدام نوعين من البكتريا لها المقدرة علي إنتاج الإنزيمات سابقة الذكر وهما*Bacillus amyloliquefaciens* لإنتاج إنزيم الأميليز و *Bacillus licheniformis*لإنتاج إنزيم البروتيز. أيضاً، تم دراسة العوامل التي تؤثر علي نشاط إنزيمي الأميليز والبروتيز، وقسمت هذه الدراسة الي جزئين، ولقد هدف الجزء الأول إلي دراسة الظروف المثلي لإنتاج ونشاط إنزيم الأميليز، وكان الهدف من الجزء الثاني دراسة الظروف المثلي لإنتاج ونشاط إنزيم البروتيز، ويمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة كما يلي:

**أولاً: دراسة الظروف المثلي لإنتاج ونشاط إنزيم الأميليز**

أظهرت النتائج قدرة بكتريا*B. amyloliquefaciens* **علي** تحلل النشا حيث شوهد هالات شفافة حول مستعمرات هذه البكتريا علي الأطباق المحتوية علي بئة أجار النشا. وعند دراسة الظروف البيئية التي تؤثر علي إنتاجية إنزيم الأميليز أوضحت النتائج أن أعلي إنتاجية لإنزيم الأميليز (31.01 ميكرومول/دقيقة) قد لوحظت عندما كانت درجة حموضة بيئة التخمير 7 بينما أقل إنتاجية للإنزيم لوحظت عندما كانت درجة حموضة بيئة إنتاج الإنزيم 6، كذلك أوضحت النتائج أنه عند تلقيح البيئة بمعدل 150 ميكروليتر/ملليتر بيئة تم الحصول علي أعلي إنتاجية من إنزيم الأميليز في حين أنه عند تلقيح البيئة بمعدل 10 ميكروليتر/ملليتر لوحظ أقل إنتاجية من إنزيم الأميليز.

بخصوص تأثير فترة التحضين علي إنتاجية الإنزيم فقد أوضحت النتائج أن إنتاج الإنزيم قد زاد بزيادة فترة التحضين، حيث لوحظ أعلي إنتاجية للإنزيم (54.73 ميكرومول/ دقيقة) عندما كانت فترة التحضين 72 ساعة بينما أوضحت النتائج أن أقل كمية من الإنزيم الناتج قد لوحظت عندما كانت فترة التحضين 24 ساعة.

وعند دراسة تأثير طريقة التنمية لإنتاج إنزيم الاميليز اوضحت النتائج أن طريقة الرج قد أعطت إنتاجية أعلي من الإنزيم بالمقارنة بالإنتاج تحت ظروف المزرعة الثابتة (بدون رج)، وبخصوص تأثير درجة حرارة التحضين علي إنتاج الإنزيم فقد أوضحت النتائج أن إنتاج الإنزيم قد زاد بارتفاع درجة حرارة التحضين ولقد تم الحصول علي أعلي إنتاجية من الإنزيم (66.44 ميكرومول/دقيقة) عندما كانت درجة حرارة التحضين 37 درجة مئوية في حين أوضحت النتائج أن أقل كمية من الانزيم قد لوحظت عندما كانت درجة حرارة التحضين 39 درجة مئوية .

وعند دراسة تأثير مصادر الكربون والنيتروجين علي إنتاج إنزيم الأميليز بواسطة *B. amyloliquefaciens* فقد أظهرت نتائج الدراسة أن أفضل مصدر للكربون والنيتروجين لإنتاج الإنزيم هما النشا والتربتون علي التوالي ، وعند إنتاج إنزيم الأميليز بإستخدام الظروف المثلي سواء البيئة أو الغذائية والتي تم الحصول عليها في التجارب السابقة في هذه الدراسة فقد لوحظ زيادة في إنتاج الإنزيم بمقدار 2.34 مرة وذلك بالمقارنة باستخدام كل عامل منفرداً، وزيادة إنتاجية إنزيم الأميليز تحت الظروف المثلي كانت متوقعة حيث تم توفير كل ظروف الإنتاج المثلي للميكروب المنتج، ولقد أوضحت النتائج أن قيم نشاط إنزيم الأميليز ومحتواه من البروتين ونشاطه النوعي كانت 697.6 ميكرومول/ دقيقة، 57.14 مللجرام/ ملليليتر، 12.21 ميكرومول/ ملليجرام بروتين علي التوالي.

وبخصوص دراسة العوامل التي تؤثر علي نشاط إنزيم الأميليز فقد أوضحت النتائج أن نشاط الإنزيم قد زاد بزيادة درجة الحرارة حيث لوحظ أعلي نشاط للإنزيم (100%) عند درجة 65 درجة مئوية، في حين أوضحت النتائج أن أقل نشاط للإنزيم لوحظ عند درجة حرارة 30 درجة مئوية، وفي ضوء النتائج المتحصل عليها فإنه يجب أن نشير إلي أن إنزيم الأميليز قد ظل محتفظاً بنشاطه النسبي بنسبة 72.9% وذلك عند تحضين الإنزيم الخام علي درجة حرارة 80 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة، ولذلك يمكن إستخدام إنزيم الأميليز الناتج بواسطة *B. amyloliquefaciens* في مختلف العمليات الصناعية التي تتم تحت ظروف درجة الحرارة العالية مثل المخبوزات، صناعة البيرة، التسكر في النشا لإنتاج شراب الجلوكوزوالفركتوز.

وفيما يخص تأثير تركيز الأس الهيدروجيني علي نشاط إنزيم الأميليز فقد أظهرت النتائج المتحصل عليها أن نشاط الإنزيم قد زاد بزيادة تركيز الأس الهيدروجيني حيث لوحظ أعلي نشاط للإنزيم (100%) عند تركيز أس هيدروجيني 6، بينما أوضحت النتائج أن نشاط الإنزيم قد قل تدريجياً بإرتفاع تركيز الأس الهيدروجيني حيث شوهد أقل نشاط للإنزيم (31%) عند تركيز أس هيدروجيني 9 . وبالإضافه الي ذلك فقد أوضحت النتائج أن نشاط إنزيم الاميليز قد زاد بزيادة تركيز مادة التفاعل (النشا) حيث وصل إلي أقصاه عند إستخدام النشا بنسبة 2.8% (28 جرام/لتر بيئة)، أيضا أوضحت النتائج أن سرعة نشاط الإنزيم قد زادت بزيادة تركيز مادة التفاعل.

وبخصوص حركيات نشاط إنزيم الأميليز الذي تم إنتاجة في هذا البحث بواسطة *B. amyloliquefaciens* فقد أظهرت النتائج أن السرعة القصوي لإنزيم الأميليز في وجود تركيزات مختلفة من النشا كمادة تفاعل والتي تراوحت من 0.4 الي 4 % كانت قيمتها 32.3 ميكرومول/ دقيقة، بينما وجد أن قيمة ثابت ميكاليس-منتن تساوي 1.596ملليليتر/100 مللي والتي تم الحصول عليها عند تركيز مادة التفاعل وعند نصف السرعة القصوي بإستخدام منحني التشبع بمادة التفاعل (النشا)، كذلك تم تقدير السرعة القصوي وثابت ميكاليس- منتن بواسطة معادلة Lineweaver -Burk plots عند رسم العلاقة البيانية بين كلا من 1/Vo  و 1/S، حيث أن ميل هذا الخط يمثل قيمة ثابت ميكاليس- منتين/السرعة القصوي والتي كانت قيمتها 0.0494. أيضاً، أظهرت النتائج أن قيمة 1/ السرعة القصوي تساوي 0.031 بينما كانت قيمة 1/ ثابت ميكاليس – منتين تساوي 0.627. وفي ضوء النتائج المتحصل عليها عند تقدير السرعة القصوي وثابت ميكاليس- منتن للإنزيم باستخدام معادلة Lineweaver -Burk plots يمكن القول بأن قيمة السرعة القصوي للإنزيم وثابت ميكاليس- منتن مساوية تقريباً للقيم التي تم الحصول عليها عند تقديرهما باستخدام منحني التشبع لمادة التفاعل (النشا) .

 وعند دراسة تأثير كلوريد الصوديوم علي نشاط إنزيم الأميليز أوضحت النتائج أن نشاط الإنزيم قد زاد تدريجياً بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم حيث وصل نشاط الإنزيم إلي أقصاه عند تركيز 5% وقل بعد ذلك، في حين أوضحت النتائج أن نشاط الإنزيم كان منخفضاً عند التركيزات المنخفضة من كلوريد الصوديوم بالمقارنة بالتركيزات العالية، أيضا أظهرت النتائج أن إنزيم الأميليز ظل محتفظاً بنشاطه بنسبة 78.6 و 93.1 % وذلك عند تركيز كلوريد صوديوم 4 و 4.5 علي التوالي.

 وعند دراسة تأثير الأيونات المعدنية علي نشاط إنزيم الأميليز أوضحت النتائج أن أعلي نشاط للإنزيم كان عند تركيز 1 ملليمول من كل الأيونات المعدنية التي تم درستها (الحديديك، النحاسوز، الكالسيوم، النيكل، المنجنيز) وذلك بالمقارنة بنشاط الإنزيم عند إستخدام الأيونات المعدنية سابقة الذكر بتركيز 5 ملليمول، كذلك أظهرت الننتائج أن أيونات الحديديك والنحاسوز والكالسيوم عند تركيز 1 ملليمول أدت الي زيادة النشاط النسبي لإنزيم الأميليز بمقدار 13.02 ، 42.34 و 40.09% علي التوالي بالمقارنة بمعاملة الكنترول، بينما أظهرت النتائج أنه عند استخدام أيونات النيكل والمنجنيز بتركيز 1 ملليمول لدراسة نشاط الانزيم أن النشاط النسبي للإنزيم قد زاد بمقدار 13.72 و 37.53 % علي التوالي بالمقارنة بالكنترول. وعند دراسة النشاط النسبي لإنزيم الأميليز باستخدام الأيونات المعدنية لكل من الحديديك، النحاسوز، النيكل، المنجنيز بتركيز 5 ملليمول أوضحت النتائج أن الأنزيم ظل محتفظا بنشاطه بنسبة 82.58 ، 92.24 ، 82.24 ، 40.11 % مع كل من الحديديك ، النحاسوز ، النيكل ، المنجنيز علي التوالي بالمقارنة بالكنترول. ومن ناحية أخري أظهرت النتائج المتحصل عليها أن أيون الكالسيوم بتركيز 5 ملليمول أدي إالي زيادة النشاط النسبي لإنزيم الأميليز بنسبة 32.45 % بالمقارنة بالكنترول، وزيادة النشاط النسبي لإنزيم الأميليز في وجود أيون الكالسيوم بتركيز 5 ملليمول يمكن أن يعزي إلي أن أيون الكالسيوم يعتبر من المنشطات المعدنية لهذا الإنزيم .

**ثانياً: دراسة الظروف المثلي لإنتاج ونشاط إنزيم البروتييز**

أظهرت النتائج مقدرة *Bacillus licheniformis* علي إنتاج إنزيم البروتييز حيث شوهد هالات شفافة حول مستعمرات هذه البكتريا علي أطباق بتري التي تحتوي علي بيئة اللبن الفرز المضاف لها الكازين.

وعند دراسة الظروف البيئية التي تؤثر علي إنتاجية إنزيم البروتييز أوضحت النتائج أن أعلي إنتاجية (15.72 ميكرومول/دقيقة) للإنزيم قد لوحظت عندما كانت درجة حموضة بيئة التخمير 8.5 بينما أقل إنتاجية للإنزيم لوحظت عندما كانت درجة حموضة بيئة إنتاج الإنزيم 6.5، كذلك أوضحت النتائج أنه عند تلقيح البيئة بمعدل 100 ميكروليتر/ملليتر تم الحصول علي أعلي إنتاجية من إنزيم البروتييز (16.12 ميكرومول/دقيقة) في حين أنه عند تلقيح البيئة بمعدل 10 ميكروليتر/ملليتر لوحظ أقل إنتاجية من الإنزيم.

وبخصوص تأثير فترة التحضين علي إنتاجية الإنزيم فقد أوضحت النتائج أن إنتاج الإنزيم قد زاد بزيادة فترة التحضين، حيث لوحظ أعلي إنتاجية للإنزيم (17.91ميكرومول/دقيقة) عندما كانت فترة التحضين 72 ساعة بينما أوضحت النتائج أن أقل كمية من الإنزيم الناتج قد لوحظت عندما كانت فترة التحضين 120 ساعة ، وعند دراسة تأثير طريقة التنمية لإنتاج إنزيم البروتييز وجد أن طريقة الرج أعطت إنتاجية أعلي من إنزيم البروتييز بالمقارنة بإنتاج الإنزيم تحت ظروف المزرعة الثابتة (بدون رج).

وعند دراسة تأثير درجة حرارة التحضين علي إنتاج إنزيم البروتييز فقد أوضحت النتائج أن إنتاج الإنزيم قد زاد بارتفاع درجة حرارة التحضين ولقد تم الحصول علي أعلي إنتاجية من الإنزيم ( 37.04 ميكرومول/دقيقة) عندما كانت درجة حرارة التحضين 37 درجة مئوية في حين أوضحت النتائج أن أقل كمية من الإنزيم الناتج قد لوحظت عندما كانت درجة حرارة التحضين 42 درجة مئوية .

وعند دراسة تأثير مصادر الكربون والنيتروجين علي إنتاج إنزيم البروتييز بواسطة بكتريا الباسيليس ليتشينوفورميس فقد أظهرت نتائج الدراسة أن أفضل مصدر للكربون والنيتروجين لإنتاج الإنزيم هما المالتوز والتربتون علي التوالي.

وعند إنتاج إنزيم البروتييز بإستخدام الظروف المثلي سواء البيئة أو الغذائية والتي تم الحصول عليها في التجارب السابقة في هذه الدراسة فقد لوحظ زيادة في إنتاج الإنزيم بمقدار 2.71 مرة وذلك بالمقارنة بإستخدام كل عامل منفرداً، وزيادة إنتاجية إنزيم البروتيز تحت الظروف المثلي كانت متوقعة حيث تم توفير ظروف الإنتاج المثلي للميكروب المنتج.ولقد أوضحت النتائج أن نشاط إنزيم البروتييز ومحتواه من البروتين ونشاطه النوعي كانت 426.2 ميكرومول/ دقيقة، 84.5 مللجرام/ملليليتر، 5.04 ميكرومول/ملليجرام بروتين علي التوالي.وعند دراسة العوامل التي تؤثر علي نشاط إنزيم البروتييز فقد أوضحت النتائج أن نشاط الإنزيم قد زاد بزيادة درجة الحرارة حيث لوحظ أعلي نشاط للإنزيم (100%) عند درجة 70 درجة مئوية، بينما أوضحت النتائج أن أقل نشاط للإنزيم لوحظ عند درجة حرارة 30 درجة مئوية.وفي ضوء النتائج المتحصل عليها فإنه يجب أن نشير إلي أن إنزيم البروتييز قد ظل محتفظاً بنشاطه النسبي بنسبة 69.22 و 47.95 % وذلك عند تحضين الإنزيم الخام علي درجة حرارة 75 و 80 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة علي التوالي، ولذلك يمكن إستخدام إنزيم البروتييز الناتج بواسطة *B. Licheniformis* في صناعة المنظفات ودباغة الجلود. وفيما يخص تأثير تركيز الأس الهيدروجيني علي نشاط إنزيم البروتييز فقد أظهرت النتائج المتحصل عليها أن نشاط الإنزيم قد زاد بزيادة تركيز الأس الهيدروجيني حيث لوحظ أعلي نشاط للإنزيم (100%) عند تركيز أس هيدروجيني 8، بينما أوضحت النتائج أن نشاط الإنزيم قد قل تدريجياً بإرتفاع تركيز الأس الهيدروجيني حيث شوهد أقل نشاط للإنزيم (25.8%) عند تركيز أس هيدروجيني 5. ويجب أن نشير إلي أن الإنزيم ظل محتفظاً بنشاطه بنسبة 74.9 و 68.3% علي درجة أس هيدروجيني 8.5 و9 علي التوالي وذلك بعد تحضين الإنزيم الخام علي درجة حرارة 70 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة، وبالإضافه إلي ذلك فقد أوضحت النتائج أن نشاط إنزيم البروتييز قد زاد بزيادة تركيز مادة التفاعل( الكازين) حيث وصل إلي أقصاه عند استخدام الكازين بنسبة 3.2% (32 جرام/ لتر بيئة)، أيضا أوضحت النتائج أن سرعة نشاط الإنزيم قد زادت بزيادة تركيز مادة التفاعل.

وبخصوص حركيات نشاط إنزيم البروتييز الذي تم إنتاجة في هذا البحث بواسطة بكتيريا الباسليليس ليتشينوفورميس فقد أظهرت النتائج أن السرعة القصوي لإنزيم البروتييز في وجود تركيزات مختلفة من الكازين كمادة تفاعل والتي تراوحت من 0.4 الي 4 % كانت قيمتها 36.7 ميكرومول/دقيقة، بينما وجد أن قيمة ثابت ميكاليس-منتن تساوي 1.4ملليليتر/100 مللي والتي تم الحصول عليها عند تركيز مادة التفاعل وعند نصف السرعة القصوي باستخدام منحني التشبع بمادة التفاعل (الكازين) .

كذلك تم تقدير السرعة القصوي وثابت ميكاليس- منتن بواسطة معادلة Lineweaver -Burk plots عند رسم العلاقة البيانية بين كلا من 1/Vo و 1/S، حيث أن ميل هذا الخط يمثل قيمة ثابت ميكاليس- منتين/السرعة القصوي والتي كانت قيمتها 0.0381 أيضا أظهرت النتائج أن قيمة 1/ السرعة القصوي تساوي 0.027 بينما كانت قيمة 1/ ثابت ميكاليس – منتين تساوي 0.714، وعند تقدير السرعة القصوي للإنزيم وثابت ميكاليس- منتن للإنزيم باستخدام معادلة Lineweaver -Burk plots يمكن القول بأن قيمة السرعة القصوي للإنزيم وثابت ميكاليس- منتن مساوية تقريباً للقيم التي تم الحصول عليها عند تقديرهما باستخدام منحني التشبع لمادة التفاعل (الكازين) . وعند دراسة تأثير كلوريد الصوديوم علي نشاط إنزيم البروتييز أوضحت النتائج أن نشاط الإنزيم قد زاد تدريجياً بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم حيث وصل النشاط إلي أقصاه عند تركيز 2% وقل بعد ذلك، في حين أوضحت النتائج أن نشاط الإنزيم كان منخفضاً عند التركيزات العالية من كلوريد الصوديوم بالمقارنة بالتركيزات المنخفضة .وعند دراسة تأثير الأيونات المعدنية علي نشاط إنزيم البروتييز أوضحت النتائج أن النشاط النسبي للإنزيم كان عالياً عند تركيز 1 ملليمول من كلاً من (الحديديك والنحاسوز) وذلك بالمقارنة بنشاط الإنزيم عند استخدام الأيونات المعدنية سابقة الذكر بتركيز 5 ملليمول وأيضا عند استخدام الأيونات المعدانية (الكالسيوم، النيكل ، المنجنيز) لوحظ زيادة النشاط النسبي لإنزيم عند تركيز 5 ملليمول مقارنة بتركيز 1 ملليمول. كذلك أظهرت الننتائج أن أيونات الحديديك والكالسيوم والمنجنيز عند تركيز 1 ملليمول أدت الي زيادة النشاط النسبي لإنزيم البروتييز بمقدار 11.6 و 33.78 و 6.43 % علي التوالي بالمقارنة بمعاملة الكنترول، وعند دراسة النشاط النسبي لإنزيم البروتيز باستخدام الأيونات المعدنية لكل من النحاسوز والنيكل بتركيز1 ملليمول أوضحت النتائج أن الإنزيم ظل محتفظا بنشاطة بنسبة 93.36 و 68.59 % علي التوالي. وعند دراسة النشاط النسبي لإنزيم البروتييز باستخدام الأيونات المعدنية لكل من الكالسيوم ، النيكل والمنجنيز بتركيز5 ملليمول لوحظ زيادة نشاط بنسبة 39 و 11.7 و 28.92 % مع كلاً من الكالسيوم، النيكل والمنجنيز علي التوالي بالمقارنة بالكنترول. أيضاً أوضحت النتائج أن الإنزيم ظل محتفظاً بنشاطة النسبي عند تركيز 5 ملليمول بإستخدام أيونات الحديديك والنحاسوز بنسبة 79.37 و 64.85 % علي التوالي.

**الخلاصة والتوصيات**

في ضوء نتائج هذه الدراسة، يمكن التوصية بأن أنواع البكتريا التي تتبع جنس *Bacillus* مثل *,B.amyloliquefaciens* *Bacillus licheniformis* يمكن استخدامها لإنتاج الإنزيمات الميكروبية مثل الأميليز والبروتينيز. ولقد أوضحت النتائج أن نشاط هذه الانزيمات ثابت تحت درجات الحرارة العالية والمعادن المختلفة. وبالتالى فإنه من الجدير بالذكر أن نوصى بإستخدام هذه الإنزيمات للأغراض الصناعية وبالأخص المنظفات وإزالة البقع والخبز وكذلك التغذية الحيوانية.