الجمهوريـة الجزائريــة الديموقراطيـة الشعبيــة
وزارة التعليــم العالــي والبحث العلمــي
المدرسة العليا لأساتذة التعليم التكنولوجي بسكيكدة
قســـم التــكنــولــوجيــا
تخصص هندسـة الطرائـق

مذكرة التخرج لنيل شهادة أستاذ التعليم الثانوي

تطبيق تصميم تجريبي لاستخلاص الإنزيمات الهضمية من أمعاء الدواجن وتقييم فعاليتها في التنظيف

من إعداد:

- حرقاس ريم
- بتيش مريم

لجنة المناقشة:

كرايم خير الدين	أستاذ محاضر-أ-	رئيسا	م.ع.أ.ت.ت.سكيكدة
سايحي يوسف	أستاذ محاضر-أ-	مشرفا	م.ع.أ.ت.ت.سكيكدة
مامين هاجر	أستاذ محاضر-أ-	ممتحنا	م.ع.أ.ت.ت.سكيكدة

السنة الجامعية:

2025-2024

الملخص

Abstract

الملخص

يهدف عملنا، من خلال هذه المذكرة، إلى استخلاص وتقييم فعالية الأنزيمات الهضمية المستخلصة من أمعاء الدجاج، بغرض استخدامها في التطبيقات الصناعية الصديقة للبيئة، خاصة في مجال صناعة المنظفات البيولوجية.

فقد تم استخلاص الأنزيمات من نفايات أمعاء الدجاج باستخدام محلول منظم فوسفاتي وترسيبها بكبريتات الأمونيوم، ثم تحديد الشروط المثلى للاستخلاص من خلال تصميم تجريبي من نوع "مخطط عاملي كامل"، بدراسة تأثير كل من الزمن ودرجة الحموضة pH على كفاءة الاستخلاص. أظهرت النتائج أن أفضل مردود تم الحصول عليه عند pH = 8 وزمن 60 دقيقة.

بعد ذلك، تم تقييم القدرة التنظيفية للأنزيمات المستخلصة عبر دمجها في تركيبة منظف سائل، واختبارها على أقمشة قطنية ملطخة ببقع عضوية (دم، شوكولاتة، زيت). وقد بينت نتائج التحليل البصري والرقمي (باستخدام برنامج ImageJ أن إضافة الأنزيمات حسّنت بشكل واضح من كفاءة إزالة البقع مقارنة بالمنظف العادي أو الماء فقط.

تُبرز هذه الدراسة أهمية تثمين النفايات الحيوية (مثل أحشاء الدواجن) كمصدر فعال للأنزيمات، مما يفتح آفاقًا واعدة في مجال الاقتصاد التدويري والتنمية المستدامة.

الكلمات المفتاحية: إنزيمات هضمية، أمعاء الدجاج، استخلاص، كبريتات الأمونيوم، تنظيف.

Abstract

The aim of this study, as presented in this thesis, is to extract and evaluate the effectiveness of digestive enzymes obtained from chicken intestines, with the goal of using them in eco-friendly industrial applications, particularly in the development of biological detergents.

The enzymes were extracted from chicken intestine waste using a phosphate buffer solution and precipitated with ammonium sulfate. Optimal extraction conditions were determined using a full factorial experimental design, evaluating the effect of both extraction time and pH on the yield. Results showed that the best extraction efficiency was achieved at pH = 8 and 60 minutes of extraction time.

Subsequently, the cleaning power of the extracted enzymes was evaluated by incorporating them into a liquid detergent formulation and testing them on cotton fabrics stained with organic substances (blood, chocolate, and oil). Visual and digital analysis results (using ImageJ software) demonstrated that the addition of enzymes significantly improved stain removal efficiency compared to the standard detergent or water alone.

This study highlights the importance of valorizing bio-waste (such as poultry viscera) as an effective source of enzymes, opening promising avenues in economy and sustainable development.

Keywords: Digestive enzymes, chicken intestines, extraction, ammonium sulfate, cleaning.

إهداء

الحمد لله أولاً وأخيرًا، الذي بنعمته تتمّ الصالحات، وبتوفيقه أنجز هذا العمل.

إلى والدتي العزيزة " بوعلاق عبلة"، يا من كانت دعواتكِ رفيقتي في كل خطوة، وحنانكِ البلسم في لحظات التعب، لكِ مني كل الشكر والحب والتقدير.

إلى والدي الكريم "بتيش توفيق"، منك تعلّمت الإصرار والعمل الجاد، ومنك استمددت القوة والثقة... جزاك الله عني كل خير، وشكرًا على كل ما قدمته لي.

إلى إخوتي" أنس و عبد الرحمان"، كنتم السند الحقيقي والداعم الصامت في كل مرحلة، شكرًا لكم من القلب.

إلى عائلتي الكريمة كل باسمه، شكرًا على محبتكم، ودعواتكم، وكل لحظة طمأنينة منحتموني إياها طوال هذا المشوار.

إلى صديقاتي الغاليات، اللواتي كنّ بجانبي في لحظات الجد والتعب، وفي أوقات الفرح والبسمة، شكرًا لكنّ على الصداقة الصادقة، والدعم الصافي، والذكريات الجميلة التي لا تُنسى.

مريم

إهداء

إلى أمي ، ملاذي الآمن وسكني الروحي، التي كان لوجودها أثر الطمأنينة في قلبي، ولحنانها وقع السكينة في حياتي، والتي كانت دعاواتها تلازمني وقت الضيق والفرج، كل الكلمات لن توفيكِ حقكِ يا أمي.

"نادية حرقاس"

وإلى أبي، منقذي في كل ضيق، وركني الثابت الذي ما خذلني يومًا، كان يجد السبيل حين تضيع السبل، ويزرع الطمأنينة حين يعمّ القلق.

"كريم"

إلى أخي العزيز، الذي كان سندًا صامتًا يشدّ من أزري في كل حين.

"عصام الدين"

إلى قريباتي وصديقاتي كل باسمها، اللواتي كنّ خير معين، ورفيقات الدرب في مسيرة العلم والحياة.

وإلى عائلتي كافة، الذين أحاطوني بالمحبة والدعاء.

أهدي هذا العمل المتواضع تعبيرًا عن شكري ووفائي وامتناني العميق.

ريم

شكر وعرفان

قال الله تعالى:

"رَبِّ أَوْزِعْنِي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ الَّتِي أَنْعَمْتَ عَلَيَّ وَعَلَىٰ وَالِدَيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَالِحًا تَرْضَاهُ وَأَدْخِلْنِي بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ"

سورة النمل، الآية 19.

نتقدم أولاً بالحمد والشكر لله عزّ وجل، الذي ألهمنا الصبر والعزيمة، ووفقنا لإتمام هذا العمل المتواضع، سائلين إياه القبول والتوفيق في مستقبل خطواتنا.

كما نخصّ بالشكر والعرفان أستاذنا الفاضل سايحي يوسف، الذي لم يبخل علينا بتوجيهاته السديدة وملاحظاته القيّمة، وكان لنا خير مشرف وداعم طوال مراحل إنجاز هذا العمل. فله منا كل التقدير والامتنان، جزاه الله خير الجزاء.

وكذا أعضاء لجنة المناقشة لتفضلهم بقبول مناقشة هذا العمل، أستاذينا الكريمين الأستاذ كرايم خير الدين والأستاذة مامين هاجر فإضافة إلى ذلك قد كان لنا شرف كوننا طالباتكما يوما ما.

ولا يسعنا في هذا المقام إلا أن نرفع أسمى آيات الشكر والعرفان إلى جميع الأساتذة الذين كان لهم الفضل في تعليمنا وتكويننا، منذ المراحل الابتدائية وحتى وصولنا إلى مقاعد الجامعة.

كما نعبر عن خالص شكرنا وامتناننا للسيد رحموني صالح، رئيس قسم التكنولوجيا، لما أبداه من حسن التعامل والدعم المتواصل، فله منا كل التقدير والاحترام.

اختصارات

جداول

أشكال

قائمة الإختصارات

- AMP : Adenosine Monophosphate.
- ATP : Adenosine Triphosphate.
- ATPS : Aqueous Two-Phase System.
- BSA : Bovine Serum Albumin.
- DTT : Dithiothreitol.
- E: Enzyme
- EC : Enzyme Commission.
- EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid.
- ES: Enzyme-Substrate complex
- HDL : High-Density Lipoprotein.
- HEPES: (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) .
- IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.
- Kcat: catalyzed rate constant
- Kuncat: catalyzed rate constant
- LDL : Low-Density Lipoprotein.
- LED : Light Emitting Diode.
- OMP : Orotidine Monophosphate.
- PBS : Phosphate-Buffered Saline.
- PEG : Polyethylene glycol.
- pH : Potential of Hydrogen.
- pKa : negative logarithm of the acid dissociation constant.
- rmp : Revolution Per Minute.
- S: substrate
- TPP :Three-Phase Partitioning.
- Tris-HCl : Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride.
- UV-Vis: Ultraviolet-Visible Spectroscopy.
- VLDL : Very Low-Density Lipoprotein.

الجزء النظري

الفصل الأول: نظرة عامة حول اللإنزيمات الهاضمة

الجدول 1	دور الإنزيمات في تسريع التفاعلات الكيميائية.	6
الجدول 2	أهم التطبيقات الصناعية للأميلاز.	13
الجدول 3	أهم التطبيقات الصناعية لإنزيمات الليباز.	15
الجدول 4	المقارنة بين المصادر المختلفة للإنزيمات الهضمية.	17

الجزء العملي

الفصل الثالث: المواد والأدوات المستعملة

الجدول 1	بطاقة تعريفية لفوسفات أحادي الصوديوم.	36
الجدول 2	بطاقة تعريفية لفوسفات ثنائي الصوديوم.	37
الجدول 3	بطاقة تعريفية لهيدروكسيد الصوديوم.	39
الجدول 4	بطاقة تعريفية لهيدروكسيد الصوديوم.	40
الجدول 5	الخصائص الفيزيوكيميائية لكبريتات الأمونيوم.	41
الجدول 6	الخصائص الفيزيوكيميائية ليوديد البوتاسيوم.	42
الجدول 7	الخصائص الفيزيوكيميائية لكبريتات النحاس المميهة.	42
الجدول 8	تركيبة سلسلة المعايرة للإنزيمات باستخدام كاشف بيوريت.	50
الجدول 9	الجدول يمثل التغير في قيم الـ pH و زمن الإستخلاص.	52

الفصل الرابع: عرض النتائج ومناقشتها.

الجدول 1	نتائج استخلاص الأنزيمات لمختلف التجارب المبرمجة حسب مخطط التجربة المستخدم.	57
الجدول 2	معاملات وأفعال تأثير الزمن والأس الهيدروجيني على استخلاص الإنزيمات.	59
الجدول 3	نتائج المقارنة المباشرة لعملية تنظيف البقع.	61
الجدول 4	نتائج تقييم الكفاءة التنظيفية بطريقة التحليل الرقمي لصور العينات.	67

الجزء النظري

الفصل الأول: نظرة عامة حول اللإنزيمات الهاضمة.

الشكل 01	مكونات الإنزيمات.	4
الشكل 02	بنية الإنزيم.	5
الشكل 03	تأثير تركيز الإنزيم على سرعة التفاعل.	6
الشكل 04	معادلة التفاعل الإنزيمي.	7
الشكل 05	تأثير تركيز الركيزة على سرعة التفاعل الإنزيمي.	7
الشكل 06	تأثير درجة الحرارة على السرعة.	8
الشكل 07	تأثير الأس الهيدروجيني على سرعة الإنزيم.	8
الشكل 08	التثبيط الغير عكسي.	9
الشكل 09	عمل إنزيمات الأكسدة والإرجاع.	10
الشكل 10	عمل الإنزيمات الناقلة.	10
الشكل 11	إنزيمات التحلل المائي.	10
الشكل 12	عمل إنزيمات التماكب.	11
الشكل 13	عمل إنزيمات الربط.	11

الفصل الثاني: عموميات حول تقنيات تنقية واستخلاص الانزيمات .

الشكل 01	جهاز المطاحن الكروية.	23
الشكل 02	جهاز التجانس الدوار الثابت.	23
الشكل 03	جهاز الموجات الفوق صوتية.	24
الشكل 04	خلية الترشيح الفائق.	29
الشكل 05	كروماتوغرافيا التبادل الايوني.	30
الشكل 06	كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي.	31

الجزء العملي

الفصل الثالث: المواد والأدوات المستعملة.

الشكل 01	الصيغة الكيميائية لفوسفات أحادي الصوديوم وحالته الفيزيائية.	36
الشكل 02	الصيغة الكيميائية والحالة الفيزيائية لفوسفات ثنائي الصوديوم.	37

الشكل 03	الصيغة الكيميائية لهيدروكسيد الصوديوم وحالته الفيزيائية.	38
الشكل 04	الصيغة الكيميائية والحالة الفيزيائية لطرطرات الصوديوم والبوتاسيوم.	40
الشكل 05	الصيغة الكيميائية والحالة الفيزيائية لكبريتات الأمونيوم.	41
الشكل 06	الحالة الفيزيائية ليوديد البوتاسيوم.	41
الشكل 07	الصيغة الكيميائية والحالة الفيزيائية لكبريتات النحاس المميهة.	42
الشكل 08	أمعاء الدجاج.	43
الشكل 09	جهاز محاكاة الغسالة (خلاط ميكانيكي).	44
الشكل 10	جهاز طحن وتجانس (مفرمة البصل).	45
الشكل 11	جهاز الـpH متر.	46
الشكل 12	جهاز مطيافية UV-Vis.	47
الشكل 13	جهاز الطرد المركزي.	47
الشكل 14	غرفة للتصوير مجهز ة بمصباح ليد.	48
الشكل 15	الكاميرا المستعملة للهاتف الذكي (iPhone XR).	48
الشكل 16	عينة قماش القطن بأبعاد متساوية(7سم×7سم).	49
الشكل 17	منحنى المعايرة.	51
الشكل 18	الإنزيمات الناتجة عن الترسيب.	52
الشكل 19	عينات من قطع قماش القطن الملطخة بمختلف أنواع الملوثات.	53
الشكل 20	مخطط ملخص العمل المخبري.	54

الفصل الرابع: عرض النتائج ومناقشتها.

الشكل 01	نطاق تغير العامل المؤثر محصور بين المستوى المنخفض (-1) والمستوى العالي (+1)	58
الشكل 02	تأثير الزمن والأس الهيدروجيني على استخلاص الإنزيمات.	59
الشكل 03	صور لعينات القماش الملطخة ببقع الدم قبل وبعد التنظيف.	61
الشكل 04	صور لعينات القماش الملطخة ببقع الشوكولاتة قبل وبعد التنظيف.	62
الشكل 05	صور لعينات القماش الملطخة ببقع زيت جوز الهند قبل وبعد التنظيف.	63
الشكل 06	مخططات توزع اللون لعينات القماش الملطخة ببقع الدم قبل وبعد التنظيف.	64
الشكل 07	مخططات توزع اللون لعينات القماش الملطخة ببقع الشوكولاطة قبل وبعد التنظيف.	65

الشكل 08 مخططات توزع اللون لعينات القماش الملطخة ببقع زيت جوز الهند قبل وبعد التنظيف. 66

الفهرس

الملخص

قائمة المختصرات

قائمة الجداول

قائمة الأشكال

الفهرس I

مقدمة عامة 1

الجزء الأول: الجزء النظري

الفصل الأول: نظرة عامة حول الإنزيمات الهاضمة

1.مقدمة 4

2. تعريف الإنزيمات 4

3.مكونات الإنزيمات 4

4. بنية الإنزيمات 5

5. النشاط التحفيزي للإنزيمات 5

6. العوامل المؤثرة على النشاط الإنزيمي 6

1.6.تركيز الإنزيم 6

2.6.تأثير تركيز المادة الأساس 7

3.6.تأثير درجة الحرارة 7

4.6.تأثير الأس الهيدروجيني pH 8

5.6.المثبطات 9

أ.المثبطات العكسية Reversible inhibitors 9

ب.المثبطات الغير عكسية Irreversible inhibition 9

7. تصنيف الإنزيمات وفقًا للجنة الدولية للإنزيمات (EC Classification) 9

1.7. إنزيمات الأكسدة والإرجاع oxidoreductases 10

2.7. الإنزيمات الناقلة transferases 10

3.7. إنزيمات التحلل المائي Hydrolases 10

4.7. إنزيمات الإضافة أو الحذف Lyases 11

5.7. إنزيمات التماكب isomerases 11

الفهرس

6.7. إنزيمات الربط Ligases	11
8. الإنزيمات الهضمية	11
1.8. البروتياز Proteases	11
1.1.8. أنواع البروتياز	12
أ.التربسين (Trypsin)	12
ب. الببسين (Pepsin)	12
ج. الكيموتريبسين (Chymotrypsin)	12
2.1.8.التطبيقات الصناعية للبروتياز	12
2.8. الأميلاز (Amylase)	13
1.2.8. الوظيفة الرئيسية للأميلاز	13
2.2.8.المصادر الرئيسية للأميلاز	13
أ. الأميلاز اللعابي (Salivary Amylase أو Ptyalin)	13
ب. الأميلاز البنكرياسي (Pancreatic Amylase)	13
ج. الأميلاز الميكروبي (Bacterial & Fungal Amylase)	13
3.2.8.التطبيقات الصناعية للأميلاز	13
3.8. الليباز (Lipases)	14
1.3.8. الوظيفة الرئيسية لإنزيمات الليباز	14
2.3.8. أنواع الليباز	14
أ. الليباز البنكرياسي (Pancreatic Lipase)	14
ب. الليباز الكبدي (Hepatic Lipase)	14
ج. الليباز الميكروبي (Microbial Lipase)	15
3.3.8. التطبيقات الصناعية لإنزيمات الليباز	15
9. مصادر الإنزيمات الهضمية في الكائنات الحية	15
1.9. الكائنات الدقيقة (البكتيريا والفطريات)	15
2.9. النباتات	16
3.9. الحيوانات	16
4.9. المقارنة بين مختلف مصادر الإنزيمات الهضمية	17
10.حوصلة	18
المراجع	19

الفصل الثاني: عموميات حول تقنيات تنقية واستخلاص الانزيمات.

1.المقدمة 22
2.طرق استخلاص الانزيمات 22
1.2. الاستخلاص الفيزيائي 22
1.1.2. التكسير الميكانيكي 22
1.1.1.2.تقنيات التكسير الميكانيكي 22
أ. الطحن باستخدام المطاحن الكروية (Ball Mill) 22
ب. الضغط العالي (French Press) 23
ج. جهاز التجانس الدوّار الثابت (Rotor-Stator Homogenizer) 23
2.1.2 . الموجات الفوق صوتية(ultra_sonicator) 24
1.2.1.2.آلية العمل وتأثيرها على الخلايا 24
2.2.1.2.المزايا مقارنة بالطرق التقليدية 24
3.1.2. الطرد المركزي(centrifugation) 25
2.2.الاستخلاص الكيميائي 25
1.2.2. المحاليل المنظمة (buffer solution) 25
2.2.2.المذيبات العضوية 26
3.2.2.إضافة المواد المتبثة للانزيمات 27
1.3.2.2.المواد المثبتة الشائعة واستخداماتها 27
أ. السكريات (مثل التريهالوز، السكروز) 27
ب. البولي إيثيلين جلايكول (PEG) 28
ج. ألبومين مصل البقر (BSA) 28
3.تقنيات تنقية و تركيز الانزيمات 28
1.3.الترشيح الفائق (ultrafiltration) 28
2.3.التبادل الايوني ((Ion exchange chromatography 29
3.3.الترسيب بالملح 30
4.3.الترشيح الهلامي (gel filtration chromatography) 30
5.حوصلة 31
المراجع 33

الجزء الثاني: الجزء العملي

الفصل الثالث: المواد والأدوات المستعملة

1.المواد والأدوات المستعملة 36
1.1.المواد المستعملة 36
2.1.الأدوات والأجهزة المستعملة 43
2.تحضير المحاليل 49
3. تحضير الأقمشة 52
4. خطوات الغسيل 53
5.طريقة تقييم القدرة التنظيفية 53
المراجع 55

الفصل الرابع: عرض النتائج ومناقشتها.

1.المقدمة 57
2. نتائج تأثير الزمن والأس الهيدروجيني على استخلاص الإنزيمات 57
1.2. تحليل احصائي للنتائج 69
2.2. تأثير الزمن وpH 60
3. نتائج وتقييم القدرة التنظيفية للأنزيمات 60
1.3. نتائج التنظيف 67
4.خاتمة 68

خاتمة عامة 70

مقدمة عامة

مع تزايد التحديات البيئية والاقتصادية التي تواجه العالم، أصبح من الضروري التوجه نحو استغلال الموارد الطبيعية بشكل أكثر عقلانية، مع التركيز على إعادة تدوير النفايات وتحويلها إلى مواد ذات قيمة مضافة. ومن بين هذه الموارد الواعدة، تبرز النفايات الحيوانية كمصدر غني بالمركبات البيولوجية الفعالة، وعلى رأسها الأنزيمات الهضمية، التي تلعب دورًا جوهريًا في عدة تطبيقات صناعية وزراعية وبيئية.

تُعتبر الأنزيمات الهضمية، مثل البروتياز والليباز، من العوامل البيوكيميائية المهمة التي تساهم في تحلل المركبات العضوية المعقدة إلى وحدات أبسط، مما يفتح المجال لاستعمالها في مجالات متنوعة، من أبرزها صناعة المنظفات البيولوجية، التي تعتمد بشكل متزايد على الأنزيمات نظرا لكفاءتها العالية وصِفتها الصديقة للبيئة مقارنة بالمواد الكيميائية التقليدية.

من هذا المنطلق، جاءت هذه المذكرة لتُسلّط الضوء على إمكانية استخلاص أنزيمات هضمية فعالة انطلاقًا من نفايات أمعاء الدجاج، والتي تُعد من المخلفات الحيوانية الغنية بالبروتينات والأنزيمات الطبيعية. يتمثل الهدف الأساسي في استخلاص هذه الأنزيمات بطريقة فعالة، ثم تقييم أدائها في تنظيف البقع العضوية الصعبة، مما يبرز فائدتها الصناعية في تطوير منظفات طبيعية وأكثر أمانًا للبيئة والإنسان.

من خلال هذا العمل، نسعى إلى إبراز القيمة العلمية والتطبيقية للنفايات الحيوية، وتأكيد أهمية الأنزيمات الهضمية كمكوّن واعد في صناعة المنظفات البيولوجية، بما يساهم في التوجه نحو حلول صناعية مبتكرة ومستدامة. ولتحقيق هذا الهدف، تم تقسيم العمل إلى جزئين رئيسيين:

الجزء النظري، والذي يحتوي على فصلين:

الفصل الأول، بعنوان: نظرة عامة حول الإنزيمات الهاضمة، يتناول عموميات اساسية حول الأنزيمات كما يتطرق إلى الجانب المفاهيمي المرتبط بالأنزيمات الهضمية، من حيث أنواعها، مصادرها، آلية عملها، وتطبيقاتها الصناعية.

نتطرق في الفصل الثاني، بعنوان: عموميات على تقنيات استخلاص وتنقية الانزيمات، إلى استعراض مختلف تقنيات استخلاص وتنقية الأنزيمات المعتمدة في الأدبيات العلمية مع ذكر إيجابيات وسلبيات كل تقنية.

أما الجزء التطبيقي، الذي ينقسم بدوره إلى فصلين إثنين:

في الفصل الأول، بعنوان: المواد والأدوات المستعملة، تم عرض أهم المواد، التجهيزات والأدوات اللازمة لتجسيد العمل التطبيقي، كما تم ذكر مختلف البروتوكولات التجريبية التي قمنا بها خلال عملنا.

أما الفصل الثاني، بعنوان: عرض النتائج ومناقشتها، فقد تم فيه تنفيذ خطوات عملية لاستخلاص الأنزيمات من أمعاء الدجاج باستخدام تقنية الترسيب بكبريتات الأمونيوم، مع دراسة تأثير بعض العوامل من درجة

الحموضة pH وزمن الاستخلاص وفق تصميم تجريبي مدروس. كما تم اختبار فعالية الأنزيمات المستخلصة بعد إضافتها إلى منظف سائل، وذلك من خلال تنظيف بقع عضوية مختلفة من على أقمشة قطنية، مع تقييم النتائج باستخدام تقنيات تحليل الصورة الرقمية (ImageJ).

في الأخير ننهي مذكرتنا بخاتمة عامة نلخص فيها نتائج الدراسة ونعرض من خلالها أهم التطلعات والآفاق المرجوة في المستقبل.

الفصل الأول

نظرة عامة حول الإنزيمات الهاضمة

1. المقدمة

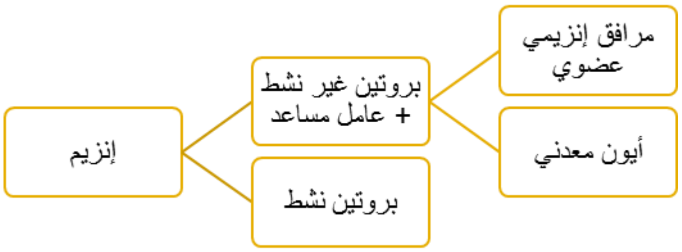
الإنزيمات هي جزيئات بروتينية تعمل كمحفزات حيوية تسرع التفاعلات الكيميائية داخل الكائنات الحية دون أن تستهلك في العملية. وتلعب دورا أساسيا في العديد من العمليات الحيوية، لذا يهدف هذا الجزء إلى تسليط الضوء على المفاهيم الأساسية المتعلقة بالإنزيمات، من حيث تعريفها وآلية عملها، إلى جانب العوامل المؤثرة في نشاطها. كما سيتم التركيز على فئة الإنزيمات الهضمية، بما في ذلك الأميلاز، الليباز، والبروتياز، نظرًا لوظائفها الحيوية في تفكيك المركبات الغذائية، ما يُعدّ أساسًا نظريًا لاختيار مصادر طبيعية بديلة غنية بها في الأبحاث التطبيقية.

2. تعريف الإنزيمات

الإنزيمات هي عبارة عن مواد بروتينية يزيد عددها عن أكثر من 1500 إنزيم تتكون بواسطة خلايا الكائن الحي وتعمل كعوامل مساعدة للتفاعلات التي تحدث في الخلايا، كما أنها تدخل في تسريع التفاعلات، بقدر10^6 إلى 10^{11} مرة مقارنة بالشروط العادية. وكذلك تعمل في أنسجة الجسم عند درجة حرارة 37°مئوية، ودرجة حموضة مماثلة لدرجة حموضة العضو. ويتراوح عدد الأحماض الأمينية التي تدخل في تركيبها من 100 إلى 10000 وحدة حمض أميني [1،2].

3. مكونات الإنزيمات

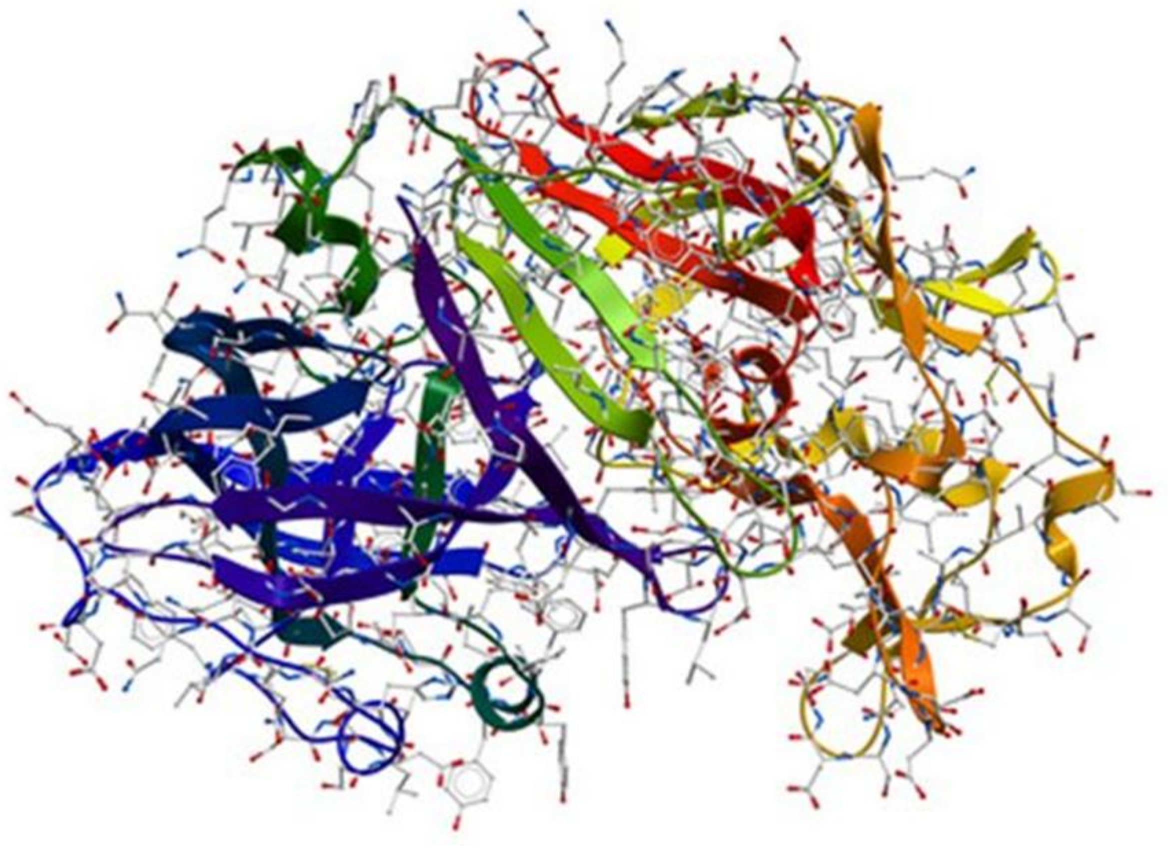
كل إنزيم يتميز بخصائص محددة، حيث يعمل على ركيزة أو ركائز (المواد المتفاعلة في التفاعلات المحفزة بالإنزيمات) معينة لإنتاج منتج أو منتجات معينة. جميع الإنزيمات هي بروتينات. ومع ذلك، بدون وجود مكون غير بروتيني يسمى العامل المساعد(cofactor)، تفتقر العديد من بروتينات الإنزيم إلى النشاط التحفيزي (catalytic activity). عندما يكون هذا هو الحال، يُطلق على المكون البروتيني غير النشط للإنزيم اسم الأبوإنزيم (apoenzyme)، وعلى الإنزيم النشط، بما في ذلك العامل المساعد، اسم الهولوإنزيم (holoenzyme). قد يكون العامل المساعد جزيئًا عضويًا، عندها يُعرف باسم مرافق إنزيمي عضوي (coenzyme)، أو قد يكون أيونًا معدنيًا (cofactor). بعض الإنزيمات ترتبط بالعوامل المساعدة بشكل أكثر إحكامًا من غيرها. عندما يرتبط العامل المساعد بشكل وثيق لدرجة أنه من الصعب إزالته دون إتلاف الإنزيم، يُطلق عليه أحيانًا مجموعة مرافقة دائمة (prosthetic group) [3].



الشكل 01: مكونات الإنزيمات.

4. بنية الإنزيمات

يتألف الإنزيم من عدد كبير من الأحماض الامينية يجمع فيما بينها روابط بيبتيدية وتُكوّن هذه الأحماض الأمينية سلسلة أو أكثر من سلاسل عديدة الببتيد مشكلة له (**الشكل02**)[1].



الشكل 02: بنية الإنزيم.

5. النشاط التحفيزي للإنزيمات

الإنزيمات هي جزيئات بروتينية متخصصة تعمل كمحفزات حيوية تُسرّع التفاعلات الكيميائية التي تحدث في خلايا الكائنات الحية. فدون وجود الإنزيمات، تكون سرعة هذه التفاعلات بطيئة جدًا لدرجة أن بعضها قد يحتاج لملايين أو مليارات السنين حتى يكتمل، كما هو موضح في نصف العمر لبعض التفاعلات (بدون إنزيم) في الجدول **01**. إذ يمكن أن يحتاج تفاعل معين إلى ملايين السنين ليكتمل في غياب الإنزيم، بينما يتم خلال ثوانٍ أو دقائق بوجود الإنزيم.

يوضح الجدول مقارنة بين سرعة التفاعل الطبيعية (غير المحفزة) وسرعته بعد إضافة الإنزيم، من خلال قياس ثابت السرعة للتفاعل بدون إنزيم (k_{uncat}) وثابت السرعة مع الإنزيم (k_{cat}). كما يُظهر الجدول **01** نسبة التسريع (k_{cat}/K_{uncat}) أو الكفاءة، والتي تعكس مدى سرعة تحويل الركيزة إلى ناتج بوجود الإنزيم مقارنة بعدم وجوده، وبفضل هذه القدرة تُعد الإنزيمات عنصرًا أساسيًا لضمان حدوث التفاعلات الحيوية بشكل سريع وفعال [4].

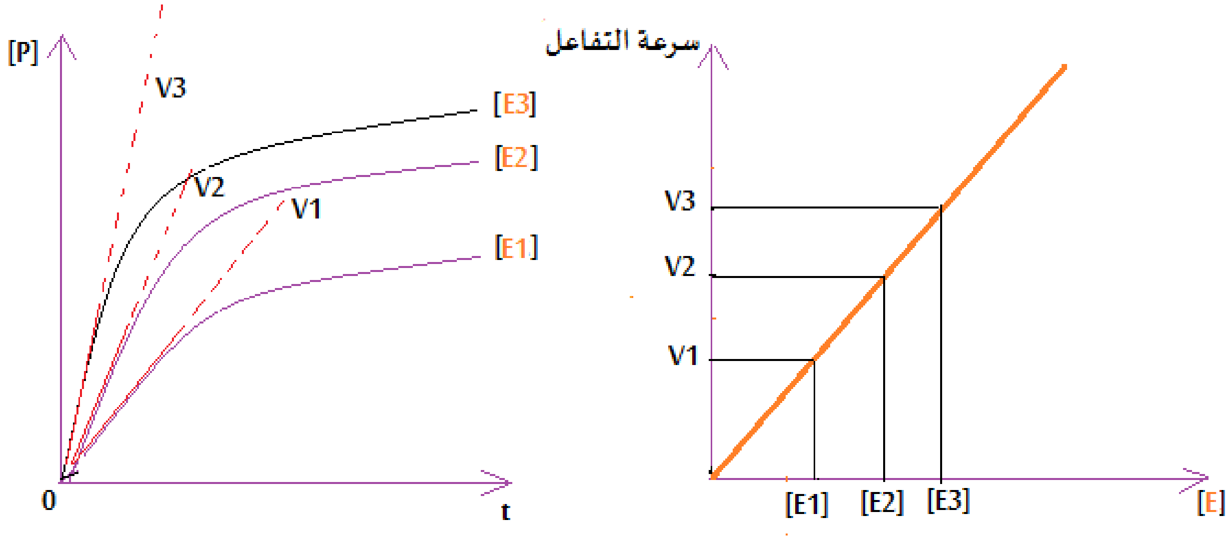
الجدول 01: دور الإنزيمات في تسريع التفاعلات الكيميائية[4].

الإنزيم	نصف العمر غير الإنزيمي	ثابت السرعة (غير محفز) K_{uncat}	ثابت السرعة K_{cat} (محفز)	كفاءة التسريع (k_{cat}/k_{uncat})
OMP decarboxylase	78,000,000 سنة	$2.8*10^{-16}$	39	$1.4*10^{17}$
Staphylococcal nuclease	130,000 سنة	$1.7*10^{-13}$	95	$5.6*10^{14}$
AMP nucleosidase	69,000 سنة	$1.0*10^{-11}$	60	$6.0*10^{12}$
Ketosteroid isomerase	7 أسابيع	$1.7*10^{-7}$	66000	$3.9*10^{11}$

6. العوامل المؤثرة على النشاط الإنزيمي

1.6.تركيز الإنزيم

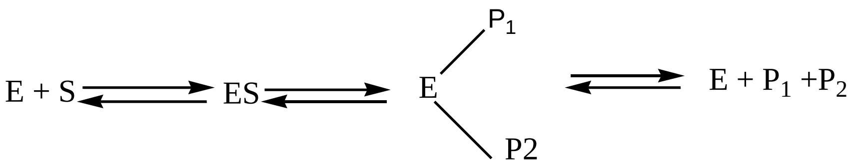
معدل التفاعل أو السرعة (V) يتناسب طردا مع تركيز الإنزيم، عندما يكون هناك كمية كافية من الركيزة تزداد سرعة التفاعل بشكل متناسب مع تركيز الإنزيم، بشرط أن يكون تركيز الركيزة غير محدود (**الشكل 03**)[5].



الشكل 03: تأثير تركيز الإنزيم على سرعة التفاعل.

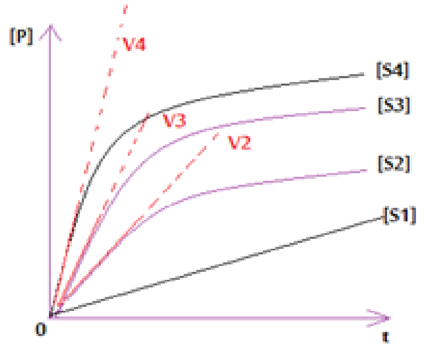
2.6.تأثير تركيز المادة الأساس

عند ثبات تركيز الإنزيم فإن سرعة التفاعل تزداد بزيادة تركيز المادة المتفاعلة أي الركيزة (S) حتى نقطة معينة بعدها نجد أن أي زيادة في تركيز (S) لا تزيد من سرعة التفاعل أي تصبح عديمة التأثير على سرعة التفاعل (حيث يتشبع الإنزيم تماما) ويمكن تفسير ذلك بالرجوع إلى معادلة التفاعل الإنزيمي (**الشكل 04**).



الشكل 04: معادلة التفاعل الإنزيمي.

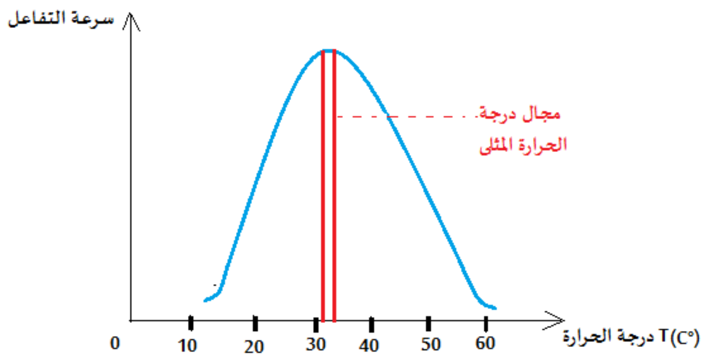
يمكن استنتاج أن سرعة التفاعل الإنزيمي تتناسب طردا مع تركيز المركب (إنزيم-ركيزة) (ES). وبما أن التركيز الكلي للإنزيم $[E]_0$ هو العامل الذي يحدد الحد الأقصى للتركيز [ES]، فإن أي زيادة في تركيز الركيزة [S] بعد الوصول إلى تشبع جميع جزيئات الإنزيم (أي عندما يتحول كل إنزيم حر E إلى مركب ES) لن تزيد من سرعة التفاعل. نتيجة لذلك، يظهر المنحنى ثباتا يدل على الوصول إلى السرعة القصوى V_{max} للتفاعل [6].



الشكل 05: تأثير تركيز الركيزة على سرعة التفاعل الإنزيمي.

3.6.تأثير درجة الحرارة

تزداد سرعة تفاعل الإنزيم عندما ترتفع درجة حرارة الوسط، لتصل إلى أقصى حد ثم تنخفض (منحنى على شكل جرس). درجة الحرارة التي يتم عندها تحويل أكبر كمية من الركيزة إلى المنتج في وحدة الزمن تُسمى **درجة الحرارة المثلى (الشكل 06)**. مع زيادة درجة الحرارة، تحصل المزيد من الجزيئات على طاقة التنشيط، أو تكون الجزيئات في حالة حركة متزايدة، لذلك تزداد احتمالات تصادمها وبالتالي تزداد سرعة التفاعل.

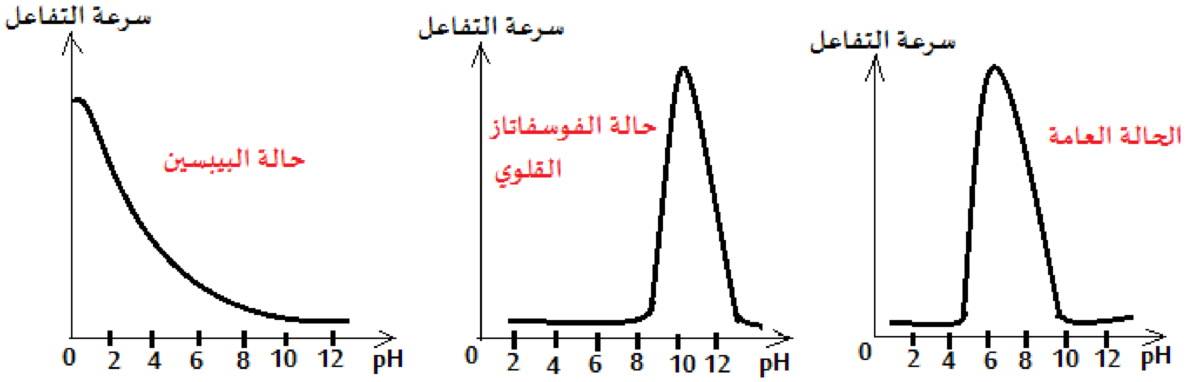


الشكل 06: تأثير درجة الحرارة على السرعة.

لكن عند درجة الحرارة العالية جدا، يحدث التشويه الحراري (denaturation) للبنية الثلاثية للبروتين ونتيجة لذلك ينخفض نشاط الإنزيم. معظم إنزيمات البشر لها درجة الحرارة المثلى حوالي 37 درجة مئوية. أما بالنسبة لبعض البكتيريا التي تعيش في الينابيع الساخنة يكون لديها إنزيمات بدرجة حرارة مثلى قريبة من 100 درجة مئوية [5].

4.6.تأثير الأس الهيدروجيني pH

كل إنزيم له قيمة درجة حموضة مثلى تكون عندها سرعة التفاعل مثالية، وبالابتعاد عن هذه االقيمة (درجة الحموضة المثلى) بالنقصان أو بالزيادة ستنخفض السرعة بشكل كبير. لذا سيظهر الرسم البياني **منحنى على شكل جرس** **(الشكل 07** "الحالة العامة"). حيث يؤثر تغير الأس الهيدروجيني (pH) على النشاط الإنزيمي عبر تعديل شحنات المجموعات الوظيفية في الموقع النشط (كمجموعات COOH- و NH_2-)، مما يغير التوافق الفراغي للإنزيم ويضعف ارتباطه بالركيزة. كما قد يؤدي الانزياح الحمضي أو القلوي الشديد إلى كسر الروابط الهيدروجينية والأيونية المسؤولة عن البنية الثالثية، مسببا تشوها في الموقع النشط أو فسخا كاملا للإنزيم. قد يختلف **الرقم الهيدروجيني الأمثل** اعتمادًا على درجة الحرارة وتركيز الركيزة ووجود الأيونات وما إلى ذلك. وعادة ما يكون الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيمات بين 6 و8، لكن هناك بعض الاستثناءات المهمة هي: **البيبسين** (بدرجة حموضة مثلى 1-2)، **الفوسفاتاز القلوي** (درجة حموضة مثلى 9-10) **والفوسفاتاز الحمضي** (4-5) [5].



الشكل 07: تأثير الأس الهيدروجيني على سرعة الإنزيم.

5.6.المثبطات

يمكن إيقاف أو خفض سرعة التفاعل الإنزيمي عن طريق "تثبيط فعالية الانزيم"، من خلال تغيير درجة الحموضة أو رفع درجة الحرارة، أو بإضافة مواد كيميائية تدعى " **المثبطات**" قد تكون أيونات معدنية أو مركبات جزيئية عضوية صغيرة تؤثر على عمل الإنزيم وتقلل من نشاطه [7].

تؤدي المثبطات فعلها بناء على عامل واحد أو أكثر منها:

• الموقع الفعّال للإنزيم

• مرافق الإنزيم.

• الجزء البروتيني من الإنزيم.

• المجموعة الرابطة في الإنزيم [8].

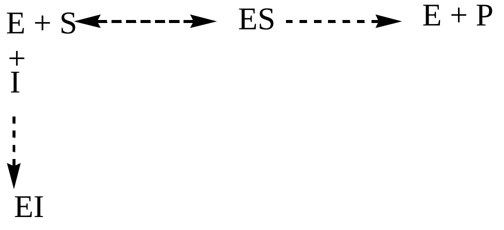
هناك نوعان من المثبطات:

أ-المثبطات العكسية Reversible inhibitors

حيث تتحد المثبطات العكسية مباشرة مع الانزيم بواسطة روابط ضعيفة مؤقتة يمكن إزالتها واستعادة النشاط الإنزيمي. هناك ثلاثة أنماط من التثبيط العكسي: تثبيط تنافسي (Competitive inhibition)، تثبيط غير تنافسي (Non-Competitive inhibition) وتثبيط لا تنافسي (Uncompetitive inhibition).

ب-المثبطات الغير عكسية Irreversible inhibition

ترتبط المثبطات الغير عكسية بروابط تكافؤية دائمة مع الإنزيم حيث أن الإنزيم يتعرف على المثبط كونه ركيزة فيرتبط بصفة دائمة بحيث لا يمكن فصلهما، هذا يؤدي الى تغيير الإنزيم مما يجعل الركيزة الأصلية غير قادرة على الارتباط به (تغير شكل الموقع الفعال) فيفقد الإنزيم كفاءته فيقال عنه أنه تسمم [8].



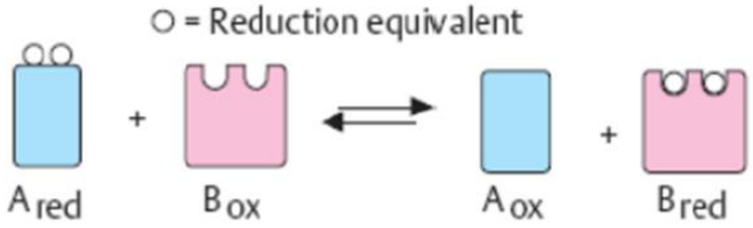
الشكل 08: التثبيط الغير عكسي.

7. تصنيف الإنزيمات وفقًا للجنة الدولية للإنزيمات (EC Classification) حسب وظيفتها

تنقسم الإنزيمات بحسب طبيعة التفاعل الذي تحفزه إلى ستة فئات رئيسية هي:

1.7. إنزيمات الأكسدة والإرجاع (oxidoreductases)

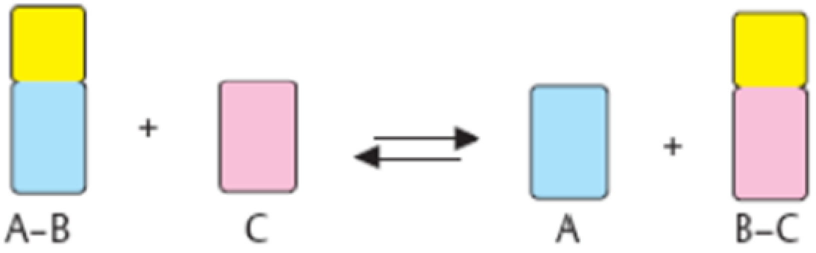
تتضمن الإنزيمات التي يتم فيها انتقال الإلكترونات من مادة مرجعة الى مادة مؤكسدة كما في التفاعل العام الآتي:



الشكل 09: عمل إنزيمات الأكسدة والإرجاع.

2.7. الإنزيمات الناقلة (transferases)

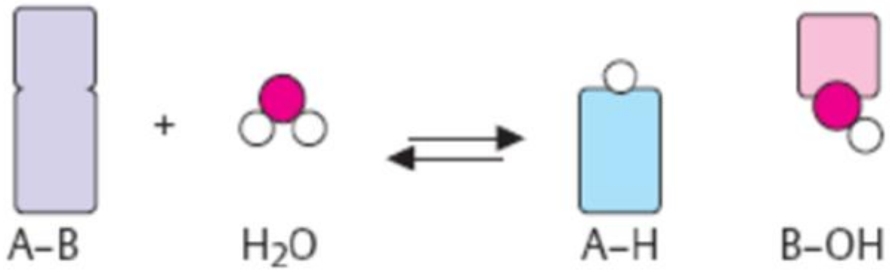
هي الإنزيمات التي تحفز نقل مجموعة كيميائية من مركب لآخر كما في التفاعل العام الآتي:



الشكل 10: عمل الإنزيمات الناقلة.

3.7. إنزيمات التحلل المائي (Hydrolases):

هي إنزيمات تحفز تفكيك الروابط في الجزيئات بإضافة الماء كما في التفاعل العام الآتي:



الشكل 11: إنزيمات التحلل المائي.

4.7. إنزيمات الإضافة أو الحذف (Lyases):

إنزيمات تقوم بإزالة مجموعة كيميائية من مادة التفاعل فينتج مركب يحتوي على رابطة مزدوجة او قد تضيف مجموعة الى الرابطة المزدوجة فينتج مركب يحتوي على رابطة أحادية.

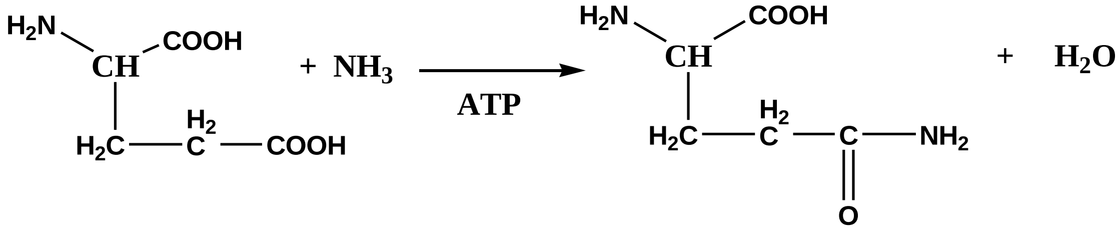
5.7. إنزيمات التماكب (isomerases):

تشمل الإنزيمات التي تعمل على نقل مجموعات كيميائية داخل الجزيء لتكوين المتشاكلات (isomères) أي أنها تحول المركب الى مركب مشابه له بإعادة ترتيب وضع الذرات كما في التفاعل العام الآتي:

الشكل 12: عمل إنزيمات التماكب.

6.7. إنزيمات الربط (Ligases):

وهي إنزيمات تعمل على ربط جزيئتين مع بعضهما حيث تعتمد في ذلك على تكسير رابطة الفوسفات الغنية بالطاقة الموجودة في جزيئة ATP أو المركبات المشابهة لها [8].



الشكل 13: عمل إنزيمات الربط.

8. الإنزيمات الهضمية:

هنالك عدة أنواع من الإنزيمات الهضمية ولكل نوع منها دور معين وآلية عمل مختلفة:

1.8. البروتياز Proteases:

البروتياز هي إنزيمات تحفيزية تقوم بتكسير الروابط **الببتيدية** بين الأحماض الأمينية في البروتينات (عملية التحلل البروتيني **Proteolysis**). تلعب دورًا حيويًا في:

- الهضم (تفكيك البروتينات الغذائية إلى أحماض أمينية).
- تنشيط الإنزيمات والهرمونات.
- تنظيم العمليات الخلوية (إشارات الخلية، موت الخلية المبرمج "**Apoptosis**").
- الدفاع المناعي (مثال: إنزيمات الجهاز المناعي التي تحطم بروتينات الفيروسات) [9].

1.1.8. أنواع البروتياز: يُصنف البروتياز بناءً على آلية التحفيز أو موقع عمله:

أ. التربسين (Trypsin)

المصدر: يُفرز من البنكرياس (غير نشط "Trypsinogen" ثم يُفعَّل في الأمعاء الدقيقة).

وظيفته: يحطم الروابط الببتيدية عند الأحماض الأمينية القاعدية (الليزينLysine، الأرجينينArginine) [10].

الأهمية الصناعية للتربسين :

- تحسين نسيج اللحوم ومعالجة الجيلاتين.
- تنظيف الجروح بإزالة الأنسجة الميتة.
- تحضير تركيبات غذائية مثل حليب الأطفال.
- تحليل البروتينات بتقنيات الكتلة الطيفية "Mass spectrometry" وإنتاج ببتيدات محددة لأغراض دراسية أو علاجية.
- يستخدم في المختبرات لعزل الخلايا (تفكيك الأنسجة) في تقنيات زراعة الخلايا "Trypsinization" [11].

ب. البيبسين (Pepsin)

المصدر: يُفرز في المعدة (غير نشط "Pepsinogen" ثم يُفعَّل في الوسط الحمضي للمعدة ((pH(1.5-2).

وظيفته: يعمل في البيئة الحمضية (pH ~2) لتحطيم البروتينات إلى ببتيدات أصغر (كسر الروابط الببتيدية) خاصة بين الأحماض الأمينية العطرية مثل: الفينيل ألانين والتيروزين [12].

ج. الكيموتريبسين (Chymotrypsin)

المصدر: يُفرز من البنكرياس (غير نشط "Chymotrypsinogen" يُفعل في الأمعاء الدقيقة بواسطة **التربسين**).

وظيفته: يحفز تحطيم الروابط عند الأحماض الأمينية العطرية (الفينيل ألانين، التيروزين) [13].

2.1.8.التطبيقات الصناعية للبروتياز:

صناعة الأغذية:

- إنتاج الجبن (استخدام **الرينين** لتحويل الحليب إلى جبن).
- تليين اللحوم عبر تكسير البروتينات الليفية (استخدام **البيسين** و**البروتياز** النباتية).

المنظفات:

- إضافة البروتياز القلوي (مثل **Subtilisin**) لإزالة بقع البروتين(الدم).

الطب:

- علاج الجروح (إزالة الأنسجة الميتة بالإنزيمات البروتينية).
- أدوية القلب (مثل منشط **بلازمينوجين** لعلاج الجلطات) [14].

2.8. الأميلاز (Amylase):

1.2.8. الوظيفة الرئيسية للأميلاز

الأميلاز هو إنزيم يحفز تحطيم النشاء (**Starch**) إلى سكريات بسيطة مثل:

المالتوز (جزيء مكون من وحدتي جلوكوز بينهما رابطة أوزيدية) يتفكك إلى وحدتي جلوكوز (سكر أحادي) بتحفيز الأميلاز. لذا يُعد الأميلاز أساسيًا في عملية الهضم واستقلاب الكربوهيدرات[10].

2.2.8-المصادر الرئيسية للأميلاز

أ. الأميلاز اللعابي (Salivary Amylase أو Ptyalin)

تُفرزه الغدد اللعابية في الفم ويقوم بتحطيم النشاء إلى دكسترين ومالتوز عند pH ~6.7-7.

ب. الأميلاز البنكرياسي (Pancreatic Amylase)

يُفرز من البنكرياس إلى الأمعاء الدقيقة فيكمل تحليل النشاء إلى سكريات قابلة للامتصاص.

ج. الأميلاز الميكروبي (Bacterial & Fungal Amylase)

تنتجه الكائنات الدقيقة: البكتيريا (Bacillus subtilis) الفطريات (Aspergillus oryzae).

ميزته: يُستخدم صناعيًا لتحمل درجات حرارة عالية وpH متغير[12].

3.2.8-التطبيقات الصناعية للأميلاز: يمكن تلخيص أهم التطبيقات الصناعية للأميلاز في **الجدول 02.**

الجدول 02: أهم التطبيقات الصناعية للأميلاز[15].

الصناعة	التطبيق	الإنزيم المستخدم
الغذاء	- إنتاج شراب الجلوكوز من النشاء (للمشروبات والحلويات).	أميلاز البكتيريا الحرارية
	- تحسين جودة الخبز (تكسير النشاء	الأميلاز الفطري

	لزيادة ليونة العجين)	
المنظفات	إزالة بقع النشاء من الملابس (يُضاف إلى مساحيق الغسيل).	الأميلاز القلوي
الوقود الحيوي	تحويل النشاء إلى سكريات قابلة للتخمر لإنتاج الإيثانول.	أميلاز معدل وراثيًا
الورق	إزالة النشاء من الورق المعاد تدويره لتحسين الجودة.	الأميلاز الحراري

3.8. الليباز (Lipases):

1.3.8. الوظيفة الرئيسية لإنزيمات الليباز:

الليباز هي إنزيمات تحفز تحطيم الدهون (الدهون الثلاثية -Triglycerides) إلى:

- أحماض دهنية حرة (Fatty Acids).
- جليسيرول (Glycerol).
- أحادي الجليسريد (Monoglycerides).

وتلعب دورًا حيويًا في:

- ✓ هضم الدهون في الأمعاء الدقيقة (بمساعدة أملاح الصفراء).
- ✓ استقلاب الدهون في الخلايا (تخزين أو تحرير الطاقة).
- ✓ العمليات الصناعية مثل إنتاج الوقود الحيوي والمنظفات[12].

2.3.8. أنواع الليباز:

يتم تصنيف الليباز بناءً على مصدرها أو تخصصها الوظيفي:

أ. الليباز البنكرياسي (Pancreatic Lipase)

يُفرز من البنكرياس ويطلق إلى الأمعاء الدقيقة عبر القناة البنكرياسية. يحلل الدهون الغذائية (الدهون الثلاثية إلى أحماض دهنية وجليسيرول ويحتاج إلى أملاح الصفراء لتكوين مستحلب دهني (Micelles) لزيادة فعالية التحليل[10].

ب. الليباز الكبدي (Hepatic Lipase)

ينتجه الكبد ويُفرز في الدم. فيعمل على تحليل البروتينات الدهنية (Lipoproteins) مثل LDL وVLDL وHDL لتنظيم مستويات الكوليسترول والدهون في الدم[10].

ج. الليباز الميكروبي (Microbial Lipase)

المصدر: تنتجه البكتيريا (مثل Pseudomonas وBacillus) والفطريات (مثل Candida rugosa).

خصائصه المميزة: يعمل في ظروف متطرفة:

- ✓ درجات حرارة عالية
- ✓ pH قلوي أو حمضي [16].

3.3.8. التطبيقات الصناعية لإنزيمات الليباز:

الجدول 03: أهم التطبيقات الصناعية لإنزيمات الليباز[17].

الصناعة	التطبيق	الإنزيم المستخدم
صناعة الغذاء	تحسين نكهة الجبن (تحليل الدهون أثناء النضج).	الليباز الفطري (Rhizomucor miehei)
	- إنتاج الزبدة الصناعية (تحويل الزيوت إلى دهون شبيهة بالزبدة).	الليباز البكتيري (Pseudomonas)
المنظفات	إزالة بقع الزيوت والدهون من الملابس (يُضاف إلى مساحيق الغسيل).	الليباز القلوي (Bacillus subtilis)
الوقود الحيوي	تحويل الزيوت النباتية إلى ديزل حيوي (Biodiesel) عبر تفاعل الأسترة.	الليباز الحراري (Thermomyces lanuginosus)
الصيدلة	- تصنيع الأدوية مثل مضادات الالتهاب (تحفيز التفاعلات الكيميائية).	الليباز الانتقائي (Lipase B من Candida antarctica)

9. مصادر الإنزيمات الهضمية في الكائنات الحية:

1.9. الكائنات الدقيقة:

المصادر الشائعة للإنزيمات الهضمية من الكائنات الدقيقة هي:

- **البكتيريا**: Bacillus subtilis (أميلاز، بروتياز)، Pseudomonas (ليباز).
- **الفطريات**: Aspergillus oryzae (أميلاز)، Rhizopus (ليباز).

المميزات:

- ✓ إنتاجية عالية (تتكاثر بسرعة في المزارع الصناعية)
- ✓ تنوع إنزيمي (تنتج إنزيمات تعمل في ظروف متطرفة كالحموضة العالية أو الحرارة)
- ✓ سهلة التعديل الوراثي لتحسين الأداء

العيوب:

- ✗ قد تنتج شوائب أو سمومًا (endotoxinsأوtoxins) تحتاج لتنقية مكلفة
- ✗ بعضها يحتاج ظروف تخمير معقدة [18].

2.9. النباتات:

المصادر الشائعة:

- **أوراق الأناناس:** بروميلين (بروتياز)
- **بذور البابايا:** باباين (بروتياز)
- **حبوب القمح:** أميلاز

المميزات:

- ✓ آمنة للاستهلاك البشري (تستخدم مباشرة في الغذاء)
- ✓ نشاط واسع النطاق (البابابين والبروميلين قادر على تحليل طيف واسع من البروتينات)
- ✓ تستخدم مباشرة في تركيبات المكملات دون الحاجة إلى تنقية معقدة
- ✓ تكلفة استخلاص منخفضة نسبيًا

العيوب:

- ✗ ذات نشاط غير نوعيlow specificity (تحلل بروتينات غير مستهدفة)
- ✗ حساسية اتجاه الظروف الفيزيائية (أقل استقرارا عند درجات حرارة مرتفعة أو pH غير معتدل)
- ✗ إنتاجية محدودة (تعتمد على مواسم الحصاد)
- ✗ تركيز الإنزيمات غالبًا أقل من المصادر الميكروبية[19]

3.9. الحيوانات

المصادر الرئيسية:

- **المعدة (العجول والخنازير):** بيبسين (Pepsin)، رينين/كيموزين (Rennin/Chymosin).

- **البنكرياس (الأبقار والخنازير):** تربسين (Trypsin)، كيموتربسين (Chymotrypsin)، أميلاز (Amylase)، ليباز (Lipase).
- **الغدد اللعابية:** بتيالين (Ptyalin) = أميلاز لعابي.
- **الأمعاء الدقيقة:** مالتاز (Maltase)، لاكتاز (Lactase)، سكراز (Sucrase).

المميزات:

✓ تشابه عال مع إنزيمات الإنسان من حيث البنية والوظيفة.
✓ كفاءة ونشاط إنزيمي مرتفع في البيئة الفسيولوجية.
✓ فعالية مثبتة طبيًا في علاج اضطرابات الهضم (مثل قصور البنكرياس).
✓ إستخلاص مباشر وسهل من أعضاء الحيوانات (كالمعدة والبنكرياس).

العيوب:

✗ إحتمال نقل أمراض فيروسية أو طفيلية (يتطلب تعقيمًا دقيقًا).
✗ غير مستقرة في الحرارة العالية أو الظروف الصناعية القاسية.
✗ قد تُسبب تحسسًا أو استجابة مناعية في بعض الحالات.
✗ غير مستدامة بيئيًا بسبب الاعتماد على ذبح الحيوانات كمصدر.
✗ قيود دينية وأخلاقية (مثل الحلال أو الكوشير).
✗ تكلفة عالية (تتطلب ذبح الحيوانات) [20].

4.9. المقارنة بين مختلف مصادر الإنزيمات الهضمية:

في الجدول التالي مقارنة بين المصادر المختلفة للإنزيمات الهضمية:

الجدول 04: المقارنة بين المصادر المختلفة للإنزيمات الهضمية[21].

المعيار	الكائنات الدقيقة	النباتات	الحيوانات
التكلفة	منخفضة (إنتاج ضخم)	متوسطة	عالية (تجهيز معقد)
الإنتاجية	عالية جدًا	محدودة	متوسطة
التنوع الإنزيمي	واسع (خصوصًا للظروف القاسية)	محدود	متخصص (لهضم الغذاء)
الأمان	يحتاج تنقية	آمنة مباشرة	خطر ملوثات محتملة
الاستدامة	عالية (لا تحتاج مساحات كبيرة)	تحتاج أراضي زراعية	عالية (لا تحتاج مساحات كبيرة)

10.حوصلة:

قمنا من خلال الفصل بتوضيح الدور الحيوي للإنزيمات كمحفزات بيولوجية فعالة في تسريع التفاعلات الكيميائية، مع إبراز العوامل المؤثرة على نشاطها. كما قمنا بالتركيز على الإنزيمات الهضمية مثل: الأميلاز، الليباز، والبروتياز، من حيث وظائفها، مصادرها الطبيعية وأهم تطبيقاتها الصناعية المختلفة، مما يُمهّد لاستغلال مصادر بديلة وغنية بهذه الإنزيمات في التطبيقات الصناعية.

المراجع :

[1] فهد بن ناصر العقيل وآخرون، منهاج تدريسي، الكيمياء الحيوية، إدارة عامة، 1429هـ، المملكة العربية السعودية.

[2] ر.م. دفلن، فيزيولوجيا النبات، الطبعة 3، مكتبة نرجس، 2014.

[3] T.Palmer, P.L.bonner, Enzymes biochemistry, biotechnology, clinical chemistry, 2nd eddition, Woodhead publishing (2007).

[4] J.M.Berg,J.L.Tymoczko,G.J.Gatto.Jr,L.Stryer, Biochemistry,8th eddition, W. H.Freeman&company (2015).

[5] DM Vasudevan,S.Sreekumari,K.Vaidyanatha, Textbook of biochemistry for medical studets,6theddition, Jaypee brothers medical publishers $(P)_{LTD}$ (2011).

[6] L. Hellerman, CC .Stock «activation of enzymes », J. Biol chem. 125(2), 771-793(1938).

[7] ا.ج.م.جندل،كيمياء الإنزيمات ،دار المستقبل للنشر و التوزيع، 2015.

[8] ا. ط. ي. أحمد، الكيمياء الحياتية الجزء الأول، ابن الأثير للطباعة والنشر جامعة الموصل،2010.

[9] H.Lodish et al. Molecular cell biology (4th ed).W.H.Freeman (2000).

[10] J.M.Berg, J.L.Tymoczko, G.J.Gatto,Jr, L.Stryer.Biochemistry (5th ed).W.H.Freeman&company,(2000).

[11] Y.Zhang et al. Improved production of active streptomyces griseus trypsin with a novel auto-catalyzed strategy. Scientific Reports, 6, 23158 (2016).

[12] D.L.Nelson, M.M. Cox. Lehninger Principles of Biochemistry (7th ed), W.H. Freeman (2017).

[13] D. Voet, J.G. Voet, Biochemistry (4th ed), Wiley (2011).

[14] R.Gupta, K.Q.Beg, P.Lorenz. Bacterial alkaline proteases:Molecular approaches and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 59(1), 15-32 (2002).

[15] R.Gupta,P.Gigras,H.Mohapatra,V.K.Goswami,B.Chauhan, Microbial α-Amylases: A Biotechnological Perspective. Process Biochemistry, 38(11), 1599-1616,(2003).

[16] R.Gupta,N.Gupta,P.Rathi, Bacterial Lipases: An Overview of Production, Purification, and Biochemical Properties, Applied Microbiology and Biotechnology, 64(6), 763-781,(2004).

[17] F.Hasan,A.Ali Shah,A.Hameed, Industrial Applications of Microbial Lipases, Enzyme and Microbial Technology, 39(2), 235-251 (2006).

[18] N.K.Arora,J.Mishra,V.Mishra,Microbial enzymes:Role and applications in industries(vol.11), Springer(2020).

[19] A.Meshram,G.Singhal,S.S.Bhagyawant,N.Ssrivastava. Plant derived enzymes: A treasure for food biotechnology . In "Enzymes in food biotechnology: Production, Applications and future prospects" (pp.483-502), Academic Press (2019).

[20] M. Aminlari. Plants– and animal-derived enzymes and their potential application in food processing and preservation. In "Novel food grade enzymes" (pp. 17–63). Springer (2022).

[21] A.Darbandi,Z.Elahi,L.Dedgar-Zankbar,F.Ghasemi et al. Application of microbial enzymes in medicine and industry: current status and future perspectives. Future Microbiology, 19(16) ,1419-1437(2024).

الفصل الثاني

عموميات حول تقنيات تنقية

واستخلاص الإنزيمات

1. مقدمة

تُعد الإنزيمات من الأدوات الحيوية المهمة في العديد من المجالات الصناعية والبحثية، مثل الصناعات الغذائية، الدوائية، البيئية، والنفط. بسبب قدرتها العالية على تسريع التفاعلات الكيميائية بشكل انتقائي، أصبحت الإنزيمات من المكونات الأساسية في العديد من العمليات الصناعية. لذلك، فإن عملية استخلاص وتنقية الإنزيمات تعد خطوة أساسية للحصول على إنزيمات ذات جودة عالية وقادرة على أداء وظائفها بكفاءة. [1]

تشمل عملية الاستخلاص عدة مراحل، حيث يتم عزل الإنزيمات من مصادرها الطبيعية مثل الخلايا الحية أو الأنسجة الحيوانية والنباتية[2].

يُعتمد على مجموعة متنوعة من الطرق الفيزيائية والكيميائية لاستخلاص الإنزيمات، مثل الترشيح، والطرد المركزي، والترسيب، والتهجين الجزيئي. بعد الاستخلاص، تأتي مرحلة التنقية التي تهدف إلى إزالة الشوائب والمواد غير الفعالة، باستخدام تقنيات مثل الكروماتوغرافيا، والترشيح الهلامي، والترسيب بالملح. [3]

كما تكمن أهمية التنقية في ضمان فعالية الإنزيمات وتحسين أدائها في التطبيقات الصناعية، مثل تعديل خصائص الأغذية أو إنتاج الأدوية. من خلال هذه العمليات، يمكن الحصول على إنزيمات نقية للغاية يمكن استخدامها في ظروف محددة وبتحكم دقيق.

مع التقدم التكنولوجي، أصبح من الممكن استخدام الإنزيمات المعاد تشكيلها أو المعدلة لتلبية احتياجات صناعية دقيقة، ما يسهم في تقليل التكاليف وتحسين الكفاءة.

2.طرق استخلاص الانزيمات

1.2. الاستخلاص الفيزيائي

1.1.2. التكسير الميكانيكي

يُعد التكسير الميكانيكي إحدى الطرق الفيزيائية الشائعة المستخدمة لتحطيم الخلايا، ويعتمد على تطبيق قوى ميكانيكية مثل القص، الضغط، أو الاحتكاك لتفكيك الجدران الخلوية والأغشية. تؤدي هذه العملية إلى تحرير المكونات الداخلية للخلايا مثل البروتينات، الإنزيمات، والعضيات. وتُستخدم هذه الطريقة بشكل خاص مع الخلايا ذات الجدران الصلبة كالبكتيريا، الخمائر، والخلايا النباتية.

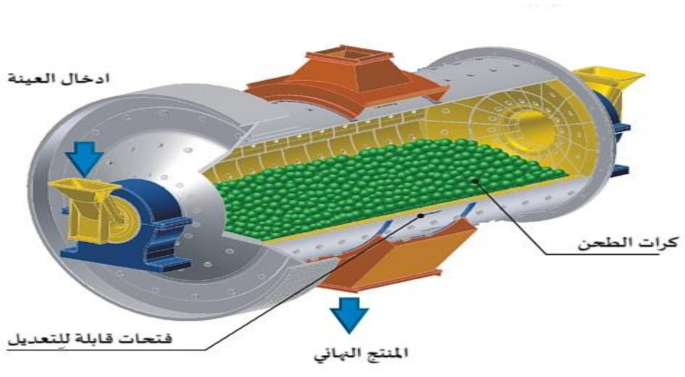
1.1.1.2.تقنيات التكسير الميكانيكي

أ. الطحن باستخدام المطاحن الكروية (Ball Mill)

يتم تكسير الخلايا من خلال الاصطدام المستمر بكرات زجاجية أو فولاذية داخل وعاء دوار، مما يولّد قوى قص عالية. وفق شروط:

- سرعة الدوران: بين 100 و1000 دورة/دقيقة.

- مدة الطحن: تتراوح بين 2–10 دقائق.
- درجة الحرارة: يُفضل الحفاظ عليها عند 4°C لتفادي فقد النشاط الإنزيمي.



الشكل 01: جهاز المطاحن الكروية.

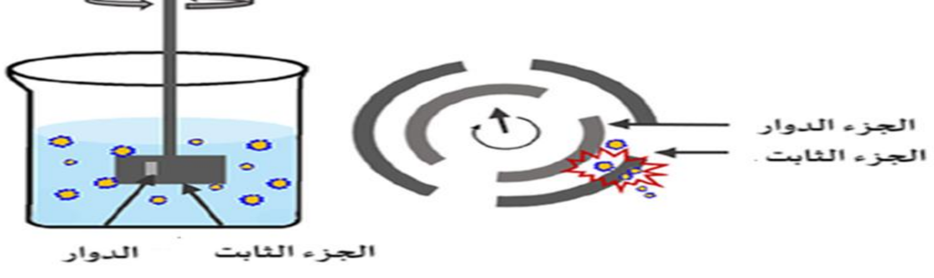
ب. الضغط العالي (French Press)

يتم تمرير المعلّق الخلوي عبر فتحة ضيقة تحت ضغط عالٍ قد يصل إلى(40,000 psi)، مما يسبب تفجير الخلايا بفعل الضغط المفاجئ. من مميزاته:

- ✓ كفاءة تكسير عالية (قد تصل إلى 95–98%).
- ✓ مثالي للخلايا الصغيرة مثل البكتيريا.
- ✓ غير مناسب للأنسجة الرخوة.
- ✓ توليد حرارة قد تؤثر سلبًا على الإنزيمات.

ج. جهاز التجانس الدوّار الثابت (Rotor-Stator Homogenizer)

يعتمد على دوران رأس معدني بسرعة عالية (20,000–50,000 rpm)، مما يولد قوى قص فعالة تفكك الخلايا. يُستخدم بشكل شائع مع الأنسجة الحيوانية (مثل الكبد والعضلات) والخلايا النباتية[4].



الشكل 02: جهاز التجانس الدوار الثابت.

2.1.2. الموجات الفوق صوتية(ultra_sonicator)

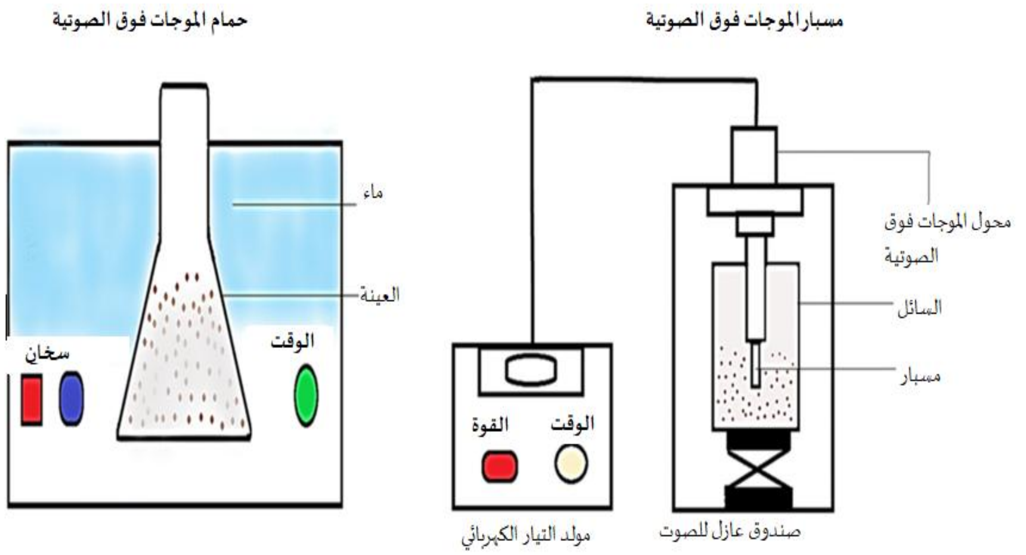
تُعد تقنية الموجات فوق الصوتية من الطرق الحديثة الفعالة لاستخلاص الإنزيمات من الأنسجة الحيوانية، وتعتمد هذه الطريقة على تطبيق موجات صوتية بترددات تتراوح بين 20 و100 كيلوهرتز لإحداث ظاهرة التجويف الصوتي. (Cavitation) تؤدي هذه الظاهرة إلى تكوّن فقاعات مجهرية داخل السائل تنهار بشكل سريع، مما يُولّد قوى ميكانيكية عالية، وحرارة موضعية، وجذور حرة تفاعلية تساهم مجتمعة في تكسير الخلايا.

1.2.1.2.آلية العمل وتأثيرها على الخلايا

- ✓ توليد قوى قص ميكانيكية نتيجة لانهيار الفقاعات.
- ✓ ارتفاع موضعي في درجة الحرارة يساعد على تفكيك الروابط غير التساهمية في الأغشية.
- ✓ تمزق الأغشية الخلوية يؤدي إلى إطلاق الإنزيمات المحصورة داخل الخلايا.
- ✓ زيادة نفاذية الأنسجة تُسهّل انتقال المكونات الحيوية إلى الوسط الخارجي[5].

2.2.1.2.المزايا مقارنة بالطرق التقليدية

- ✓ رفع كفاءة الاستخلاص بنسبة تتراوح من 30 الى 50 بالمئة.
- ✓ تقليل الزمن اللازم للعملية من عدة ساعات إلى دقائق.
- ✓ الحفاظ على النشاط الإنزيمي بفضل التقليل من التعرض للحرارة.
- ✓ إمكانية التوسع إلى تطبيقات صناعية باستخدام أنظمة متعددة الأقطاب. [5]



الشكل 03: جهاز الموجات الفوق صوتية.

3.1.2. الطرد المركزي(centrifugation)

يُعد الطرد المركزي من التقنيات الحيوية المهمة في مرحلة ما بعد تكسير الخلايا، حيث يُستخدم لفصل المكونات الخلوية بناءً على اختلاف كثافتها. أثناء العملية، تترسب الجزيئات الثقيلة مثل الحطام الخلوي والعضيات في قاع الأنبوب، بينما تبقى الإنزيمات الذائبة في الطبقة العلوية (الراشح).

باستخدام سرعات تتراوح بين 5,000 و10,000 دورة/دقيقة لمدة 10–20 دقيقة عند درجة حرارة منخفضة حوالي 4 °C للحفاظ على استقرار ونشاط الإنزيمات. هذه الظروف تتيح الحصول على راشح نقي يحتوي على الإنزيمات المستهدفة.من أهم تطبيقاته:

- ✓ تنقية الإنزيمات بعد التكسير الميكانيكي أو الموجات فوق الصوتية.
- ✓ استخلاص إنزيمات البروتياز مثل التربسين والببسين.
- ✓ فصل الإنزيمات القابلة للذوبان من مزارع ميكروبية أو عينات نباتية/حيوانية.

كما يجب الانتباه الى :

- ✓ تجنب استخدام سرعات طرد عالية قد تؤدي إلى ترسيب غير مرغوب فيه للإنزيمات.
- ✓ الحرص على موازنة الأنابيب لتفادي تلف جهاز الطرد.
- ✓ يجب استخدام الراشح فورًا أو حفظه في ظروف باردة لتفادي تحلله. [6]

2.2.الاستخلاص الكيميائي

1.2.2. المحاليل المنظمة (buffer solution)

تلعب المحاليل المنظمة دورًا أساسيًا في عمليات استخلاص الإنزيمات، إذ تساهم في توفير بيئة مستقرة تحافظ على نشاط الإنزيم وبنيته الطبيعية. فهي تنظم درجة الحموضة (pH) ضمن النطاق الأمثل لنشاط الإنزيم، عادةً ضمن ±0.5 وحدة pH من القيمة المثالية، مما يمنع أي تغيرات قد تحدث نتيجة تحلل الخلايا أو تفاعلات كيميائية مصاحبة.

بالإضافة إلى ذلك، تساهم المحاليل المنظمة في الحفاظ على البنية الثلاثية للإنزيمات من خلال موازنة الشحنات السطحية للبروتينات، مما يقلل احتمالية حدوث التشوه البنيوي (Denaturation). كما توفر هذه المحاليل حماية فعالة من العوامل الضارة مثل الأيونات المعدنية الثقيلة أو الجذور الحرة المؤكسدة.

أمثلة على المحاليل المنظمة واستخداماتها

- ❖ **فوسفات: (PBS)** بمدى pH بين 6.0–8.0، يُستخدم مع إنزيمات الجهاز الهضمي كالتربسين والببسين، وغالبًا ما يُضاف إليه كلوريد الصوديوم للحفاظ على التوتر الأسموزي.
- ❖ **Tris-HCl** : مناسب لإنزيمات النقل والتمثيل الغذائي ضمن pH من 7.0–9.0، وغالبًا ما يُستخدم مع مادة EDTA لربط الأيونات المعدنية.

❖ **HEPES** : يستخدم لإنزيمات حساسة للأيونات المعدنية ضمن نطاق pH 6.8–8.2، ويضاف إليه DTT كمضاد للأكسدة. [7]

عادةً ما تُضاف إلى هذه المحاليل العازلة مكونات إضافية لتعزيز استقرار الإنزيمات ونشاطها. من هذه الإضافات:

- **EDTA**، الذي يعمل على ربط الأيونات المعدنية الضارة التي قد تؤثر سلبًا على الإنزيمات.
- **DTT** أو **mercaptoethanol** -β، وهما مواد تحمي مجموعات الثيول (SH-) الموجودة في البروتينات من التأكسد، مما يساعد في الحفاظ على البنية الفعالة للإنزيمات.
- **الجلسيرول** بنسبة تتراوح بين 20% و50%، يستخدم لتحسين استقرار الإنزيمات عند تخزينها لفترات طويلة[7].

2.2.2. المذيبات العضوية

تُعد المذيبات العضوية أدوات أساسية في استخلاص وتنقية الإنزيمات من المصادر البيولوجية، حيث تساهم في كسر الأغشية الخلوية وإزالة المكونات غير المرغوب فيها مثل الدهون والبروتينات غير المستهدفة. ومع ذلك، فإن اختيار المذيب المناسب يعتمد على عدة عوامل، بما في ذلك قطبية المذيب، درجة الحرارة، وتأثيره على البنية الثلاثية للإنزيم. [8] ومن استخدامات المذيبات العضوية في استخلاص الإنزيمات ما يلي:

❖ **تحطيم الأغشية الخلوية**

تلعب المذيبات العضوية مثل الإيثانول والأسيتون دورًا فعالًا في تكسير الأغشية الخلوية، خاصةً تلك الغنية بالدهون، مما يسمح بتحرير الإنزيمات المحتجزة داخل الخلايا. [9]

❖ **إزالة الشوائب الدهنية**

تُستخدم المذيبات غير القطبية مثل الهكسان والكلوروفورم لإذابة الشوائب الدهنية، مما يُسهم في تحسين نقاء المستخلص الإنزيمي[9].

إلا أن لهذه المذيبات تأثيرًا مباشرًا على ثباتية ونشاط الإنزيمات كالحفاظ على البنية الفراغية، قد يؤدي التعرض لبعض المذيبات العضوية إلى إحداث تغييرات في البنية الثانوية أو الثلاثية للإنزيم، مما يؤدي إلى انخفاض أو فقدان في نشاطه. [9]

كما تتوقف قدرة الإنزيم على الحفاظ على نشاطه الحيوي في وجود المذيبات العضوية على قدرة هذه الأخيرة في تكوين طبقة مائية محيطة بالجزيء الإنزيمي. [8]

الأمر الذي يمكن التغلب عليه باستخدام مثبتات مثل الجلسرين أو السكروز بنسب محددة تساهم في استقرار الإنزيم، بالإضافة إلى صعوبة إزالة بقايا المذيبات السامة التي قد تُحلّ باستخدام تقنيات حديثة مثل التجميد-التجفيف أو التبخير تحت ضغط منخفض. [9]

في الاتجاهات الحديثة، أصبح استخدام **المذيبات البيئية المركبة منخفضة نقطة الانصهار** شائعًا، وهي مذيبات تتكون من مزج مادتين أو أكثر بحيث يكون للخليط نقطة انصهار أقل بكثير من كل مادة على حدة. هذه المذيبات تتميز بكونها آمنة بيئيًا وغير سامة، وقد أثبتت فعاليتها الكبيرة في استخلاص الإنزيمات مع تقليل الأضرار البيئية. [10]

3.2.2.إضافة المواد المثبتة للانزيمات

خلال عملية استخلاص الإنزيمات من الخلايا أو الأنسجة، قد تتعرض هذه الجزيئات الحيوية لظروف قاسية، مثل التغيرات الحادة في درجة الحرارة، والتعرض للمذيبات العضوية، أو الإجهاد الميكانيكي الناتج عن عمليات مثل الطرد المركزي. تؤدي هذه الظروف إلى:

- **فقدان النشاط الإنزيمي** نتيجة التشوه البنيوي (Denaturation) الذي يطال البنية الثانوية أو الثلاثية للإنزيم.
- **تجميع الجزيئات (Aggregation)** وتكوين رواسب غير قابلة للذوبان، مما يقلل من الفعالية الحيوية للإنزيم.

ولمواجهة هذه التحديات، تُضاف مواد مثبتة (Stabilizers) خلال مراحل الاستخلاص والتنقية، مثل الجلسرين أو السكروز، وذلك بهدف الحفاظ على استقرار الإنزيم ومنع فقدان نشاطه.

تعمل المواد المثبتة على الحفاظ على استقرار الإنزيم عبر عدة آليات رئيسية، تشمل:

- **الحفاظ على البنية الثلاثية للإنزيم**: حيث تتفاعل هذه المواد مع السطح البروتيني للإنزيم، مما يساعد في الحفاظ على البنية الفراغية الأصلية للإنزيم ومنع التشوهات التي قد تؤدي إلى فقدان النشاط.
- **منع تجفيف الإنزيم**: في حالات التجميد أو التجفيف، تعمل المواد المثبتة مثل الجلسرين على تقليل التأثيرات السلبية لهذه العمليات، حيث تمنع فقدان الماء وتقلل من تكوين بلورات ثلجية قد تؤدي إلى تدمير البنية البنيوية للإنزيم.
- **تقليل التجميع (Aggregation)**: من خلال زيادة ذوبانية الإنزيم، تمنع هذه المواد التجميع غير المرغوب فيه للجزيئات، مما يساعد في الحفاظ على الكفاءة الحيوية للإنزيم ويقلل من تكوين الرواسب غير القابلة للذوبان. [10]

1.3.2.2.المواد المثبتة الشائعة واستخداماتها

أ. السكريات (مثل التريهالوز، السكروز)

تحل محل جزيئات الماء المفقودة أثناء التجفيف (Water Replacement Theory): تعمل السكريات مثل التريهالوز والسكروز على الحفاظ على استقرار الإنزيم في حالات التجفيف أو التجميد من خلال استبدال جزيئات الماء المفقودة، مما يحمي الإنزيم من التأثيرات السلبية.

تكوين طبقة زجاجية (Vitrification): عند تعرض الإنزيم لظروف تجفيف، تشكل هذه السكريات طبقة زجاجية تحمي الإنزيم من التلف الحراري الناتج عن عمليات التجفيف أو التجميد[11].

ب. البولي إيثيلين جلايكول (PEG)

زيادة الاستقرار الحراري: يُستخدم البولي إيثيلين جلايكول (PEG) لتحسين الاستقرار الحراري للإنزيم من خلال تقليل تفاعلات البروتين-بروتين التي قد تؤدي إلى فقدان النشاط.

استخدامه في العازلات (Buffers): يُضاف PEG إلى محاليل العازلات المستخدمة في عمليات الاستخلاص لمنع الترسيب وتقليل التفاعلات غير المرغوب فيها بين البروتينات. [12]

ج. ألبومين مصل البقر (BSA)

بروتين خامل: يعمل الألبومين كمادة غير نشطة تمنع التصاق الإنزيمات بجدران الأنابيب أثناء الطرد المركزي أو أثناء عمليات المعالجة الميكانيكية.

تقليل الأكسدة: الأكسدة هي عملية يمكن أن تضر بالإنزيمات وتجعلها تفقد نشاطها. يساعد الـ BSA في حماية الإنزيمات من هذه العملية، فيحافظ على نشاطها واستقرارها خلال مراحل الاستخلاص. [13]

3.تقنيات تنقية و تركيز الانزيمات

بعد عملية استخلاص الإنزيمات الحيوانية، تأتي مرحلة التنقية والتركيز لفصل الإنزيم المستهدف عن باقي المكونات مثل البروتينات الأخرى، الدهون، النيوكليوتيدات، والشوائب. تختلف الطرق باختلاف نوع الإنزيم والغرض من استخدامه (تحليلي، صناعي، أو علاجي). وفيما يلي أهم الطرق المتبعة:

1.3.الترشيح الفائق(ultrafiltration)

تُعد تقنية الترشيح الفائق من أكثر الأساليب كفاءةً في عمليات تنقية الإنزيمات والبروتينات، حيث تعتمد على مبدأ الفصل حسب الحجم الجزيئي باستخدام أغشية نصف نافذة دقيقة. وتعمل هذه التقنية على أساس استخدام ضغط هيدروليكي أو تناضحي لدفع المحلول عبر الغشاء، مما يسمح بمرور الجزيئات الصغيرة (مثل الأملاح والمركبات ذات الوزن الجزيئي المنخفض)، في حين تُحتجز الجزيئات الكبيرة (مثل البروتينات والإنزيمات) ضمن الراشح المركز. [14]

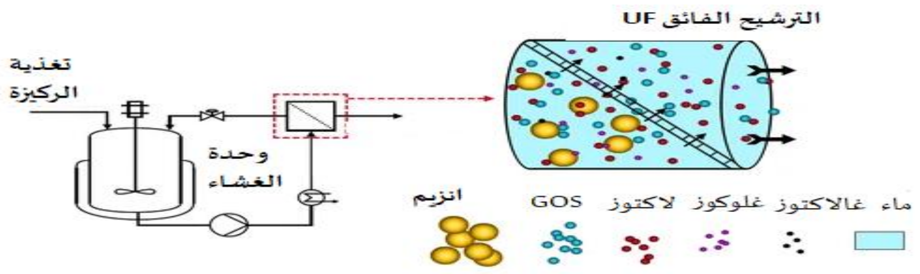
تُصنع الأغشية من مواد متعددة مثل السيلولوز أو البوليمرات الاصطناعية، ويُصمم حجم المسام بدقة ليتراوح بين 1 و100 نانومتر، بما يتناسب مع نوع الجزيئات المراد فصلها. وتتميز هذه الأغشية بمساحة سطح كبيرة تُساهم في تحسين كفاءة الترشيح. وتشمل العوامل الأساسية التي تتحكم في كفاءة العملية:

- ضغط التشغيل (يتراوح عادة بين 1 و10 بار).
- درجة الحرارة (يجب ضبطها للحفاظ على استقرار الإنزيمات).
- سرعة التدفق عبر الغشاء.

❖ تركيز المحلول الأولي.

كما تتميز هذه التقنية مقارنة بالطرق التقليدية بما يلي:

❖ الحفاظ على النشاط الحيوي للإنزيم بنسبة تتراوح بين 90–95%.
❖ تقليل استهلاك الطاقة بنسبة تصل إلى 40% مقارنةً بطرق الترسيب.
❖ إمكانية التشغيل المستمر (Continuous processing)، مما يرفع من الكفاءة الصناعية.
❖ قابلة للتطوير بسهولة للعمل على نطاق صناعي واسع. [14]



الشكل 04: خلية الترشيح الفائق

2.3.التبادل الايوني (Ion exchange chromatography)

تُعد كروماتوغرافيا التبادل الأيوني من بين أهم تقنيات الفصل والتنقية، حيث تعتمد على الاختلاف في الشحنات الكهربائية للجزيئات الحيوية، مثل البروتينات والإنزيمات. وتستند هذه التقنية إلى تفاعلات كهربائية ساكنة تحدث بين الجزيئات المستهدفة والطور الثابت داخل العمود الكروماتوغرافي. يتكون نظام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني من:

➢ **الطور الثابت:** عبارة عن راتنجات صلبة تحتوي على مجموعات شاردة ثابتة، ويمكن أن تكون:

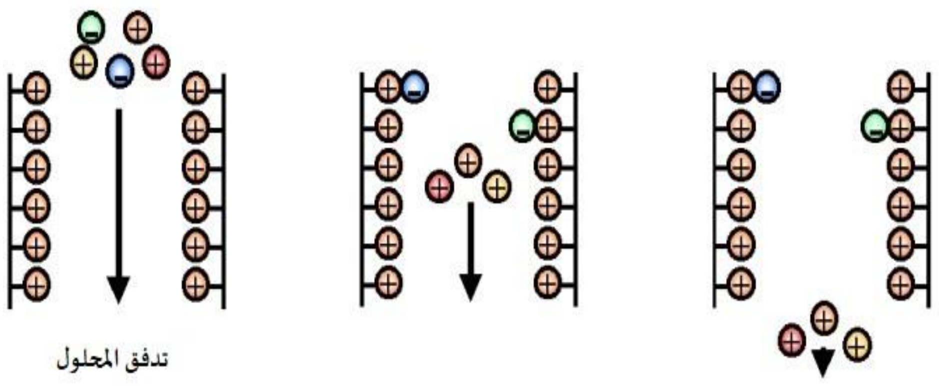
موجبة الشحنة (تستخدم لفصل الأنيونات) مثل مجموعة NR_2H^+.

سالبة الشحنة (تستخدم لفصل الكاتيونات) مثل مجموعة COO^-- أو SO_4^{2-} .

➢ **الطور المتحرك:** هو محلول منظم يحتوي على أيونات غير عضوية تعمل على التنافس مع الجزيئات المرتبطة بالطور الثابت، مما يسمح بتحريرها تدريجيًا وفصلها حسب شحنتها. [15]

كما تتميز كروماتوغرافيا التبادل الأيوني:

✓ تتيح فصلًا دقيقًا وفعالًا للجزيئات الحيوية.
✓ تمتاز بسعة تحميل عالية، مما يسمح بتنقية كميات كبيرة نسبيًا.
✓ يمكن تطبيقها على مستويات صناعية، وهو ما يجعلها خيارًا مفضلًا في إنتاج الإنزيمات والمستحضرات البروتينية[15]



الشكل 05: كروماتوغرافيا التبادل الايوني.

3.3.الترسيب بالملح

تُعد تقنية الترسيب بالملح من أقدم وأكثر الطرق استخدامًا وفعالية في تنقية البروتينات والإنزيمات. وتعتمد هذه الطريقة على مبدأ تقليل ذوبانية الجزيئات الحيوية في المحاليل المائية من خلال إضافة تراكيز عالية من الأملاح، وأكثرها شيوعًا كبريتات الأمونيوم.

تعمل أيونات الملح على التنافس مع البروتينات في الارتباط بجزيئات الماء، مما يؤدي إلى تقليل الطبقة المائية المحيطة بالبروتينات ظاهرة نقص الإماهة. (Dehydration) ينتج عن ذلك زيادة في التفاعلات الكارهة للماء بين جزيئات البروتين، مما يؤدي إلى ترسيها دون التأثير على بنيتها الطبيعية أو نشاطها الوظيفي[16].

تتميز هذه التقنية بعدة مزايا، من أبرزها:

- ✓ انخفاض التكلفة وسهولة التنفيذ.
- ✓ إمكانية عكس العملية بسهولة عبر إعادة إذابة الرواسب في ظروف مناسبة.
- ✓ قابليتها للتطبيق في المختبرات والصناعات الحيوية على حد سواء [17]

كما أن تحسين ظروف الترسيب، مثل درجة الحرارة، والأس الهيدروجيني (pH)، وتركيز الملح، يمكن أن يرفع كفاءة عملية التنقية إلى أكثر من 90%، مما يسمح بالحصول على بروتينات عالية النقاء[18]

كما تم استخدام هذه التقنية بنجاح في عزل البروتينات النادرة من مخاليط بيولوجية معقدة باستخدام بروتوكولات متقدمة[19].

4.3.الترشيح الهلامي (gel filtration chromatography)

يعد الترشيح الهلامي من التقنيات الأساسية في مجال تنقية الجزيئات الحيوية، وتعتمد على مبدأ الفصل الحجمي (Size-Exclusion)، حيث يتم فصل الجزيئات وفقًا لاختلاف أحجامها الجزيئية وأشكالها الفراغية. تُستخدم هذه التقنية عبر تمرير العينة خلال عمود معبأ بحبيبات هلامية مسامية مثل Sephadex أو Sepharose.

في هذه التقنية، تسلك الجزيئات الكبيرة مسارًا أقصر حول الحبيبات، إذ لا تتمكن من الدخول إلى المسام، فتخرج أولاً من العمود. في المقابل، تدخل الجزيئات الصغيرة إلى المسام الموجودة في الحبيبات، مما يؤدي إلى تأخرها في الخروج[20]

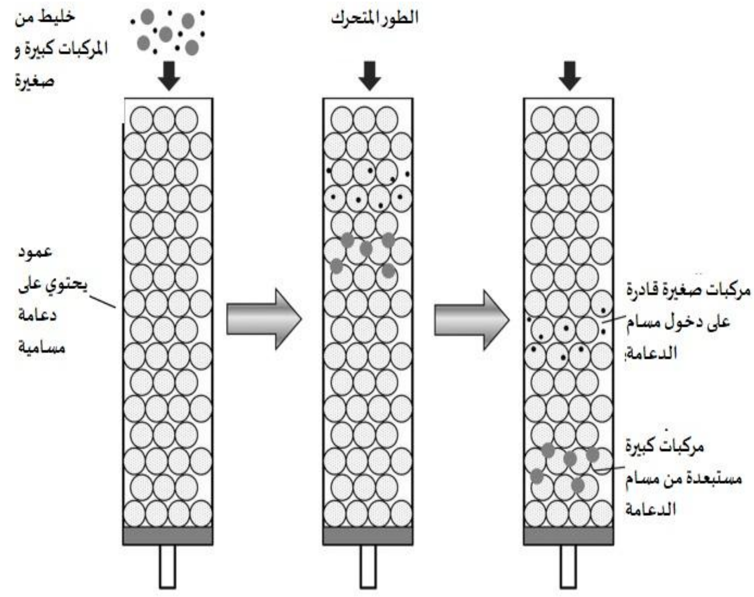
وتُعد هذه الطريقة لطيفة وغير تدميرية، حيث تتم عملية الفصل دون الحاجة إلى تغييرات في درجة الحموضة أو الارتباط الكيميائي، مما يحافظ على النشاط الحيوي للإنزيمات[21]

ومن العوامل المؤثرة في كفاءة الفصل:

- ❖ حجم الحبيبات: الحبيبات الصغيرة تعطي دقة فصل أعلى لكنها تزيد من مقاومة العمود للتدفق.
- ❖ طول العمود: كلما زاد طول العمود، تحسن الفصل، ولكن على حساب زيادة زمن التحليل.
- ❖ سرعة التدفق: تتراوح السرعة المثلى عادة بين 0.5–1.5 مل/دقيقة لتحقيق أفضل فصل دون إضرار بالبروتينات.

من أهم التطبيقات العملية:

- ✓ تنقية الإنزيمات من المستخلصات الخام.
- ✓ إزالة الأملاح والجزيئات الصغيرة من محاليل البروتين.
- ✓ تقدير الأوزان الجزيئية للبروتينات باستخدام معايير قياسية معروفة. [22]



الشكل 06: كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي.

5.الحوصلة

تُعدّ الإنزيمات جزيئات حيوية ذات أهمية قصوى نظرًا لدورها المحوري في مختلف العمليات البيولوجية والصناعية. ومع التزايد المستمر في التطبيقات الصناعية للإنزيمات، أصبح تحقيق مستويات عالية من النقاء شرطًا أساسياً لضمان كفاءتها وجودتها في مختلف المجالات، من الصناعات الدوائية إلى الصناعات الغذائية والبيئية. وقد أسهمت التطورات التكنولوجية الحديثة في تقليص الخطوات المعقدة لإنتاج الإنزيمات، خاصة عبر تقنيات الهندسة الوراثية التي مكنت من إنتاج الإنزيمات والبروتينات المؤتلفة بكفاءة عالية، مما أدى إلى تحويل العبء الأكبر إلى مرحلة التنقية والتركيز.

على الرغم من أن التقنيات التقليدية مثل الترشيح، والتبادل الأيوني، والكروماتوغرافيا الهلامية تقدم مستويات جيدة من النقاء، إلا أنها غالباً ما تكون معقدة، مستهلكة للوقت، ومرتفعة التكلفة، مما يحد من جدواها الاقتصادية، خصوصًا عند التطبيق على نطاق صناعي واسع. من هذا المنطلق، برزت الحاجة إلى استحداث طرق بديلة تجمع بين الكفاءة والاقتصاد.

كما ظهرت تقنيات ناشئة مثل نظام الطورين المائيين (ATPS) الذي يعتمد على الفصل في وسطين مائيين متمايزين، مما يتيح عزل الإنزيمات بطريقة سلسة وآمنة، وتقنية التقسيم ثلاثي الطور (TPP) التي تسمح بفصل وتركيز الإنزيمات في خطوة واحدة باستخدام أملاح ومذيبات عضوية معينة. هذه التقنيات تتميز بإمكانية دمج عدة مراحل في عملية واحدة، مما يقلل من التكاليف ويزيد من الإنتاجية مع الحفاظ على نشاط الإنزيمات.

وعليه، فإن دمج الطرق التقليدية مع هذه الأساليب الناشئة يمكن أن يشكل استراتيجية فعالة لتحقيق تنقية عالية الكفاءة بطريقة مجدية اقتصاديًا. ويُعد الاستثمار في تطوير وتكييف هذه التقنيات بما يتلاءم مع خصائص كل إنزيم وتطبيقه الصناعي خطوة محورية نحو تعزيز الاستخدام التجاري للإنزيمات، بما يسهم في دفع عجلة الابتكار العلمي والصناعي في هذا المجال الحيوي.

المراجع

[1]M. Chaplin & C. Bucke. *Enzyme Technology.* Cambridge University Press. (1990).

[2]T. Palmer & P. Bonner. *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry.* Woodhead Publishing. (2007).

[3] R. Scopes. *Protein Purification: Principles and Practice* (3rd ed.). Springer. (1994).

[4]M. Harrison, Mechanical Cell Disruption: Principles and Applications, Springer, 2018.

[5]T. Ahmad, A. Ismail, S. Ahmad, K. Khalil, T. Leo, E. Awad, A. Sazili.Effects of Ultrasound-Assisted Extraction on Gelatin Properties.Molecules, 23(4), 730, 2018.

[6] M, Rao, A, Tanksale, M, Ghatge, V, Deshpande, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, Microbiology and molecular biology reviews, 4, 3, 597-635, 1998.

[7] Scopes, R. K., Protein Purification: Principles and Practice, 4th Edition, Springer, 2020.

[8] K, Klibanov, "Ultrasound contrast agents: Development of the field and current status", Topics in Current Chemistry, 222, 1, 73-106, 2001.

[9]G, Gupta, M, Khare, "A study on air quality in urban environments with respect to vehicular pollution", Environmental Monitoring and Assessment, 156, 1-2, 253-262, 2009.

[10]P, Paiva, R, Reis, M, Marques, "Natural origin scaffolds for tissue engineering applications", Journal of Biomaterials Applications, 28, 4, 437-452, 2014

[11]Crowe, J. H., et al. (1998). "The role of trehalose in protein stabilization during freeze-drying." Cryobiology, 37(2), 171-186.

[12] Lee, J. C., & Timasheff, S. N. (1981). "The stabilization of proteins by sucrose." Journal of Biological Chemistry, 256(14), 7193-7201.

[13] Chang, G., et al. (2020). Enzyme Stability in Nanoparticle Preparations Part 1: Bovine Serum Albumin Improves Enzyme Function. International Journal of Nanomedicine, 15, 123–135.

[14] M. Cheryan. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. 3rd Edition. CRC Press, 2022.

[15] P.M. Cummins, K.D. Rochfort, B.F. O'Connor. Protein Chromatography: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 1485. Humana Press, 2017.

[16] E. L. Smith, H. Zhang, Y. Chen, "Advanced Protein Precipitation Techniques Using Ammonium Sulfate: Optimization and Applications", Journal of Chromatography B, vol. 1205, no. 1, pp. 123-134, 2022.

[17] H. Zhang, Y. Wang, "Salting-Out Precipitation for Large-Scale Enzyme Purification: Case Studies from Biopharmaceutical Industry", Biotechnology Advances, vol. 65, no. 1, pp. 1-15, 2023.

[18] L. Chen, R. T. Johnson, A. Lee, "Precision Salting-Out for Rare Protein Isolation: A High-Throughput Approach", Scientific Reports, vol. 14, no. 1, pp. 5678-5689, 2024.

[19] R. T. Johnson, A. Lee, "Molecular Mechanisms of Protein Salting-Out: A Comprehensive Review", Biophysical Reviews, vol. 13, no. 4, pp. 789-802, 2021.

[20] L. Hagel, G. Jagschies, G. Sofer, "Handbook of Process Chromatography: Development, Manufacturing, Validation and Economics", Academic Press, 1, 1, 1-500, 2021.

[21] S. R. Gallagher, "One-Dimensional Gel Filtration Chromatography", Current Protocols in Protein Science, 13, 1, 8.3.1-8.3.30, 2008.

[22] P. Andrews, "Estimation of Molecular Weights of Proteins by Sephadex Gel Filtration", Biochemical Journal, 91, 2, 222-233, 1964.

الفصل الثالث

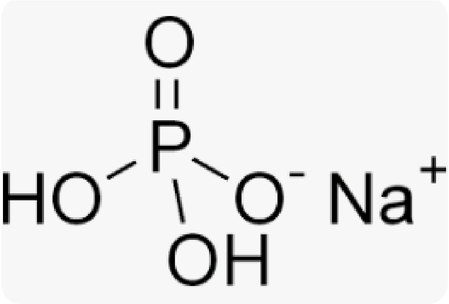
المواد والأدوات المستعملة

1.المواد والأدوات المستعملة

1.1.المواد المستعملة

- **فوسفات أحادي الصوديوم (NaH_2PO_4)**

فوسفات أحادي الصوديوم، المعروف أيضًا باسم فوسفات الصوديوم أحادي القاعدة أو فوسفات ثنائي هيدروجين الصوديوم، هو مركب كيميائي يُصنّف ضمن أملاح الفوسفات المحتوية على الصوديوم. صيغته الجزيئية هي NaH_2PO_4، وكتلته المولية تبلغ 119.98 جرام/مول. يظهر المركب في الحالة الصلبة على شكل بلورات بيضاء عديمة الرائحة، قابلة للذوبان في الماء وتمتلك خاصية امتصاص الرطوبة من الجو. [1]



الشكل 01: الصيغة الكيميائية لفوسفات أحادي الصوديوم وحالته الفيزيائية.

الجدول 01: بطاقة تعريفية لفوسفات أحادي الصوديوم.

العنصر	المعلومات
الاسم النظامي IUPAC	Sodium dihydrogen phosphate
الاسم التجاري	Monosodium phosphate
أسماء أخرى متداولة	فوسفات الصوديوم أحادي القاعدة، فوسفات هيدروجين الصوديوم
الصيغة الكيميائية	NaH_2PO_4
الاختصار	MSP
الوظيفة	منظم حموضة Ph، مضاف غذائي، مادة منظمة ومعالجة
الحالة الفيزيائية	صلب بلوري
المظهر الخارجي	بلورات بيضاء ناعمة
الرائحة	عديم الرائحة
الكتلة الجزيئية المولية	119.98 غ/مول
الكثافة	2.36غ/مل من الماء المقطر
نقطة الانصهار	170°C

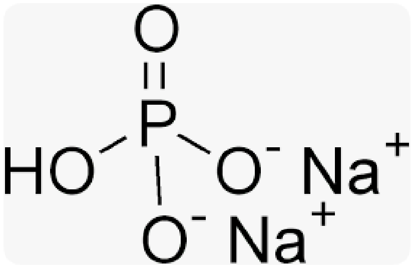
pHدرجة الحموضة	5.0-4.1 (في المحاليل المائية بتركيز 1%)
الذوبانية في الماء	عالية (85غ/100 مل)
الاستقرار	مستقر في الظروف العادية ويتحلل عند التسخين الشديد
عدم التوافق	لايخلط مع المؤكسدات القوية

- **فوسفات ثنائي الصوديوم (Na_2HPO_4)**

فوسفات ثنائي الصوديوم هو مركب غير عضوي ينتمي إلى عائلة فوسفات الصوديوم، ويتكون من ذرتي صوديوم (Na^+) مرتبطة بأنيون فوسفات الهيدروجين (HPO_4^{2-}) صيغته الجزيئية Na_2HPO_4، ويظهر على شكل مسحوق أو بلورات بيضاء عديمة اللون، قابلة للذوبان في الماء ولكن غير قابلة للذوبان في الكحول. [2]

يتواجد هذا المركب غالبًا في صورة لا مائية أو على شكل أملاح مائية مثل:

- $Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$ (ثنائي الماء)
- $Na_2HPO_4{\cdot}7H_2O$ (سباعي الماء)
- $Na_2HPO_4{\cdot}12H_2O$ (ثنائي عشر الماء)



الشكل 02: الصيغة الكيميائية والحالة الفيزيائية لفوسفات ثنائي الصوديوم.

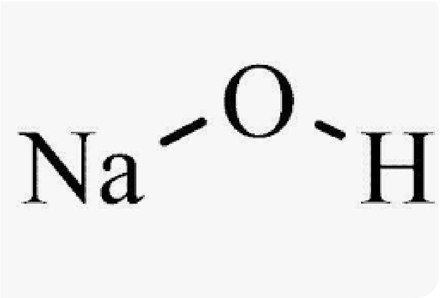
الجدول 02: بطاقة تعريفية لفوسفات ثنائي الصوديوم.

العنصر	المعلومات
الاسم النظامي IUPAC	Sodium hydrogen phosphate
الاسم التجاري	Disodium Phosphate
أسماء أخرى متداولة	Disodium hydrogen orthophosphate,Sodium phosphate dibasic
الصيغة الكيميائية	Na_2HPO_4
الاختصار	DSP

الوظيفة	يُستخدم كمنظم pH، ملين دوائي، مادة مضافة غذائية، مادة حافظة، مانع ترسيب، سماد، ومساعد في معالجة المياه.
الحالة الفيزيائية	صلب
المظهر الخارجي	مسحوق أو بلورات صلبة بيضاء
الرائحة	عديم الرائحة
الكتلة الجزيئية المولية	141.96 غ/مول
الكثافة	2.07 غ/مل
نقطة الانصهار	250°C
درجة الحموضةpH	9.6-8.4 (في المحاليل المائية بتركيز 1%)
الذوبانية في الماء	7.7غ/100مل عند 20°C
الاستقرار	مستقر في الظروف العادية من الضغط ودرجة الحرارة
عدم التوافق	يتفاعل مع الأحماض القوية، وبعض المؤكسدات، وقد يكوّن غازات مهيجة أو مواد متحللة ضارة عند التسخين

- **هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)**

هو مركب غير عضوي قوي القلوية، يُعد من المواد الكيميائية الأساسية في الصناعة والمختبرات. له الصيغة الكيميائية (**NaOH**)، يتميز بكونه مادة صلبة بيضاء عديمة الرائحة، تذوب بسهولة في الماء مُطلِقة حرارة كبيرة، مما يجعل تفاعله مع الماء ناشرا للحرارة. يعرف باسم الصودا الكاوية أو الليّ (Lye). درجة ذوبانه في الماء عالية جداً. ويعتبر هيدروكسيد الصوديوم المصدر الأساسي في صناعة ملح الطعام (كلوريد الصوديوم). وهو مادة متميعة، أي انها تمتص بخار الماء من الهواء الجوي. [1]



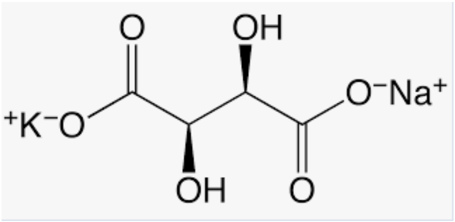
الشكل 03: الصيغة الكيميائية لهيدروكسيد الصوديوم وحالته الفيزيائية.

الجدول 03: بطاقة تعريفية لهيدروكسيد الصوديوم.

العنصر	المعلومات
الاسم النظامي IUPAC	Sodium hydroxide
الاسم التجاري	Lye, Caustic Soda
الصيغة الكيميائية	NaOH
الوظيفة	يستخدم في صناعة الصابون والمنظفات، معالجة المياه، صناعة الورق، المواد الكيميائية، تنظيف الأنابيب، تصنيع الألياف الصناعية، تكرير النفط، إزالة الشحوم، وتنظيم درجة الحموضة في محطات معالجة المياه
الحالة الفيزيائية	صلب في درجة حرارة الغرفة
المظهر الخارجي	صلب بلوري أبيض أو كريات أو رقائق، محلول شفاف عديم اللون عند الذوبان في الماء
الرائحة	عديم الرائحة
الكتلة الجزيئية المولية	39.9971 غ/مول
الكثافة	2.13 غ/مل
نقطة الانصهار	318 °C
درجة الحموضةpH	أكبر من 13
الذوبانية في الماء	111غ/100مل عند 20°C
الاستقرار	مستقر تحت الظروف العادية، يمتص الرطوبة وثاني أكسيد الكربون من الهواء (مادة متميعة)
عدم التوافق	يتفاعل بعنف مع الأحماض القوية، المعادن القابلة للاحتراق (مثل الألمنيوم)، والمركبات العضوية القابلة للاشتعال

- **طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$)**

طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم، المعروف أيضًا باسم ملح روشيل أو ملح سينيت، هو ملح مزدوج لحمض الطرطريك. صيغته الكيميائية هي $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ في شكله رباعي الهيدرات، وكتلته المولية 282.22 غ/مول، يعتبر مركب كيميائي أساسي، يحظى بتقدير خاص في الكيمياء التحليلية والكيمياء الحيوية لخصائصه المميزة. [3]



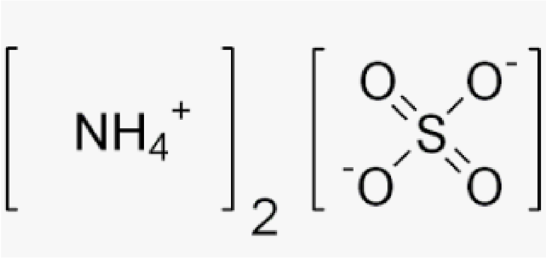
الشكل 04: الصيغة الكيميائية والحالة الفيزيائية لطرطرات الصوديوم والبوتاسيوم.

الجدول 04: الخصائص الفيزيوكيميائية لطرطرات الصوديوم والبوتاسيوم.

العنصر	المعلوومات
المظهر الخارجي	مسحوق بلوري أبيض وعديم الرائحة
الذوبانية	يذوب بسهولة كبيرة في الماء (73غ/100مل)، ولكنه قليل الذوبان في الإيثانول [4]
الكثافة	1.77غ/مل
نقطة الانصهار	70°-80°م
الرقم الهيدروجيني (pH)	محاليله المائية قلوية قليلاً (pH يتراوح بين 7.0 و8.5)
الاستقرار	مستقر في الظروف العادية، لكنه يفقد ماء تبلوره عند درجات حرارة معتدلة (70-80 درجة مئوية).
خصائص مميزة	مادة كهروإجهادية (بيزوإلكتريك)، مما يعني أنه يمكن أن يولد شحنة كهربائية تحت إجهاد ميكانيكي.
الاستخدامات الرئيسية	يدخل في تركيب كاشف فهلينغ وكاشف بيوريت، يستخدم في بلورة البروتينات، معيار مهم لمعايرة كارل فيشر. [5]

- **كبريتات الأمونيوم [$(NH_4)_2SO_4$]**

كبريتات الأمونيوم أو كبريتات ثنائية الأمونيوم وما يعرف أيضا بسلفات الأمونيوم هو ملح غير عضوي شائع جدًا يتم تحضيره بتفاعل الأمونيا مع حمض الكبريتيك ويمكن إنتاجه أيضًا كمنتج ثانوي في صناعات أخرى مثل إنتاج الكابرولاكتام أو من غازات أفران فحم الكوك وله الصيغة الكيميائية **$(NH_4)_2SO_4$**. يتكون من أيونات الأمونيوم (NH_4^+) وأيونات الكبريتات(SO_4^{2-})، ذو كتلة مولية 132.14غ/مول وثافته 1.77غ/مل ونقطة انصهاره 280°م. [6]



الشكل 05: الصيغة الكيميائية والحالة الفيزيائية لكبريتات الأمونيوم.

الجدول 05: الخصائص الفيزيوكيميائية لكبريتات الأمونيوم.

العنصر	المعلومات
المظهر الخارجي	بلورات عديمة اللون
الذوبانية	شديد الذوبان في الماء (75.4 غ/100 مل ماء عند 20°م)، وغير قابل للذوبان في الكحول والإيثانول.
الرقم الهيدروجيني (pH)	محاليله المائية حمضية (5.5 لمحلول 0.1 M)
الاستقرار	مستقر في الظروف العادية. يتفكك عند التسخين فوق 250°م.
الاستخدامات الرئيسية	في الزراعة لتوفير المغذيات وتعديل التربة (سماد ممتاز)، وفي المختبرات لتنقية البروتينات (ترسيب البروتينات من المحاليل)

- **يوديد البوتاسيوم (KI)**

يوديد البوتاسيوم (Potassium Iodide) هو ملح من أملاح اليوديد الأكثر شيوعًا (مركب غير عضوي)، له الصيغة الكيميائية **KI**، بكتلة مولية 166 غ/مول. يُمكن تحضير يوديد البوتاسيوم عن طريق تفاعل هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH) أو كربونات البوتاسيوم مع اليود أو بطرق أخرى تتضمن تفاعل اليود مع كبريتيد الهيدروجين ثم تحييد الناتج [7].

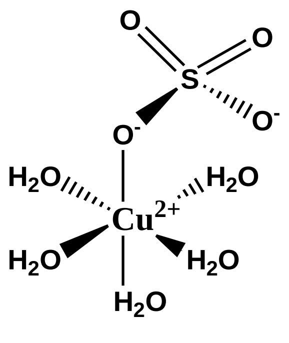
الشكل 06: الحالة الفيزيائية ليوديد البوتاسيوم.

الجدول 06: الخصائص الفيزيوكيميائية ليوديد البوتاسيوم.

العنصر	المعلومات
المظهر الخارجي	بلورات بيضاء أو مسحوق بلوري أبيض، عديم الرائحة
الذوبانية	شديد الذوبان في الماء (140 غ/100 مل)، كما يذوب في الكحول والجليسرين والأسيتون
الكثافة	3.123غ/مل
نقطة الانصهار	681°م
الرقم الهيدروجيني (pH)	محاليله المائية متعادلة إلى قلوية قليلاً (7-8 لمحلول بتركيز 5%)
الاستقرار	مستقر تحت الظروف العادية، ولكنه يتأكسد ببطء في الهواء الرطب وضوء الشمس، ف يجب تخزينه في أوعية محكمة الإغلاق وبعيدًا عن الضوء.
الاستخدامات الرئيسية	في المختبرات الكيميائية ككاشف مهم، وفي المجال الطبي لحماية الغدة الدرقية وعلاج الأمراض المرتبطة باليود وكذلك في صناعة أدوية الحيوانات.

- **كبريتات النحاس المميهة ($CuSO_4.5H_2O$)**

كبريتات النحاس المميهة (Hydrated Copper Sulfate)، والمعروفة بشكل شائع باسم كبريتات النحاس خماسي الهيدرات أو الزاج الأزرق (Blue Vitriol)، هي الشكل الأكثر شيوعًا لكبريتات النحاس. صيغتها الكيميائية هي **$CuSO_4.5H_2O$** بكتلة مولية تقدر ب 249.68 غ/مول ويعود لونها الأزرق الزاهي المميز إلى وجود خمس جزيئات من الماء مرتبطة بأيونات النحاس في شبكتها البلورية [1].



الشكل 07: الصيغة الكيميائية والحالة الفيزيائية لكبريتات النحاس المميهة.

الجدول 07: الخصائص الفيزيوكيميائية لكبريتات النحاس المميهة.

العنصر	المعلومات
المظهر الخارجي	بلورات زرقاء زاهية وشفافة

الذوبانية	شديدة الذوبان في الماء (31.6 غ/100 مل ماء عند 0 درجة مئوية؛ تزداد الذوبانية مع ارتفاع درجة الحرارة)، وهي غير قابلة للذوبان في الإيثانول النقي.
الكثافة	2.284غ/مل
نقطة الانصهار	150 °م
الرقم الهيدروجيني (pH)	محاليله المائية حمضية، 3.8-4.0 لمحلول 5%
الاستقرار	عند التسخين، تفقد جزيئات الماء تدريجيا، لتتحول إلى كبريتات نحاس لا مائية بيضاء أو رمادية اللون.
الاستخدامات الرئيسية	في الزراعة كعامل وقائي ضد الفطريات والطحالب، وفي المختبرات ككاشف مهم (بيوريت، فهلنفغ).

- **أمعاء الدجاج**

تم تجميع أمعاء طازجة للدجاج الأبيض المخصص لإنتاج اللحم من نقطة بيع وذبح للدجاج في ولاية سكيكدة وتم تنظيفه وحفظه في المجمد.

الشكل 08: أمعاء الدجاج.

- **أنزيمات هضمية مستخلصة (محلول أنزيمي).**
- **سائل غسيل تقليدي (بدون أنزيمات) دوريفليور.**
- **ماء مقطر.**

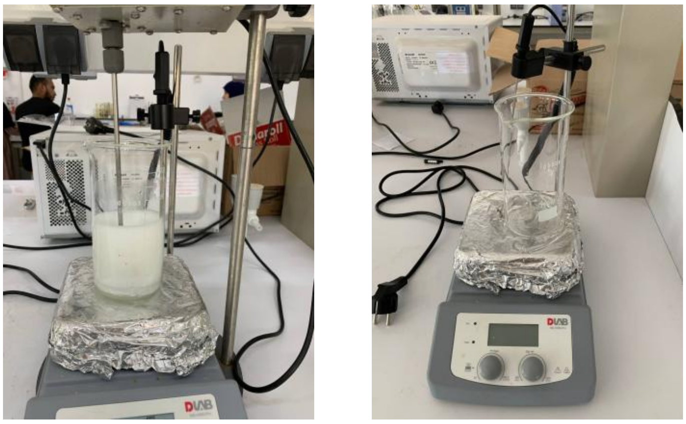
2.2.1.الأدوات والأجهزة المستعملة

- **جهاز محاكاة الغسالة (خلاط ميكانيكي)**

يُعدّ "جهاز محاكاة الغسالة المخبري في شكل خلاط ميكانيكي مع بيشر" إعدادًا بسيطا وفعالا لتقييم أداء المنظفات أو عملية الغسيل في بيئة مخبرية(مصغرة). يهدف هذا الجهاز إلى محاكاة الحركة الميكانيكية للغسالة، مما يسمح بالتحكم الدقيق في العوامل المؤثرة على الغسيل كنوع المنظف، ودرجة الحرارة، ومدة

الغسيل(التحريك)، وأنواع البقع. يقلل هذا التركيب من التكاليف والوقت مقارنة باستخدام غسالات حقيقية، ويتكون من:

- **بيشر (Beaker):** يمثل حوض الغسيل المصغر.
- **خلاط ميكانيكي (Mechanical Stirrer/Mixer):** يوفر التحريك الميكانيكي لمحاكاة حركة الغسيل.
- **عناصر إضافية:** لوحة تسخين للتحكم في درجة الحرارة (حوالي 40°م)، وحامل لتثبيت المكونات، وعينات قماش (7*7 سم) عليها بقع قياسية.



الشكل 09: جهاز محاكاة الغسالة (خلاط ميكانيكي).

- **جهاز طحن وتجانس (مفرمة البصل)**

"مفرمة البصل" (أو ما شابهها من أجهزة الطحن المنزلية التجارية الصغيرة)، يمكن استخدامه بالفعل كأداة لفرم وتجنيس المواد البيولوجية مثل أمعاء الدجاج. الغرض من هذه العملية هو تكسير الأنسجة والخلايا لتحرير المكونات الداخلية، بما في ذلك الإنزيمات، التي سيتم استخلاصها لاحقًا. يعمل الجهاز على مبدأ القص الميكانيكي والطحن باستخدام شفرات حادة دوارة. بحيث عند وضع أمعاء الدجاج داخل الجهاز وتشغيله، تقوم الشفرات بتقطيع وتمزيق الأنسجة، مما يؤدي إلى:

- **التقطيع (Chopping):** تقليل حجم القطع الكبيرة من الأمعاء إلى أجزاء أصغر.
- **التجنيس (Homogenization):** مع استمرار الفرم، يتم تكسير جدران الخلايا والأغشية الخلوية، مما يحرر محتوياتها (بما في ذلك الإنزيمات) ويحول المادة إلى خليط شبه سائل أو معجون متجانس.

يتميز الجهاز بكونه يتوفر بسهولة وبتكلفة منخفضة مقارنة بالمعدات المخبرية المتخصصة، وعلى الرغم من بساطته، يمكنه تحقيق مستوى مقبول من التكسير الأولي للأنسجة، وهو خطوة أساسية في عملية استخلاص الإنزيمات. لكن وجب الأخذ بعين الاعتبار أن الإنزيمات هي بروتينات حساسة للحرارة وقد يؤدي الاحتكاك الناتج عن الفرم الميكانيكي السريع إلى ارتفاع درجة الحرارة، مما قد يؤدي إلى تخريب (Denaturation) الإنزيمات وفقدان نشاطها. لذا، يفضل العمل بسرعة أو تبريد الجهاز أو المادة الخام (أمعاء الدجاج) قبل وأثناء الفرم.

الشكل 10: جهاز طحن وتجانس (مفرمة البصل).

- **جهاز pH متر**

جهاز قياس الأس الهيدروجيني (pH meter) هو أداة إلكترونية تُستخدم لقياس درجة الحموضة أو القلوية لمحلول مائي. يعتمد مبدأ عمله على قياس فرق الجهد الكهربائي الناتج عن تركيز أيونات الهيدروجين (H^+) في المحلول. [8]

الجهاز المستعمل في تطبيقاتنا المخبرية من علامة Hanna Hi 5222 ذو الخصائص:

النطاق(Gamme)

- **الأس الهيدروجيني :(pH)** من 2,0- إلى 20,000
- **الجهد الكهربائي (±mV2000,0)**
- **التركيز الأيوني** :مثلًا من 10^{-7} إلى 10 مول، أو من 0,005 إلى 10^5 جزء في المليون(ppm)
- **درجة الحرارة** :من 20,0- إلى 120,0 درجة مئوية / من 4,0- إلى 248,0 درجة فهرنهايت / من 253,15 إلى 393,15 كلفن

الدقة(Résolution)

- الأس الهيدروجيني: pH / 0,01 pH / 0,001 pH0,1
- الجهد الكهربائي: mV0,1
- الأيونات: رقم أو رقمين أو ثلاثة أرقام معتبرة
- درجة الحرارة: 0,1 درجة مئوية / 0,1 درجة فهرنهايت / 0,1 كلفن

درجة الدقة(Précision)

- ±0,01 pH / ±0,002

- ±0,2 mV ± 1
- ±0,5% للأيونات الأحادية التكافؤ
- ±1% للأيونات الثنائية التكافؤ
- ±0,2درجة مئوية / ±0,4 درجة فهرنهايت / ±0,2 كلفن

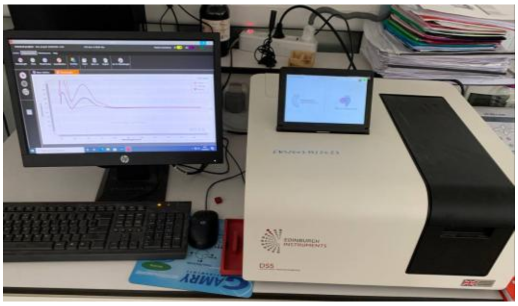
الشكل 11: جهاز الـ pH متر المستعمل.

- **جهاز مطيافية UV-Vis**

جهاز مطيافية UV-Vis هو أداة تحليلية تُستخدم لقياس امتصاص المركبات الكيميائية للأشعة فوق البنفسجية والضوء المرئي ضمن النطاق (190–1100 نانومتر). ويعتمد مبدأ عمله على امتصاص الجزيئات للإشعاع الكهرومغناطيسي،ويُستخدم هذا الجهاز في التحليل الكمي والنوعي للمواد التي تمتص الضوء، ويُعد أداة فعالة لقياس التركيز ودراسة البنية الجزيئية دون إتلاف العينة، مما يجعله واسع الاستعمال في الكيمياء والبيولوجيا والصيدلة. [9]

الجهاز المستعمل في تطبيقاتنا المخبرية من علامة Edinburgh DS5 من خصائصه:

- خيارات نطاق تمرير (Bandwidth) **قابلة للتعديل من قبل المستخدم**0.5 :، 1.0، 1.5، 2.0أو 4.0 نانومتر ضمن نطاق من 190 نانومتر إلى 1100 نانومتر.
- **مسح سريع** :حتى 6000 نانومتر/الدقيقة، لتسهيل تحليل عدد كبير من العينات بسرعة.
- **مزود ببرنامج®Visacle** للتحكم السهل عن طريق الحاسوب.
- **واجهة شاشة لمس حديثة** :مزودة بقوائم ووظائف لضمان سهولة الاستخدام والتحكم المباشر.
- **وسائل تخزين متعددة** :منفذUSB ، بطاقةSD ، وذاكرة داخلية لتخزين الطرق والنتائج واسترجاعها بسهولة.



الشكل 12: جهاز مطيافية UV-Vis.

- **جهاز الطرد المركزي عالي السرعة (High-speed centrifuge)**

هو جهاز مخبري يُستخدم لفصل مكونات المخاليط السائلة اعتمادًا على كثافتها، من خلال تعريضها لقوة طرد مركزية عالية ناتجة عن دوران سريع. يُستخدم هذا النوع من الأجهزة عادة لفصل الجزيئات الخلوية، البروتينات، الأحماض النووية، والمعلقات الدقيقة لذا فهو يُعد ضروريًا في مجالات الكيمياء الحيوية، البيولوجيا الجزيئية، التحاليل السريرية، وتقنيات التحضير الصناعي. [10]

وخلال عملنا، استُخدم جهاز الطرد المركزي عند درجة حرارة 4°م لحماية العينات الحساسة من التلف الحراري، وبسرعة 15000 دورة في الدقيقة (rpm) لضمان فصل دقيق وسريع للمكونات.

الشكل 13: جهاز الطرد المركزي.

- **غرفة للتصوير مجهز ة بمصباح ليد**

لضمان توثيق بصري دقيق ومُوحد لعينات الأقمشة قبل التنظيف وبعده، قمنا بإعداد غرفة تصوير بسيطة باستخدام علبة كرتونية متوسطة الحجم. تم تزويدها بمصباح **LED** لتوفير إضاءة ثابتة وموزعة، وفتحة علوية لتثبيت كاميرا الهاتف والحفاظ على زاوية وبعد تصوير ثابتين. كما أُضيفت فتحة جانبية لإدخال العينات دون التأثير على إعدادات التصوير. هذا التجهيز ساعد في الحصول على صور متطابقة تسهل المقارنة بين العينات.

الشكل 14: غرفة للتصوير مجهز ة بمصباح ليد.

- **كاميرا تصوير العينات**

الكاميرا المستعملة لتصوير العينات مدمجة في هاتف من نوع iPhone XR بدقة 12 ميقا بيكسل

الشكل 15: الكاميرا المستعملة للهاتف الذكي (iPhone XR).

بالإضافة إلى هذه الأجهزة تم استعمال أدوات مخبرية أخرى مثل:

- **زجاجيات:** بياشر (100، 600، 1000 مل...).
- **سكين.**
- **ملعقة صغيرة وكبيرة.**
- **ميزان دقيق.**
- **مقياس حرارة.**
- **ساعة توقيت.**
- **عينات القماش**

قمنا باختيار قماش القطن الأبيض لإنجاز التجارب، نظرًا لكونه مادة نسيجية طبيعية شائعة الاستعمال في الحياة اليومية. تم قص العينات بأبعاد موحدة (7سم × 7سم) لضمان التجانس وتسهيل المقارنة البصرية

والمعالجة الرقمية للصور. بالنسبة لاختيار اللون الأبيض تحديدًا جاء لكونه يبرز التباين في اللون بشكل أوضح عند المعالجة باستخدام البرنامج، مما يُمكّن من تقييم فعالية التنظيف بدقة أكبر.

الشكل 16: عينة قماش القطن بأبعاد متساوية(7سم×7سم).

- **مواد ملوّثة:** دم (بروتينات)، زيت جوز الهند (دهون)، شوكولاتة (سكريات).
- **ألبومين البيض**

ألبومين البيض (Egg Albumin)، ويُعرف أيضًا باسم أوفألبومين (Ovalbumin)، هو البروتين الرئيسي في بياض البيض، حيث يُشكّل حوالي 54% من مجمل البروتينات الموجودة فيه. ينتمي هذا البروتين إلى فئة البروتينات القابلة للذوبان في الماء، ويُعد مصدرا عالي الجودة للأحماض الأمينية الأساسية. ويُستخدم كمادة نموذجية في الكيمياء الحيوية لدراسة سلوك البروتينات، وكذلك في التحاليل مثل الكروماتوغرافيا والهجرة الكهربائية. وأيضا يدخل في صناعة الأغذية كمثبت للرغوة ووسيط استحلاب، والصناعات الدوائية ومواد الطلاء الصديقة للبيئة [11].

2.تحضير المحاليل

- **كاشف بيوريت(Biuret)**

هو كاشف كيميائي يُستخدم لمعايرة واختبار وجود البروتينات في العينة. فعند وجود البروتينات، يتحول لون الكاشف من الأزرق إلى البنفسجي أو البنفسجي الفاتح. ومن أجل تحضيره:

نقوم بإذابة 30غ من NaOH في حوالي 500 مل ماء مقطر ثم نضيف 15غ من طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم (Rochelle salt) إلى المحلول مع التحريك حتى تذوب تمامًا. نضيف بعدها 1.5غ من كبريتات النحاس ($CuSO_4.5H_2O$) تدريجيًا، مع التحريك المستمر، حتى نحصل على لون أزرق موحد. ثم نضيف 5غ من يوديد البوتاسيوم (KI) إلى الخليط مع التحريك حتى الذوبان الكامل ونكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر. في الأخير نقوم بتخزين الكاشف في قارورة داكنة محكمة الإغلاق (لأن Cu^{2+} حساس للضوء ويمكن أن يتغير مع الوقت).

- **تحضير المحاليل المنظمة**

المحلول المنظّم (Buffer Solution) هو محلول يُقاوم التغير في الأس الهيدروجيني (pH) عند إضافة كميات قليلة من حمض قوي أو قاعدة قوية. يتكوّن عادةً من حمض ضعيف وقاعدته المرافقة أو قاعدة ضعيفة

وحمضها المرافق. ولتحضير ثلاث محاليل منظمة ذات أس هيدروجيني (pH) مختلف: 6.4، 7.2، و8، وعلماً أن قيمة pKa المعتمدة في هذا النظام هي: pKa = 7.2، قمنا في هذا العمل، باستخدام نظام فوسفاتي يتكوّن من:

- ✓ NaH_2PO_4 (أحادي فوسفات الصوديوم، الحمض الضعيف).
- ✓ Na_2HPO_4 (ثنائي فوسفات الصوديوم، القاعدة المرافقة).

لحساب نسبة تركيز القاعدة إلى الحمض عند تحضير المحلول المنظم، نستخدم المعادلة التالية:

$$pH = pKa + \log\frac{[B]}{[A]}$$

بحيث: **B** تمثل القاعدة و**A** تمثل الحمض.

إنطلاقا من المعادلة السابقة يمكننا التحصل على الكتل اللازمة لتحضير المحاليل المنظمة ذات pH مختلف (6.4،7.2،8)، ومنه اتبعنا الخطوات التالية لكل محلول:

نقوم بوزن كتلتي NaH_2PO_4 و Na_2HPO_4 بدقة حسب النتائج المتحصل عليها، وإذابتها في قليل من الماء المقطر في حوجلة عيارية (1000مل) ثم أكملنا الحجم بالماء المقطر حتى خط العيار. وقد تم التحقق في كل مرة من pH المحلول باستعمال جهاز ال pH متر.

- **طريقة معايرة البروتينات في العينات**
  - ✓ **تحضير سلسلة المعايرة (Série étalon)**

نحضر مجموعة من الأنابيب تحتوي على تراكيز معروفة من الألبومين ثم نضيف 4 **مل** من كاشف البيوريت إلى كل أنبوب. نمزج جيدا ونترك الأنابيب لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة في الظلام.

الجدول 08: تركيبة سلسلة المعايرة للإنزيمات باستخدام كاشف بيوريت.

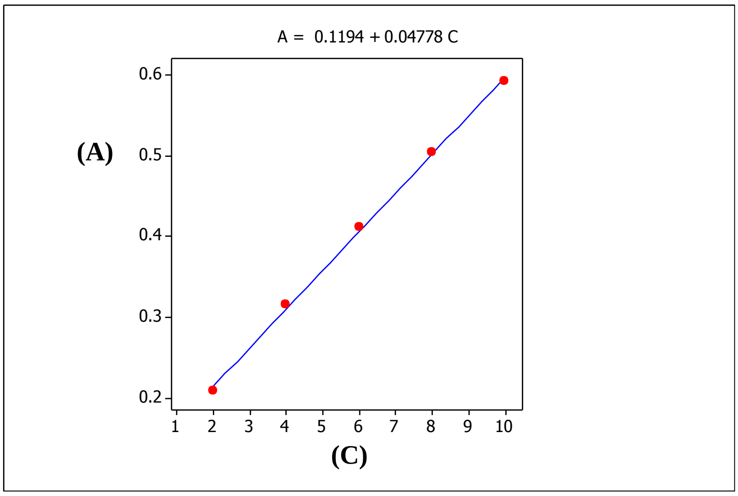
رقم الأنبوب	التركيز ملغ/مل	حجم الماء المقطر مل	حجم الألبومين مل	حجم كاشف بيوريت مل
01	0.0	1.0	0.0	4.0
02	2.0	0.8	0.2	4.0
03	4.0	0.6	0.4	4.0
04	6.0	0.4	0.6	4.0
05	8.0	0.2	0.8	4.0
06	10.0	0.0	1.0	4.0

✓ **قراءة الامتصاص**

نضبط جهاز المطياف على 540 نانومتر. نصفّر الجهاز باستخدام الأنبوب رقم 1 (الشاهد(Blank)، بدون بروتين ثم نقيس الامتصاصية (Absorbance) لكل أنبوب.

✓ **رسم منحنى المعايرة**

على **محور x** : تركيز الألبومين.(mg/mL) و على **محور y** : الامتصاصية **A** نرسم النقاط و الخط البياني.



الشكل 17: منحنى المعايرة

✓ **قياس إمتصاصية العينة المجهولة**

نأخذ 1 مل من عينة الأنزيمات المستخلصة نضيف إليها 4 مل من كاشف البيوريت. بعد 30 دقيقة، نقيس الامتصاصية. من خلال المنحنى البياني، نستخرج تركيز البروتين المجهول بناءً على الامتصاصية.

دراسة تغير شروط عملية الإستخلاص على كمية الإنزيمات المتحصل عليها

قمنا بدراسة تأثير مختلف العوامل في عملية الإستخلاص (حسب الإمكانيات المتاحة) بالاستعانة بالمخططات التجريبية التي تهدف إلى تحسين كمية الإنزيمات المستخلصة.

قمنا من خلال دراستنا بتغيير الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم المستخدمة في عملية الإستخلاص وكذلك زمن التحريك وفقا لنوع المخطط التجريبي المستعمل.

حيث تم تغييرها كالتالي هي:

- **pH المحلول المنظم**

✓ القيمة الأعلى: 8.

✓ القيمة الأدنى: 6.4.

- **زمن الإستخلاص**

✓ القيمة الأعلى: 60 دقيقة.

✓ القيمة الأدنى: 20 دقيقة.

الجدول 09: الجدول يمثل التغير في قيم الـ pH و زمن الإستخلاص.

العامل	القيمة الأدنى	القيمة الأعلى
pH	6.4	8.0
الزمن	20 دقيقة	60 دقيقة

- **ترسيب الإنزيمات**

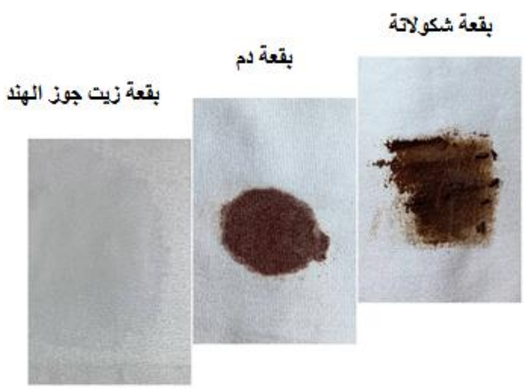
ترسيب الإنزيمات باستعمال كبريتات الأمونيوم $(NH4)_2SO4$ يتم عبر تقليل ذوبانها في الماء بزيادة تركيز الملح، فتصبح غير ذائبة وتترسب. ولإنجاز ذلك نحسب كمية كبريتات الأمونيوم اللازمة من جدول خاص للحصول على تشبع 85% ما يعني ترسيب معظم الإنزيمات مع المحافظة على نشاطها. ثم نضيف هذه الكمية تدريجيًا إلى محلول الإنزيم مع التحريك البارد (عند 4°C). بعد اكتمال الترسيب، نستخدم جهاز الطرد المركزي لفصل الراسب (الإنزيمات) عن السائل المتبقي. ونجمع هذه الإنزيمات ونحفظها في مجمد الثلاجة لاستخدامها لاحقًا.

الشكل 18: الإنزيمات الناتجة عن الترسيب.

- **المحلول الأنزيمي:** يتم إعادة إذابة الإنزيمات المرسبة في الماء المقطر للحصول على محلول معلوم التركيز.
- **سائل الغسيل:** حسب التركيز الموصى به من الشركة المصنعة (3مل من أجل 100مل المحلول الكلي).

3. تحضير الأقمشة

قمنا بتفصيل قماش القطن إلى 9 قطع متساوية (7سم×7سم)، ثم طبقنا عليها بقع قياسية لمختلف أنواع التلوث (دم، زيت جوز الهند، شوكولاطة). وتركنا الأقمشة لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة (لكل نوع تلوث 3 قطع من قماش القطن).



الشكل 19: عينات من قطع قماش القطن الملطخة بمختلف أنواع الملوثات.

- **تقسيم الأقمشة إلى 3 مجموعات**

✓ **المجموعة 1:** الشاهد (100مل ماء مقطر فقط).
✓ **المجموعة 2:** سائل الغسيل فقط(3مل).
✓ **المجموعة 3:** سائل الغسيل(3مل) + الأنزيمات(0.5%).

4. خطوات الغسيل

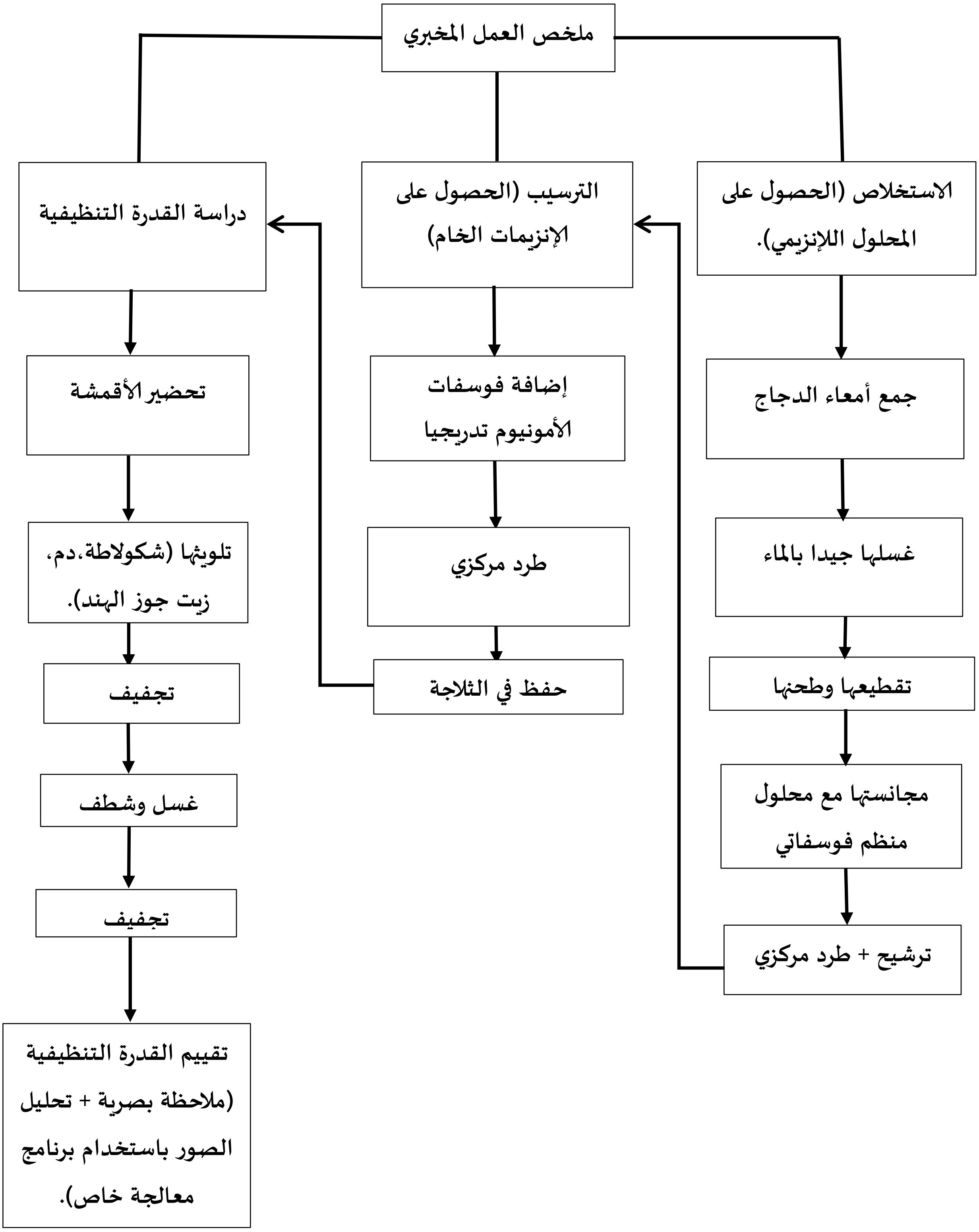
✓ توضع الأقمشة في بيشر.
✓ تُضاف المحاليل المناسبة حسب كل مجموعة.
✓ درجة حرارة الغسيل: 40 درجة مئوية.
✓ مدة الغسيل: 30 دقيقة.
✓ شطف الأقمشة بالماء المقطر لمدة (10 دقائق).
✓ تجفيف الأقمشة في درجة حرارة الغرفة.

5. طريقة تقييم القدرة التنظيفية:

تم تقييم القدرة التنظيفية باستعمال التحليل البصري لصور العينات حيث قمنا بـ:

- تحديد الصور للعينات المختلفة قبل و بعد التنظيف
- التحليل النوعي (البصري): و ذلك بمقارنة مباشرة بين الصورتين المأخوذتين لعينة معينة قبل و بعد التنظيف مع تسجيل الملاحظات:
  - هل اختفت البقعة تمامًا؟
  - هل هناك أي بقايا أو آثار ظاهرة؟
  - هل هناك أي تغير في لون القماش بعد المعالجة؟
- التحليل الكمي (عبر معالجة الصور):

- تحويل الصور إلى تدرج الرمادي.
- حساب متوسط كثافة البكسل (قيم الرمادي) في العينة باستعمال برنامج Image J، كلما كانت البقعة أغمق، انخفض متوسط الكثافة.



الشكل 20: مخطط ملخص للعمل المخبري.

المراجع :

[1] National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 23672064, Monosodium phosphate. Retrieved July 2, 2025

[2]Elsevier. (n.d) .ScienceDirect.

[3] National Center for Biotechnology Information. (n.d.). NCBI guide. U.S. National Library of Medicine.

[4] Ataman Kimya. (n.d.). Sayfalar

[5] Vedantu. (n.d.). Vedantu.

[6] U.S. Environmental Protection Agency. (n.d.). EPA.

[7] Byju's. (n.d.). Chemistry.

[8] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (n.d.). IUPAC Compendium of Chemical Terminology: Gold Book.

[9] S., Douglas A., H., F. James, & C., Stanley R. *Principles of Instrumental Analysis* (7th ed). Cengage Learning. (2017)

[10] Denagene Tajhiz. (n.d.). Denagene (Arabic version).

[11] Altibbi. (n.d.). Altibbi.

الفصل الرابع

عرض النتائج ومناقشتها

1.المقدمة

في هذا الفصل سنقوم بعرض جميع النتائج المتحصل عليها وفقا للبروتوكول التجريبي الموضح في الشكل حيث قمنا بدراسة تأثير العوامل التجريبية pH الوسط وزمن الإستخلاص على كمية الأنزيمات المستخلصة بالإضافة إلى تطبيق هذه الأخيرة في عملية التنظيف مع تقييم قدرتها التنظيفية و مقارنتها مع منظف تجاري خالٍ من الإنزيمات.

2. نتائج تأثير الزمن والأس الهيدروجيني على استخلاص الإنزيمات

تم تقييم تأثير متغيرين رئيسيين على كفاءة استخلاص الإنزيمات الهضمية من أمعاء الدجاج، وهما الـ (pH) وزمن الإستخلاص (t min) حيث تم تغييرها وفق المخطط التجريبي (عاملي كامل) كالتالي هي:

- **pH المحلول المنظم**
  - ✓ القيمة الأعلى: 8.
  - ✓ القيمة الأدنى: 6.4.
- **زمن الإستخلاص**
  - ✓ القيمة الأعلى: 60 دقيقة.
  - ✓ القيمة الأدنى: 20 دقيقة.

وتم قياس تركيز الإنزيمات المستخلصة في كل حالة. حيث أظهرت النتائج ما يلي:

الجدول 01: نتائج استخلاص الأنزيمات لمختلف التجارب المبرمجة حسب مخطط التجربة المستخدم

رقم التجربة	pH		الزمن t بالدقيقة		تركيز الإنزيمات (mg/ml)
	قيم مشفرة	قيم غير مشفرة	قيم مشفرة	قيم غير مشفرة	
01	-1	6.4	-1	20	2.874
02	+1	8.0	-1	20	5.291
03	-1	6.4	+1	60	5.017
04	+1	8.0	+1	60	6.617
05	0	7.2	0	40	3.921
06	0	7.2	0	40	4.255
07	0	7.2	0	40	3.711

في هذه الدراسة قمنا بنمذجة العلاقة بين قوة التنظيف(Y1) وتراكيز المواد الفعالة بالاستعانة بمخططات التجارب. قمنا باختيار مخطط التجربة: عاملي كامل و ذلك للمزايا التي يقدمها. عدد التجارب المجرات يساوي k2تجربة، k: يمثل عدد العوامل المؤثرة و العدد 2 يمثل عدد القيم المتغيرة لكل عامل.

الشكل 01: نطاق تغير العامل المؤثر محصور بين المستوى المنخفض (-1) والمستوى العالي (+1)

يمكننا مخطط التجارب من نمذجة التجارب للحصول على كثير حدود من الدرجة الأولى من الشكل:

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \cdots$$

حيث:

- yهي الاستجابة أو كمية الهدف. يتم قياسه أثناء التجربة ويتم الحصول عليه بدقة معينة.
- xiيمثل المستوى المخصص للعامل i بواسطة المجرب لإجراء الاختبار. هذه القيمة معروفة.
- a_0،a_i ،a_{ij} هي معاملات النموذج الرياضي المعتمد. وهي غير معروفة ويجب حسابها من نتائج التجارب.

محطط التجربة عاملي كامل له عدة مزايا أهمها:

- تصميمات العوامل الكاملة سهلة البناء
- حساب التأثيرات والتفاعلات بسيط للغاية ولا يتطلب أدوات كمبيوتر متقدمة.
- تفسير النتائج في متناول أي مجرب ولا يتطلب إحصاءات متعمقة.
- النمذجة الرياضية فورية.

بالنسبة لدراستنا تحصلنا على النموذج الرياضي التالي (باستعمال القيم المشفرة):

$$C(mg/ml) = 4.9497 + 1.0042\,pH + 0.8672t - 0.2040\,pH * t$$

1.2. تحليل احصائي للنتائج

للحصول على النتائج المراد الوصول اليها قمنا باستعمال برمجية MINITAB الطبعة رقم 14 ، حيث تم تلخيص النتائج في الجدول 2.

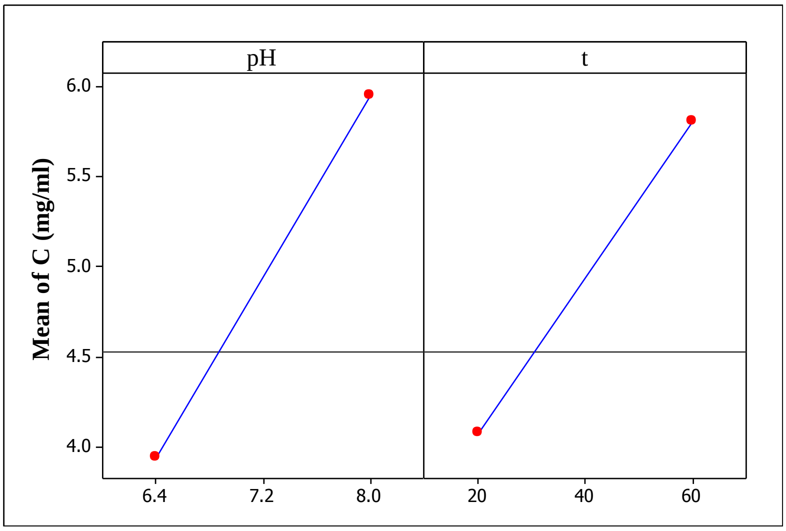
الجدول 02: معاملات وأفعال تأثير الزمن والأس الهيدروجيني على استخلاص الإنزيمات.

	العامل	فعل التأثير	*الإحتمالية P
الثابت	4.9497		0.001
pH	+1.0042	2.0084	0.018
T	+0.8672	1.7344	0.024
pH*t	-0.2040	-0.4080	0.275

*: p تمثل إحتمالية الخطأ

يُظهر هذا النموذج أن كلا العاملين لهما تأثير إيجابي على تركيز الإنزيمات المستخلصة، 2.0084 و 1.7344 لكل من الأس الهيدروجيني و الزمن على التوالي ،ولهما تأثير مهم في مجال الدقة 95% حيث إحتمالية الخطأ في هذا المجال هي 1.8 % و 2.4% بالنسبة للأس الهيدروجيني و الزمن على التوالي. إلا أن التفاعل بينهما لا يساهم في تحسين الاستجابة حيث أن إحتمالية خطأ كبيرة تساوي 27.5%.

قمنا كذلك في هذه التجربة بتلخيص نتائج تأثير الزمن والأس الهيدروجيني على استخلاص الإنزيمات في الشكل **02**.



الشكل 02: تأثير الزمن والأس الهيدروجيني على استخلاص الإنزيمات.

2.2. تأثير الزمن وpH

أظهرت النتائج أن زيادة الزمن من 20 إلى 60 دقيقة ترافق مع تحسن تدريجي في كمية الإنزيمات المستخلصة، ويُعزى ذلك إلى أن الزمن الأطول يُتيح تفاعلًا أعمق بين المحلول المنظم والنسيج الحيوي، مما يسمح بتحرر أكبر للإنزيمات من الأمعاء.

من جهة أخرى، لوحظ أن الأس الهيدروجيني يؤثر بشكل واضح على كفاءة الاستخلاص، حيث أن الوسط القاعدي الخفيف (pH = 8) كان الأنسب، وحقق أعلى مردود. هذا يتماشى مع طبيعة الإنزيمات الهضمية التي تعمل في الأمعاء الدقيقة، حيث يكون الوسط قاعديًا نسبيًا ، كما يساهم ذلك في ثبات البنية الثلاثية للإنزيمات في هذا النطاق من pH ، مما يقيها من التحلل أو فقدان النشاط.

أما عندpH 6.4 ، فمن المرجح أن الوسط الحمضي نسبيًا قلّل من استقرار الإنزيمات أو أدى إلى تفككها الجزئي، مما قلل من مردودية الاستخلاص.

بالتالي، فإن أفضل شروط الاستخلاص تم تحقيقها عند:

pH = 8

زمن = 60 دقيقة

وهذه النتائج تم اعتمادها كأساس في التحضير النهائي للأنزيمات التي تم استخدامها لاحقًا في اختبار الكفاءة التنظيفية.

3. نتائج وتقييم القدرة التنظيفية للأنزيمات:

تم اختبار القدرة التنظيفية للأنزيمات المستخلصة من أمعاء الدجاج عبر دمجها مع منظف ملابس سائل، ومقارنتها مع منظف عادي وشاهد يحتوي على ماء مقطر فقط. تم استخدام قطع قماش قطنية بيضاء (7×7 سم) ملطخة بثلاث أنواع من البقع: الدم، الشوكولاتة، وزيت جوز الهند.

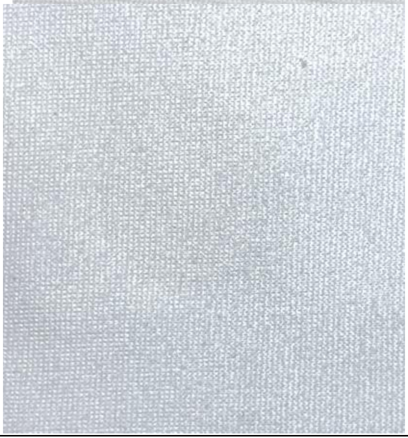
تم تقييم الكفاءة التنظيفية بطريقتين:

- **الطريقة الأولى:**

باستعمال المقارنة المباشرة بالعين المجردة و ذلك بمراقبة البقة : إذا ماأزيلت تماما أو جزئيا شكل (03، 04، 05) . بالنسبة للعينات المغسولة بواسطة الأنزيمات لاحظنا زوال كلي للبقع الملوثة مقارنة بالعينات الأخرى التي كانت متفاوتة في الكفاءة. تم تلخيص النتائج في الجدول 03.

الجدول 03: نتائج المقارنة المباشرة لعملية تنظيف البقع

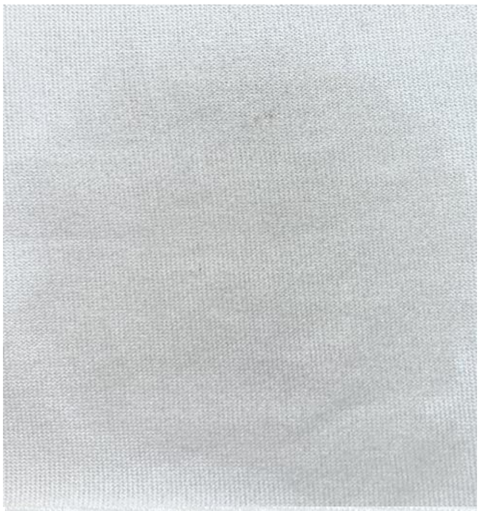
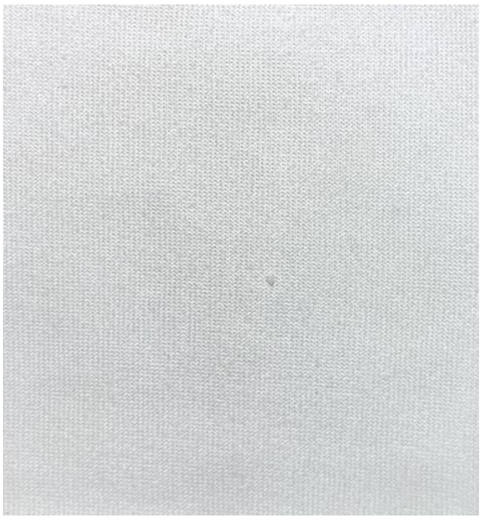
المنظف المستعمل	بقعة الدم	بقعة الشكولاتة	بقعة الزيت
الماء المقطر	إزالة جزئية	بقاء البقعة	بقاء البقعة
منظف تجاري + أنزيمات	إزالة تامة	إزالة تامة	إزالة تامة
منظف تجاري	إزالة حسنة مع بقاء آثار	إزالة جزئية	إزالة حسنة مع بقاء آثار

قطعة القماش المغسولة بـ	قبل التنظيف	بعد التنظيف
الماء المقطر		
سائل الغسيل + مستخلص الأنزيمات 0.5%		
سائل الغسيل التجاري		

الشكل 03: صور لعينات القماش الملطخة ببقع الدم قبل وبعد التنظيف.

قطعة القماش المغسولة بـ	قبل التنظيف	بعد التنظيف
الماء المقطر		
سائل الغسيل + مستخلص الأنزيمات 0.5%		
سائل الغسيل التجاري		

الشكل 04: صور لعينات القماش الملطخة ببقع الشوكولاتة قبل وبعد التنظيف.

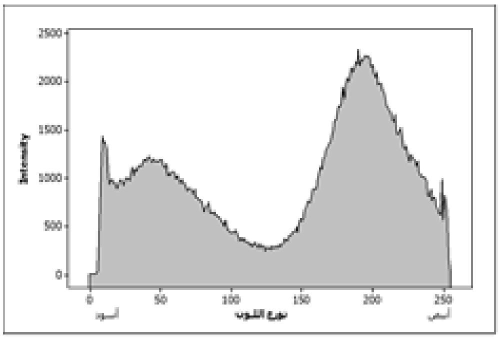
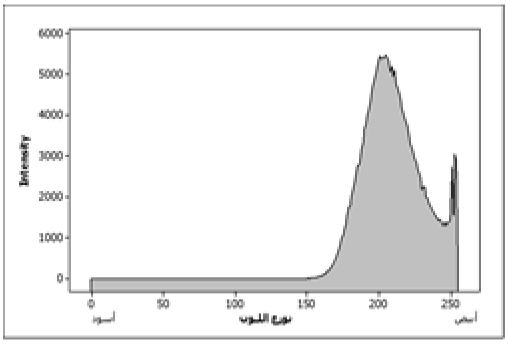
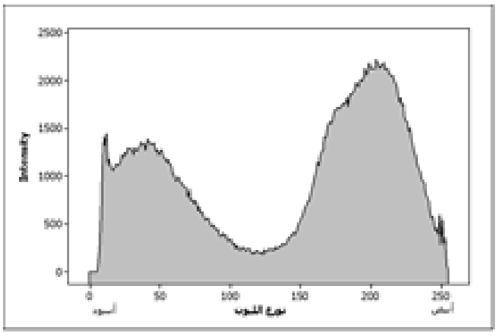
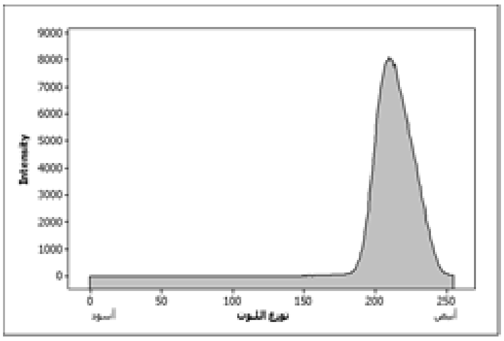
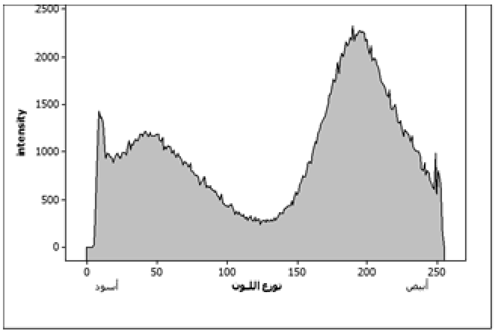
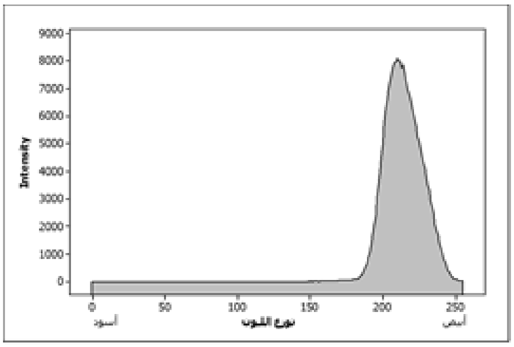
قطعة القماش المغسولة بـ	قبل التنظيف	بعد التنظيف
الماء المقطر		
سائل الغسيل + مستخلص الأنزيمات 0.5%		
سائل الغسيل التجاري		

الشكل 05: صور لعينات القماش الملطخة ببقع زيت جوز الهند قبل وبعد التنظيف.

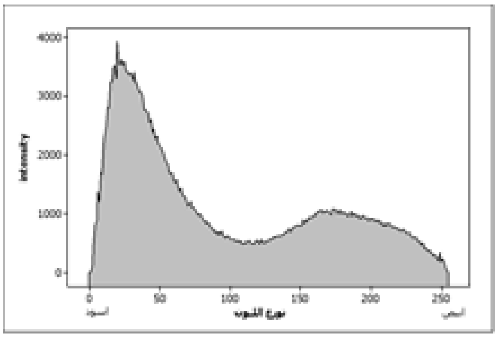
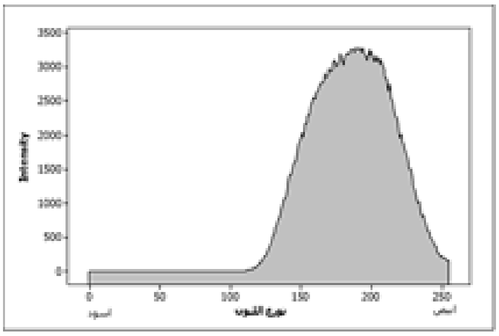
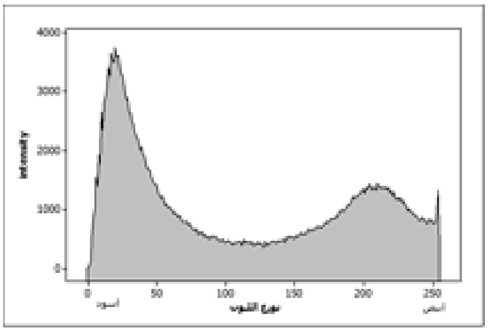
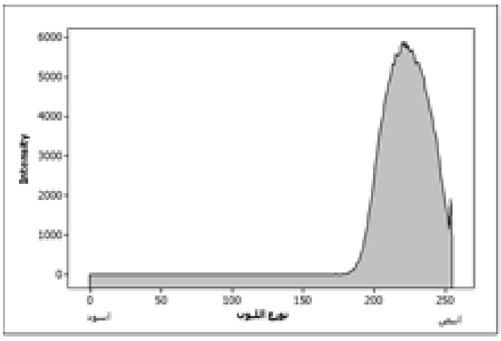
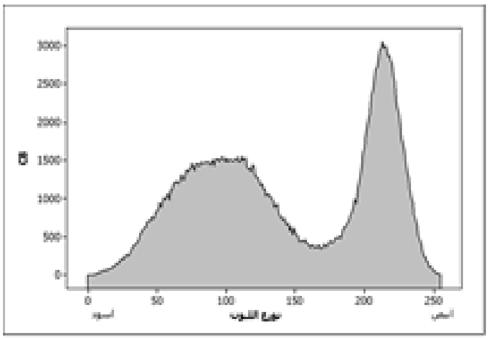
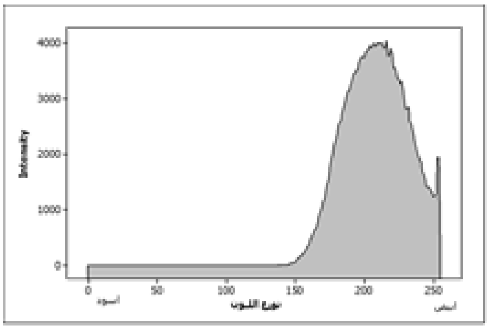
- **الطريقة الثانية :**

بمعالجة الصور الرقمية المأخوذة للعينات بواسطة كاميرا هاتف نقال.

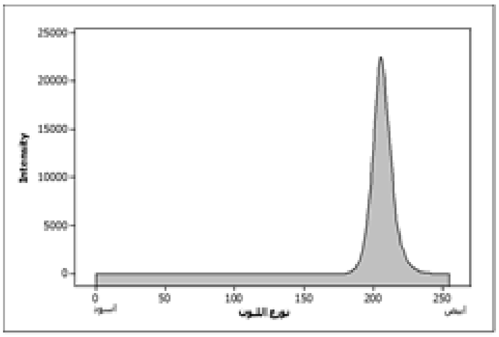
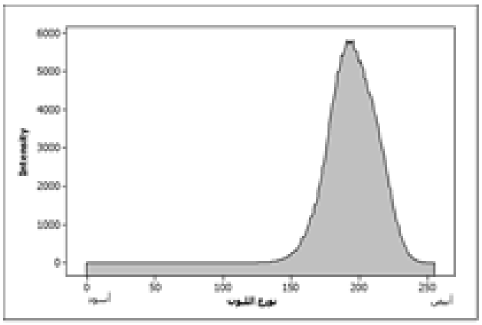
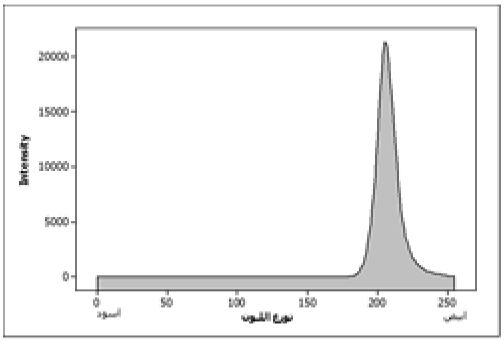
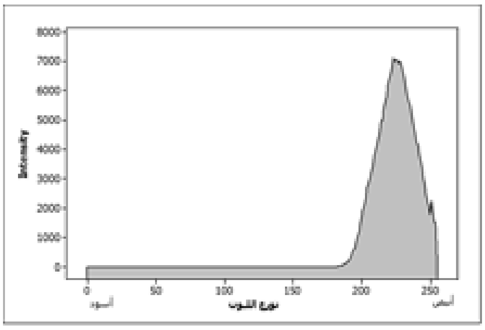
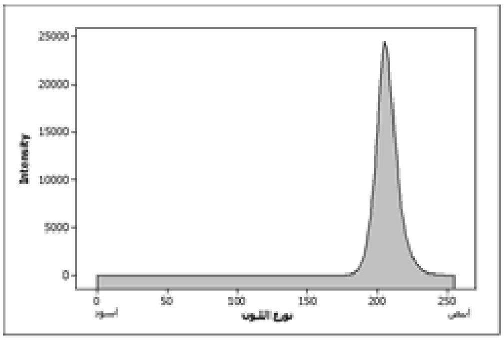
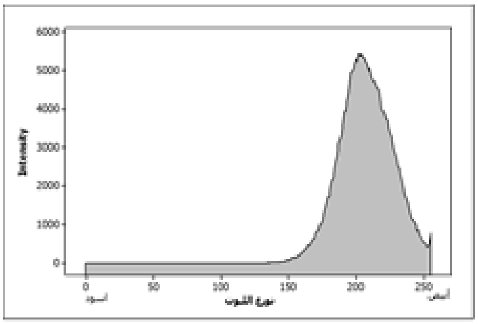
تم التقاط صور للعينات قبل التنظيف وبعده، وتمت معالجتها باستخدام برنامج ImageJ لقياس متوسط التدرج الرمادي (الأشكال 06، 07، 08)، الذي يمثل درجة إزالة البقعة (كلما كان الفرق أكبر بين "قبل" و"بعد"، كلما كانت فعالية التنظيف أفضل).

قطعة القماش المغسولة بـ	قبل التنظيف	بعد التنظيف
الماء المقطر		
سائل الغسيل + مستخلص الأنزيمات 0.5%		
سائل الغسيل التجاري		

الشكل 06: مخططات توزع اللون لعينات القماش الملطخة ببقع الدم قبل و بعد التنظيف.

قطعة القماش المغسولة بـ	قبل التنظيف	بعد التنظيف
الماء المقطر		
سائل الغسيل + مستخلص الأنزيمات 0.5%		
سائل الغسيل التجاري		

الشكل 07: مخططات توزع اللون لعينات القماش الملطخة ببقع الشكولاتة قبل و بعد التنظيف

قطعة القماش المغسولة بـ	قبل التنظيف	بعد التنظيف
الماء المقطر		
سائل الغسيل + مستخلص الأنزيمات 0.5%		
سائل الغسيل التجاري		

الشكل 08: مخططات توزع اللون لعينات القماش الملطخة ببقع زيت جوز الهند قبل و بعد التنظيف

تم التعبير على كفاءة التنظيف بالعلاقة التالية:

$$E\% = \frac{I_{\text{بعد}} - I_{\text{قبل}}}{I_{max} - I_{\text{قبل}}} \times 100$$

حيث:

$E\%$: كفاءة التنظيف بالنسبة المئوية.

$I_{\text{قبل}}$: تمثل متوسط التدرج اللوني قبل التنظيف.

$I_{\text{بعد}}$: تمثل متوسط التدرج اللوني بعد التنظيف.

I_{max} : تمثل متوسط التدرج اللوني للقماش النظيف (لم يلطخ).

الجدول التالي يلخص نتائج معالجة الصور ببرنامج ImageJ و قيم الكفاءة التنظيفية لكل منظف:

الجدول 04: نتائج تقييم الكفاءة التنظيفية بطريقة التحليل الرقمي لصور العينات.

المنظف	البقع	التدرج اللوني قبل التنظيف	التدرج اللوني بعد التنظيف	الفرق(ΔGray)	الكفاءة التنظيفية $E\%$
الماء المقطر	دم	141.635	209.910	68.275	79.68
	شكولاتة	90.503	186.291	95.788	70.01
	زيت	206.593	195.176	-11.417	-55.08
منظف تجاري + أنزيمات	دم	141.356	214.110	72.754	84.63
	شكولاتة	106.889	223.273	116.384	96.64
	زيت	207.548	225.240	17.692	89.48
منظف تجاري	دم	141.605	211.028	69.423	80.99
	شكولاتة	144.413	208.523	64.11	77.33
	زيت	206.801	207.278	0.477	02.32
	قماش نظيف	227.321			

1.3. نتائج التنظيف

أظهرت نتائج التقييم الكمي للقدرة التنظيفية أن استخدام الأنزيمات المستخلصة من أمعاء الدجاج كمكملات في منظف الملابس أدى إلى تحسين واضح في إزالة البقع مقارنة بالمنظف العادي والماء المقطر فقط.

فقد كانت الفروقات في متوسط التدرج الرمادي (ΔGray) بعد التنظيف أكبر بشكل ملحوظ في حالة منظف + أنزيمات، مما يدل على تفكيك فعال للمركبات العضوية المكونة للبقع مثل البروتينات والدهون.

يعكس هذا الأداء العالي النشاط الإنزيمي المتوقع لكل من البروتياز والليباز، ويدعم إمكانية إدماج هذه الإنزيمات في التطبيقات الصناعية للمنظفات البيولوجية الصديقة للبيئة، خاصة أنها مستخلصة من مصدر نفايات حيوي (أمعاء الدجاج) مما يعزز الاقتصاد التدويري.

ملاحظات:

- بالنسبة لعينة القماش الملطخة بالزيت بعد غسلها بالماء المقطر لم تزل البقعة كما أننا تحصلنا على فرق سالب في التدرج اللوني وهذا راجع إلى طريقة التصوير، في بعض الحالات يتخلل قطعة القماش بعض الظل الذي يتم إحتسابه في البرنامج منطقة مظلمة (أي كأنها بقعة وسخ).
- كذلك بالنسبة للعينات التي تم غسلها بالمنظف التجاري و الأنزيمات المستخلصة، بالعين المجردة كل البقع تم إزالتها بعد التنظيف إلا أن كفاءة التنظيف لم تتعدى 85% و 81% لعينات الدم و الزيت على التوالي، و هذا رجع كما ذكرنا سابقا أن بعض عينات القماش عند تصويرها لم تكن مستوية تماما على السطح مما سمح بظهور بعض الظلال المظلمة على الصورة.

4. حوصلة:

في هذا الفصل، تم عرض ومناقشة النتائج المتحصل عليها من خلال دراسة تأثير عاملين رئيسيين، هما الزمن وpH، على استخلاص الأنزيمات الهضمية من أمعاء الدجاج، وذلك باستخدام تصميم تجريبي من نوع "مخطط عاملي كامل". أظهرت النتائج أن أفضل شروط الاستخلاص تحققت عند pH = 8 وزمن 60 دقيقة، حيث تم تسجيل أعلى تركيز للأنزيمات.

كما تم نمذجة العلاقة بين العوامل المدروسة والاستجابة باستخدام معادلة رياضية مكنت من التنبؤ بفعالية الاستخلاص. أظهر التحليل الإحصائي أن كلاً من الزمن و pH لهما تأثير معتبر موجب، في حين لم يكن لتفاعلهما تأثير معتبر.

في الجزء الثاني من الدراسة، تم تقييم القدرة التنظيفية للأنزيمات المستخلصة عند دمجها مع منظف سائل، باستخدام قطع قماش ملطخة ببقع عضوية مختلفة (دم، شوكولاتة، زيت جوز الهند). وقد تم تحليل النتائج بصرياً وباستعمال برنامج ImageJ.

أظهرت النتائج أن استعمال الأنزيمات أدى إلى تحسين ملحوظ في كفاءة إزالة البقع مقارنة بالمنظف العادي والماء فقط، مما يعكس الفعالية العالية للأنزيمات (خصوصًا البروتياز والليباز) في تحليل البروتينات والدهون.

تؤكد هذه النتائج إمكانية استغلال الأنزيمات الحيوية المستخلصة من نفايات حيوية كمكملات فعالة في صناعة المنظفات البيولوجية، مما يدعم توجهات التنمية المستدامة والاقتصاد التدويري.

نشير إلى أن بعض التباينات الطفيفة في النتائج تعود إلى عوامل تقنية مرتبطة بالتصوير أثناء التحليل الرقمي، ما يستدعي في المستقبل تحسين منهجية التقييم لمزيد من الدقة.

خاتمة عامة

جاءت هذه المذكرة لتتناول موضوعًا ذا أهمية تطبيقية وعلمية، يتمثل في استخلاص الأنزيمات الهضمية من نفايات حيوية (أمعاء الدجاج) وتقييم فعاليتها في أحد التطبيقات الصناعية المهمة، وهو مجال المنظفات البيولوجية.

في شقها النظري، تناولت هذه الدراسة الأنزيمات الهضمية من حيث تعريفها، أنواعها، مصادرها مختلف تطبيقاتها، مع التركيز على أنزيمي البروتياز والليباز نظرًا لدورهما المحوري في تحلل البروتينات والدهون. كما تم استعراض مختلف استراتيجيات وتقنيات استخلاص وتنقية الأنزيمات، مع الإشارة إلى التحديات المرتبطة بالمردودية، والثبات البنيوي للأنزيمات أثناء عمليات الاستخلاص، وضرورة تكييف ظروف العمل وفق طبيعة المصدر الحيوي.

أما في الجانب التطبيقي، فقد تم اعتماد نفايات أمعاء الدجاج كمصدر غني بالأنزيمات الهضمية، وهو خيار يندرج ضمن استغلال النفايات الحيوية وتحويلها إلى منتجات ذات قيمة مضافة. تم تنفيذ عدة تجارب لاستخلاص الأنزيمات باستخدام محلول منظم فوسفاتي و ترسيها باستعمال كبريتات الأمونيوم، متبوعًا بدراسة تأثير عاملين أساسيين pH :وزمن الاستخلاص، وذلك وفق تصميم تجريبي من نوع "مخطط عاملي كامل". وقد أظهرت النتائج أن أفضل مردودية في تركيز الأنزيمات المتحصل عليها كانت عند pH = 8 وزمن 60 دقيقة، مما يدل على أن الوسط القاعدي والزمن الكافي يسمحان بتحرر كمي ونوعي أفضل للأنزيمات من النسيج الحيوي.

ولم تتوقف الدراسة عند حدود الاستخلاص، بل انتقلت إلى مرحلة التقييم الوظيفي لهذه الأنزيمات، من خلال إدماجها في منظف سائل واختبار قدرتها على إزالة أنواع مختلفة من البقع العضوية (دم، شوكولاتة، زيت جوز الهند) من قطع قماش قطنية. تم اعتماد طريقتين للتقييم: ملاحظة مباشرة بالعين المجردة، وتحليل رقمي دقيق باستعمال برنامج ImageJ الذي يقيس الفرق في التدرج الرمادي للصورة قبل وبعد الغسل. وقد أظهرت النتائج أن إضافة الأنزيمات أدى إلى تحسن واضح في الكفاءة التنظيفية، حيث فاقت قدرة التنظيف في بعض الحالات 96%، مما يعكس فعالية الأنزيمات المستخلصة وقدرتها على تفكيك مكونات البقع العضوية.

وتجدر الإشارة إلى أن بعض التباينات الطفيفة في النتائج تعود إلى عوامل تقنية مرتبطة بالتصوير أو توزيع الإضاءة أثناء التحليل الرقمي، ما يستدعي في المستقبل تحسين منهجية التقييم لمزيد من الدقة.

بشكل عام، تُبرز هذه الدراسة إمكانيات واعدة في استغلال النفايات الحيوية المحلية لاستخلاص أنزيمات فعالة ومنخفضة التكلفة، قابلة للاستخدام في الصناعات التنظيفية، ما يشكل بديلاً بيئيًا واقتصاديًا للأنزيمات المستوردة. كما تفتح هذه النتائج آفاقًا مستقبلية للبحث في مجالات أوسع، تشمل تحسين خطوات التنقية، تثبيت الأنزيمات على حوامل صلبة، أو استخدامها في قطاعات صناعية أخرى كالصناعات الغذائية والجلدية.

وبناءً عليه، فإن هذه المذكرة تمثل خطوة أولى مشجعة نحو تثمين المخلفات الحيوانية وتحويلها إلى موارد فعالة وصديقة للبيئة، كما تسلط الضوء على أهمية التكامل بين المعارف النظرية والتطبيقات العملية لتطوير حلول مبتكرة تخدم المجتمع والبيئة على حد سواء.