الفصل الثامن

عمليات التجهيز النهائي في التقنية الحيوية الصناعية

DOWNSTREAM PROCESSING IN INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY

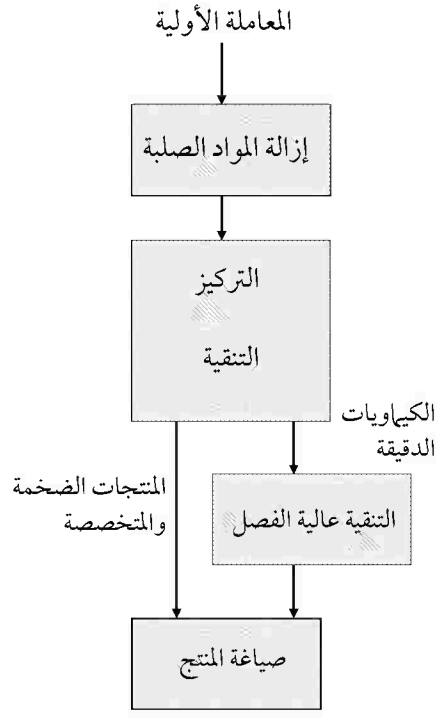
راجني هاتي-كاول

Rajni Hatti - Kaul

(٨, ١) المقدمة Introduction

تعني عملية التجهيز النهائي (DSP) استرجاع منتج للتقنية الحيوية من مفاعل حيوي وتنقيته إلى صورةٍ مناسبة للاستخدام المقصود منه [١]. وتتنوع منتجات التقنية الحيوية الصناعية وعادةً ما يتم تقسيمها إلى الكيماويات، والمواد، والوقود. وحيث إن الإنتاج يقوم أساساً على تقنية التخمير والتحفيز الحيوي، فإن نقطة بداية عملية التجهيز النهائي تشكل في كثيرٍ من الأحيان إما محلول التخمير الخام الذي يحتوي على الخلايا المنتجة، والمواد المغذية، ونواتج الأيض، والوسائط غير المستهلكة، والمنتجات الجانبية، وما إلى ذلك في كمياتٍ كبيرة من الماء وإما خليط التفاعل الذي يحتوي على الإنزيم/ الخلايا الكاملة (الحرة أو المقيدة)، والمواد المتفاعلة، والمذيبات، والمياه، والمنتجات الجانبية. وبذلك تشمل التحديات الرئيسة في عملية التجهيز النهائي فصل المنتج الذي غالباً ما يتكون بتركيزات منخفضة نسبياً، من عددٍ وافر من المكونات الأخرى، وخاصةً تلك ذات الخصائص المماثلة للمنتج نفسه.

ويبدأ التسلسل التقليدي للفصل باستخدام التقنيات التي تفصل المكونات ذات الفرق الأكبر في الخصائص الفيزيائية الكيميائية وينتهي بفصل الجزيئات ذات خصائص أكثر أو أقل مماثلة (الشكل رقم ١, ٨). وهذا يجعل فصل المنتج القابل للذوبان من الكتلة الخلوية أو المحفز الحيوي عملية استرجاع أولية. وفي حال كان المنتج داخل الخلايا، على سبيل المثال، البروتينات والبوليمرات الحيوية الأخرى، فإنه يجب تمزيق الخلايا لتحرير المنتج يليها خطوة فصل صلبة-سائلة أخرى. ثم تتم معالجة السائل الخالي من الجسيمات لتركيز وتنقية المنتج باستخدام عدد من وحدات التشغيل، والتي لا يتم تحديد اختيارها عن طريق خصائص المنتج فحسب ولكن أيضاً عن طريق تعقيد الفصل، وحجم العملية، والاقتصاديات، ونقاء المنتج المطلوب.



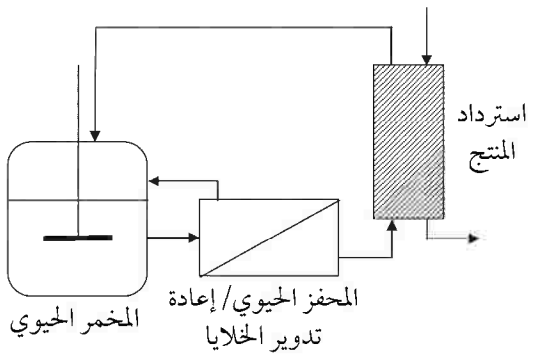
الشكل رقم (١ ,٨). مخطط مبسط لعملية التجهيز النهائي لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية.

وقد تم أدراك أهمية عملية التجهيز النهائي عن طريق تأثيرها على إجمالي تكاليف الإنتاج. ويقترح أن عملية التجهيز النهائي تشكل عادةً ٥٠-٧٠٪ من إجمالي تكاليف الإنتاج لمنتجات التخمر؛ ويمكن أن تتراوح التكاليف للمنتجات الضخمة بين ١٠-٥٠٪، وتصل إلى ٩٠٪ للمنتجات الصيدلانية عالية النقاء. وحيث إن إنتاج التكنولوجيا الحيوية يتحرك نحو إنتاج المواد الكيميائية بحجمٍ كبير وسعرٍ منخفض، فإنه يصبح من الضروري أن نحد من التكاليف عن طريق تعظيم كفاءة الفصل مع الحد الأدنى من مدخلات الطاقة والتوليد المنخفض للنفايات.

وعليه فإنه من المهم النظر في إستراتيجية عملية التجهيز النهائي عند تصميم العمليات الحيوية. ويكون الخيار الأمثل لتقنيات الفصل حاسماً. وفوق ذلك فإن إمكانية استخدام فصل المنتج كوسيلة لحصاد المنتج مباشرة من المفاعل الحيوي (الشكل رقم ٢ ,٨) تعد جانباً آخر مثيراً للاهتمام. ويجذب مفهوم إزالة المنتج في الموقع (ISPR) الاهتمام المتزايد كحلٍ تقني لتحسين إنتاجية العمليات الحيوية والتي تتميز في كثيرٍ من الأحيان بالعائدات المنخفضة. ويمكن توقع زيادة العائد؛ بسبب التغلب على الآثار المثبطة أو السامة للمنتجات، أو التقليل من خسارة المنتج بواسطة التحلل، أو تحويل توازنات التفاعلات غير المناسبة [٢-٦]. وعلاوةً على ذلك، يمكن تخفيض عدد خطوات التجهيز النهائي، وخاصةً إذا تم استرداد المنتج بطريقةٍ انتقائية. ومع ذلك، لكي تكون إزالة المنتج في

الموقع ناجحة فإن تقييم تقنية الفصل لمدى ملاءمتها للتكامل مع المفاعل الحيوي دون أي تأثير سلبي على العملية (على سبيل المثال، السمية للخلايا أو تغير طبيعة الإنزيمات) يكون شرط مسبق مهم.

ويقدم هذا الفصل لمحة عامة عن وحدات التشغيل التي تستخدم للفصل في التقنية الحيوية تليها أمثلة لبعض عمليات التجهيز النهائي لبعض المنتجات المعروفة جيداً.



الشكل رقم (٢ ,٨). مفهوم استرداد المنتج في الموقع (ISPR). يتم حصد المنتج باستمرار أو بشكلٍ متقطع من المفاعل الحيوي باستخدام تقنية فصل مناسبة. ويمكن إزالة المحفز الحيوي أو الخلايا الكاملة المستخدمة في العملية من تيار العملية وإعادة تدويرها قبل خطوة أسر المنتج.

(٨ ,٢) الفصل في التقنية الحيوية الصناعية Separations in Industrial Biotechnology

يمكن تصنيف مختلف وحدات تشغيل عمليات التجهيز النهائي المستخدمة في التقنية الحيوية على أساس القوة الدافعة للفصل كما هو مبين في الجدول رقم (١ ,٨). إن كثيراً من التقنيات هي عمليات وحدات تقليدية معروفة جداً تم تكييفها من قبل الصناعة الكيميائية والصيدلانية وأيضاً الصناعات الغذائية. ومع ذلك فقد تم تطوير وتنقيح بعض التقنيات لتلبية احتياجات التقنية الحيوية الصناعية. وفي هذا الصدد، فإنه تجدر الإشارة إلى الفصل القائم على الأغشية والفصل اللوني. وقد جعلت التطورات في تقنية الأغشية وظيفة الأغشية متنوعة للغاية، مما يسمح بفصل مجموعةٍ واسعة من المنتجات اعتماداً على مبادئ فصل مختلفة. وبالمثل يعتمد الفصل اللوني السائل على قوى فصل مختلفة ويستخدم على نطاقٍ واسع في مجموعة متنوعة من الأساليب لفصل كلٍ من الجزيئات الصغيرة والجزيئات الكبيرة.

(٨ ,٢ ,١) فصل الجسيمات الصلبة Separation of Solid Particles

إن فصل السائل عن الصلب هو وحدة التشغيل الرئيسة السائدة في عملية التجهيز النهائي ويتضمن إزالة الكتلة الحيوية للخلايا من محلول التخمير، وبقايا الخلايا بعد تمزيق الخلايا في حالة المنتجات داخل الخلية،

والمحفزات الحيوية المقيدة، ولكنه يستخدم أيضاً خلال المراحل المتوسطة والنهائية لفصل الرواسب والبلورات [٧، ٨]. وغالباً ما يتم الاختيار بين الطرد المركزي والترشيح (وفي الآونة الأخيرة الترشيح الدقيق)، ومع ذلك فقد تم استخدام عدد من التقنيات الأخرى ذات آليات فصل مختلفة أيضاً إلى حدٍ ما.

الجدول رقم (١ ,٨). تصنيف تقنيات الفصل المستخدمة على أساس خصائص المنتج النوعية.

مبدأ الفصل	تقنية الفصل	التطبيق في عملية التجهيز النهائي
الحجم	الترشيح	فصل الكتلة الحيوية للخلايا، البقايا، المحفزات الحيوية المقيدة، الرواسب والبلورات
	الترشيح الدقيق	فصل الكتلة الحيوية للخلايا
	الترشيح الفائق	تركيز البروتينات، نزع الأملاح
	الترشيح النانوي/ الأسموزية العكسية	إزالة المواد المذابة الصغيرة، نزع الأملاح
فرق الكثافة	الطرد المركزي	فصل الكتلة الحيوية للخلايا، البقايا، المحفزات الحيوية المقيدة، الرواسب والبلورات
التطاير	التقطير (التفريغي)، التجريد الغازي	استرداد المنتجات المتطايرة صغيرة الوزن الجزيئي
التطاير + النفاذية الغشائية	التبخير المسبق، التقطير عابر الأغشية	
الذوبان	استخلاص السائل من السائل، استخلاص السائل بدرجات الحرارة فوق الحرجة	استرداد المنتجات غير القطبية (والمشحونة) صغيرة الوزن الجزيئي
	الاستخلاص المائي ثنائي المرحلة	استرداد البروتينات
	الترسيب	تركيز وتنقية المنتجات والبروتينات صغيرة الوزن الجزيئي
	البلورة	تنقية وتشكيل المنتجات والبروتينات صغيرة الوزن الجزيئي
الشحنة	تبادل الأيونات	تركيز وتنقية المنتجات صغيرة وكبيرة الوزن الجزيئي المشحونة
	الفصل الغشائي الكهربي	تنقية الأحماض العضوية
طبيعة التفاعل مع الماء	المرحلة العكسية	تنقية المواد المذابة غير القطبية
	الفصل اللوني الكاره للماء	تنقية البروتينات
التعرف الجزيئي	الفصل اللوني الانجذابي	التنقية الاختيارية للبروتينات
	التبصيم الجزيئي	فصل المركبات المتماثلة تركيبياً، النظائر الضوئية، ...إلخ

(٨,٢,١,١) الترشيح Filtration

إن الترشيح هو الوسيلة الأكثر فعالية من حيث التكلفة لفصل الجزيئات الصلبة الكبيرة من معلق. يؤدي مرور معلق للجسيمات خلال بيئة ترشيح مسامية إلى ترسيب الجسيمات وتشكيل كعكة على سطح المرشح والتي يزيد حجمها مع الوقت. ويرتبط معدل الترشيح عند أي وقت بعوامل مختلفة مثل:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\Delta pA}{\alpha\mu m + \mu r_m} \qquad (٨,١)$$

حيث V هي حجم الرشيح، t هي زمن الترشيح، A هي مساحة المرشح ، Δp هي فرق الضغط خلال المرشح، μ هي اللزوجة الديناميكية، m الكتلة الكلية للكعكة، α هو متوسط مقاومة الكعكة النوعية و r_m هي مقاومة بيئة المرشح. وترتبط كتلة الكعكة المترسبة لكل وحدة مساحة بتركيز المواد الصلبة C في المعلق، أي أن $mA = CV$.

وغالباً ما تكون قيمة r_m جديرة بالاهمال بالمقارنة مع α، والتي تعتمد على شكل وحجم الجسيمات، وحجم المساحات الخلالية بينهما، والثبات الميكانيكي للكعكة. وإذا كانت كعكة المرشح غير قابلة للانضغاط، فإن α لا تتغير مع انخفاض الضغط عبر المرشح. ومع ذلك، فإن كعكات المرشح التي يتم الحصول عليها من محاليل التخمير تكون قابلة للانضغاط، مما يسبب انخفاضاً في معدلات الترشيح. ويمكن خفض مقاومة الكعكة النوعية عن طريق زيادة مسامية الكعكة، وتغيير الشكل، أو زيادة متوسط حجم الجسيمات [٩]. وتستخدم أدوات الترشيح مثل الثري الدياتومي على نطاقٍ واسع لتحسين كفاءة الترشيح. ويمكن استخدام أدوات الترشيح بوصفها غطاءً أولياً على بيئة المرشح لمنع انسداد المرشح من قبل المواد الصلبة، ويمكن أيضاً اضافتها إلى محلول التخمير لزيادة مسامية الكعكة. ويعد تسخين محلول التخمير لإفساد البروتينات أو إضافة المحاليل المنحلة بالكهرباء لتعزيز تخثر الغرويات إلى جسيمات أكبر وأكثر كثافة من الوسائل الأخرى من المعالجة الأولية لتحسين خصائص الترشيح للمحاليل.

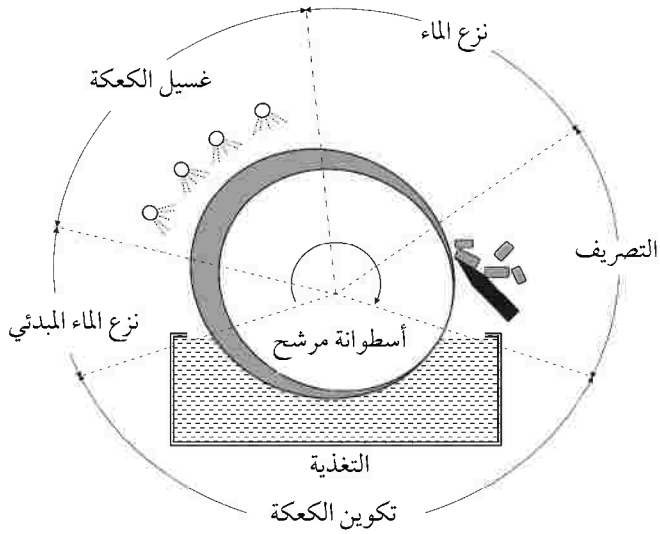
يمكن تشغيل الترشيح في أسلوبين- عند ضغط ثابت (تفريغ) حيث ينخفض معدل الترشيح تدريجياً مع زيادة مقاومة الكعكة، أو عند معدل ثابت حيث يتم الحفاظ على معدل التدفق عن طريق زيادة فرق الضغط تدريجياً. والترشيح عند ضغط ثابت هو طريقة الترشيح الأكثر شيوعاً، حيث تكون V و t هي المتغيرات فقط. وتعطي إعادة ترتيب المعادلة (٨,١) والتكامل من V = صفر إلى V = V و t = صفر إلى t = t:

$$\frac{dt}{dV} = \frac{\alpha\mu CV}{A^2\Delta p} + \frac{\mu r_m}{A\Delta p} \qquad (٨,٢)$$

$$\frac{t}{V} = \frac{\alpha\mu C}{2A^2\Delta p}V + \frac{\mu r_m}{A\Delta p} \qquad (٨,٣)$$

ويمكن تبسيط المصطلحات $\alpha\mu CV/(2A^2\Delta p)$ و $\mu r_m/A\Delta p$ أكثر إلى K1 و K2، على التوالي. K1 و K2 هما ثابتان خلال الترشيح بالضغط الثابت ومن ثم يعطي رسم t/V مقابل V خط مستقيم، حيث يعتمد المنحدر K1 على فرق ضغط الترشيح وخصائص الكعكة ويعتمد الاعتراض K2 أيضاً على فرق الضغط ولكنه لا يعتمد على خصائص الكعكة [١٠].

وعادةً ما يتم الترشيح كبير المستوى لمحاليل التخمير التي تحتوي على الخيوط الفطرية باستخدام مرشحات تفريغية مثل مرشح تفريغ الأسطوانة الدوارة المبين في الشكل رقم (٨,٣).

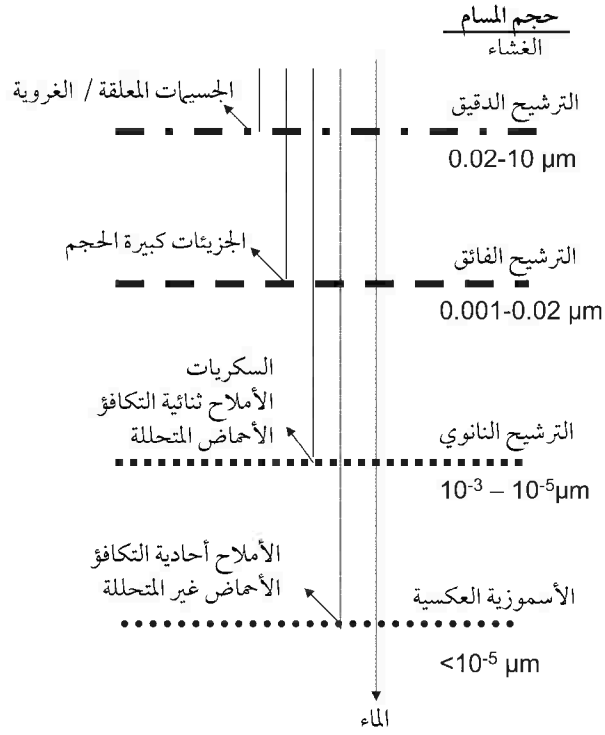


الشكل رقم (٨,٣). مرشح تفريغ الأسطوانة الدوارة وعمله. تضم المعدة أسطوانة دوارة مغطاة بمرشح مغمور جزئياً في خزان من محلول جسيمات. يتم إبقاء الأسطوانة تحت ضغط داخلي منخفض وإدارتها بسرعة بطيئة، ويتم التقاط الكتلة الحيوية المترسبة ككعكة على سطح المرشح. الدوران المستمر للأسطوانة يسمح بنزح المياه، وغسل، وتجفيف كعكة المرشح قبل الخروج من على سطح الأسطوانة. وعادةً ما تتم تغطية المرشح بمساعد للترشيح.

(٨,٢,١,٢) الترشيح الدقيق Microfiltration

شهد العقد الماضي زيادةً هائلة في استخدام الترشيح الغشائي لفصل الجسيمات والجزيئات، حيث يشكل غشاء شبه نفاذ بيئة المرشح ويكون فرق الضغط الهيدروليكي بين جانبي محلول التغذية ومحلول الرشيح هو القوة الدافعة للترشيح. وتتم تسمية عمليات الترشيح الغشائي تبعاً لحجم مسام المرشح: يستخدم الترشيح الدقيق على نطاقٍ واسع لفصل الخلايا مثل إيشيريشيا القولون والخمائر خلال مراحل الاسترجاع الأولية من عمليات التجهيز النهائي (الشكل رقم ٨,٤). ويمكن استخدام الأغشية دقيقة المسام التي يقع نطاق حجم مسامها بين ٠,٠٢ – ٠,٢ ميكروميتر لفصل الخلايا البكتيرية، في حين يمكن استخدام المسام من ٠,٢ – ٢ ميكروميتر مع الخمائر [١٢].

وفي الواقع يمكن أن تشكل وحدة الترشيح الدقيق جزءاً لا يتجزأ من المفاعل الحيوي للاحتفاظ بالخلايا الكاملة أو المحفزات الحيوية المقيدة في حين يتخلل المنتج من خلال الغشاء لإتاحة عملية إزالة المنتج في الموقع. وسيتم وصف الترشيح الغشائي بمزيدٍ من التفصيل في القسم (١ , ٣ , ٢ , ٨).



الشكل رقم (٤ , ٨). أنواع عمليات الترشيح الغشائي المستخدمة في التقنية الحيوية للفصل تبعاً للحجم [١١].

(٨ , ٢ , ١ , ٣) الطرد المركزي Centrifugation

يستخدم الطرد المركزي لفصل المواد التي تختلف في الكثافة تحت تأثير قوة أكبر من الجاذبية. ويتراوح حجم الجزيئات التي يتم فصلها بالطرد المركزي ما بين ١٠٠ و١ , ٠ ميكروميتر. وحتي يتم فصل جسيم كروي من معلق مخفف، فإنه يتم إعطاء السرعة النهائية للفصل، Vc في مجال طرد مركزي عن طريق قانون ستوكس:

$$V_c = \frac{r\varpi^2 D_p^2(\rho_p - \rho_f)}{18\mu} \qquad (٨ , ٤)$$

حيث يستبدل تسارع الطرد المركزي rω2 (r هي المسافة القطرية من محور الدوران وω هي السرعة الزاوية للدوران) تسارع الجاذبية g التي تؤثر في معدل الترسيب Vg في مجال الجاذبية. وفقاً للمعادلة (٤ , ٨)، تزيد سرعة الجسيمات في جهاز الطرد المركزي مع زيادة قطر الجسيمات D_p، وزيادة فرق الكثافة بين الجسيمات (ρ_p) والقطر (ρ_f)، وخفض لزوجة المعلق μ. وتسمى نسبة السرعة في أجهزة الطرد المركزي إلى السرعة تحت تأثير الجاذبية بتأثير جهاز الطرد

المركزي أو رقم g ويعطي كـ $Z = r\omega 2/g$. وأجهزة الطرد المركزي الصناعية لها عامل Z يتراوح من ٣٠٠-١٦٠٠٠، في حين يصل عامل Z في أجهزة الطرد المركزي المعملية الصغيرة إلى ٥٠٠٠٠٠.

يتطلب الطرد المركزي معدات أكثر تكلفة من الترشيح ويتميز أيضاً بارتفاع استهلاك الطاقة؛ ولكن هذه التقنية فعالة في الجزيئات الصغيرة الصعب ترشيحها. وينتج عن الطرد المركزي للخلايا من محلول التخمير عجين سميك مركز يحتوي على سائل أكثر مما في كعكة المرشح، ولا يخلو المحلول الطافي من الخلايا. وكما هو الحال في الترشيح، فإن المعالجة المسبقة للمحلول، على سبيل المثال عن طريق إضافة عوامل التلبد مثل الكاتيونات الكثيرة والأملاح غير العضوية، وما إلى ذلك، تزيد من سهولة فصل الخلايا عن طريق الطرد المركزي.

وغالباً ما يتم الطرد المركزي على النطاق الواسع في حالة مستمرة باستخدام أنواع مختلفة من أجهزة الطرد المركزي ومن بينها جهاز الطرد المركزي ذو الأقراص المتراصة وجهاز الطرد المركزي الساكب أو الحلزوني الأكثر استخداماً على نطاقٍ واسع في مجال التقنية الحيوية (الشكل رقم ٨,٥). ولأنه يمكن القيام بالطرد المركزي تحت ظروف معقمة، فإنه يمكن دمجه مع عملية التخمير في عملية إزالة للمنتج في الموقع بحيث يمكن معالجة السائل المروق لاسترداد المنتج في حين تتم إعادة تدوير الكتلة الحيوية إلى المخمر.

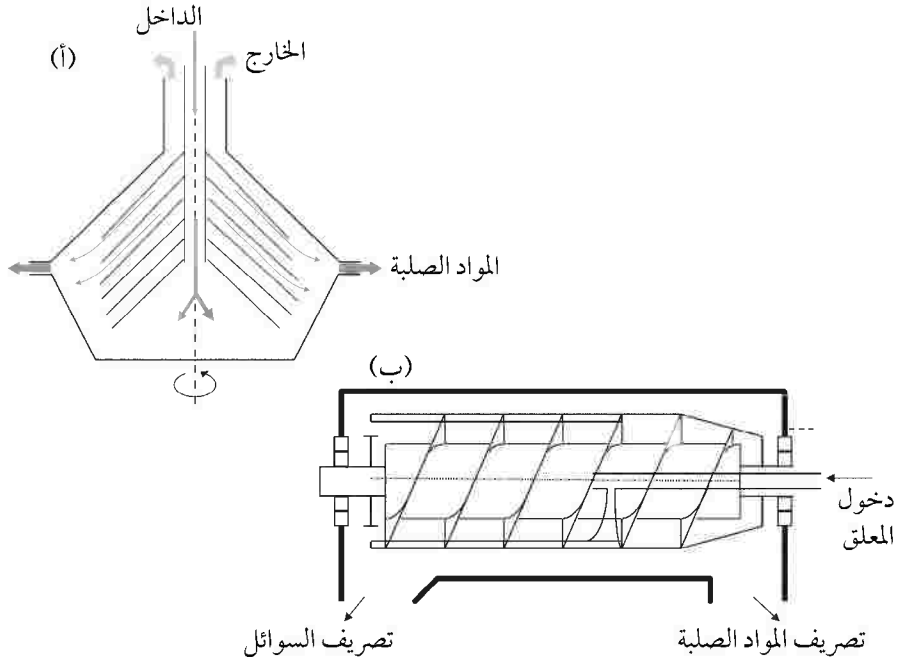
(٨,٢,١,٤) الهيدروسيكلون Hydrocyclone

توجد أمثلة لفصل المواد الصلبة من السائلة باستخدام الهيدروسيكلون (الشكل رقم ٨,٦)، والذي على عكس أجهزة الطرد المركزي لا يوجد به أجزاء متحركة وتتم الحركة الدوامية بواسطة السائل نفسه والذي يتم إدخاله بشكل تماسي إلى الجزء العلوي من الجهاز، مما يعطيه حركة هبوطية دوامية قوية [٨]. ويهرب جزء صغير فقط من المحلول المغذي من خلال التيار السفلي، حاملاً الجزيئات الأكثر كثافة، في حين يعكس معظم السائل اتجاهه ويرتفع في حركة دوامية أقوى ويخرج من أنبوب التيار العلوي، حاملاً معه الجزيئات الأخف وزناً.

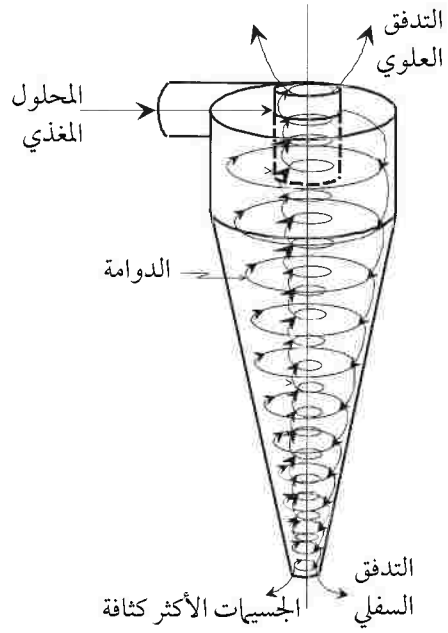
(٨,٢,١,٥) التعويم والاستخلاص Flotation and Extraction

يشمل التعويم والاستخلاص وحدات تشغيل أخرى أقل تقليدية لكنها فعالة جداً في إزالة الخلايا وبقايا الخلايا التي قد يكون من الصعب فصلها عن طريق الطرد المركزي أو الترشيح. وفي التعويم يتم حمل الجزيئات بواسطة فقاعات الهواء إلى أعلى عمود التعويم حيث يتم كشطها في شكل زبد، وهذه العملية مفيدة خاصةً في فصل الجسيمات الدقيقة. ويتيح استخدام فقاعات الغاز المصنوعة من محلول المواد المقللة للتوتر السطحي أو فقاعات الغاز الدقيقة للمواد الغروية الفصل الفعلي للكائنات الحية الدقيقة من المحلول المخفف [١٣].

يتيح الاستخلاص في النظم المائية ثنائية المرحلة (ATPS) سهولة فصل الجزيئات من المحاليل المغذية التي تكون عالية اللزوجة أو ذات توزيع غير متجانس من الجسيمات [١٤]. ويتم تكوين هذه النظم عن طريق خلط اثنين من البوليمرات المختلفة أو بوليمر وملح أعلى من تركيز معين في الماء؛ ويتم تخصيب المرحلتين بالنسبة لكل مكون في المرحلة المعنية. وعادةً ما يكون تقسيم الجسيمات في مثل هذه النظم أحادي الجانب، وقد استخدمت هذه التقنية لاستخلاص البروتينات مباشرةً من متجانس الخلايا الخام بحيث يتم تخصيب الجسيمات في مرحلة القاع في حين يتم الحصول على المنتج المستهدف في مرحلة القمة (انظر القسم ٨,٢,٥,١). ويمكن إجراء مثل هذا الفصل بسرعةٍ كبيرة تحت الجاذبية أو سرعات طرد مركزي منخفضة.



الشكل رقم (٨,٥). عرض تخطيطي لنوعين من أجهزة الطرد المركزي المستخدمة في التقنية الحيوية. (أ) يحتوي جهاز الطرد المركزي ذو الأقراص المتراصة على عدة أقراص (بين ٣٠ و٢٠٠) موضوعة بزاوية من ٣٥-٥٠ درجة ومفصولة عن بعضها بمسافة ٤,٠-٢ مم، مقسمةً الوعاء إلى مناطق ترسيب منفصلة. يدخل المحلول المغذي جهاز الطرد المركزي من خلال أنبوب تغذية مركزية أسفل الأقراص. تترسب المواد الصلبة على سطح كل قرص وتتحرك نحو محيط الوعاء الخارجي، في حين يتحرك السائل المروق نحو الداخل صاعداً إلى أنابيب المحلول الخارج حول الأنبوب المغذي. (ب) يتم استخدام جهاز الطرد المركزي الساكب أو الحلزوني لتركيز العجائن مع تركيزات عالية من المواد الصلبة الجافة. مأخوذ بتصريح من هاتي-كول وماتياسون [١]، مطبعة جامعة كامبريدج. وهو يتألف من وعاء أفقي دوار مدبب في إحدى نهاياته ومرتبط بمسمار لولبي يدور بسرعة مختلفة قليلاً. تترسب المواد الصلبة على جدار الوعاء ويتم كشطها بواسطة المسمار وإخراجها من النهاية الضيقة للوعاء.



الشكل رقم (٦, ٨). عرض تخطيطي لفصل المواد الصلبة من السائلة في الهيدروسيكلون. تضم الوحدة جزء مخروطي مع فتحة سفلي تتصل برأس أسطوانية مرتبطة بمدخل تماسي ومغلقة بلوحة نهائية ذات أنبوب للتيار العلوي مركبة محورياً [٨].

(٨, ٢, ٢) تمزيق الخلايا لتحرير المنتجات المرتبطة بالخلية

Cell Disruption for Release of Cell-Associated Products

تشمل الإستراتيجيات المختلفة التي يمكن استخدامها لتمزيق الخلايا الميكروبية كسر هيكل الخلية بواسطة القوة الميكانيكية، متلفةً جدار الخلية على وجه الخصوص، على سبيل المثال عن طريق التجفيف أو التحليل الإنزيمي، أو تحليل الأغشية في المقام الأول (على سبيل المثال، عن طريق المعالجة بالمواد الكيميائية) [٧، ١٥، ١٦]. والتمزيق الميكانيكي هو الوسيلة الأكثر شيوعاً لتحرير المنتجات التي تكون داخل الخلايا، والذي يتم تحقيقه على النطاق الصناعي عن طريق التجانس تحت ضغط عالٍ أو التقليب القوي مع المواد الكاشطة. ويتبع التمزيق عملية من الدرجة الأولى، ويتم تمثيل درجة تحرير المنتج في جهاز تجانس تحت ضغط عالٍ عن طريق:

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = kNP^a \qquad (٨, ٥)$$

حيث تكون R، R_m هي أقصى كمية للمنتج متاحة للتحرير والكمية المحررة عند وقت معين، على التوالي (كجم منتج/ كجم خلايا)، k هو ثابت تفاعل من الدرجة الأولى، N هو عدد مرات المرور، P هو ضغط التشغيل و a هو أس الضغط.

ويمكن تمزيق الخلايا بطريقة غير ميكانيكية من خلال طرق فيزيائية وكيميائية، أو إنزيمية. ومن بين تقنيات التمزيق الفيزيائية التقليدية التجفيف تحت ضغط ثم استخلاص المسحوق الميكروبي، والتجميد والذوبان المتكرر لمعلق الخلية، والصدمة التناضحية. ويمكن أن يكون التعرض لدرجات الحرارة العالية طريقة فعالة لتمزيق الخلايا ولكنه يقتصر على المنتجات المستقرة حرارياً.

ويتم إجراء تمزيق/ تنفيذ الخلايا بمواد كيميائية مختلفة مثل القلويات، والـ EDTA، والمذيبات، والمنظفات، والمضادات الحيوية، وما إلى ذلك، ولكن تم تطبيق عدد قليل منها فقط لتحرير المنتج نظراً لقضايا التكلفة، والسلامة، أو التأثير على ثبات المنتج. والتحلل الإنزيمي للخلايا له مزايا من حيث الانتقائية والشروط المعتدلة المطلوبة لتحرير المنتج. والإنزيم المستخدم على نطاقٍ واسع لتحليل البكتيريا هو الليزوزيم، بينما تستخدم الجلوكانيزات والمانانيزات والبروتييزات في الخمائر. وتجعل تكلفة الإنزيمات التحليل الإنزيمي أكثر تكلفة من التمزيق الميكانيكي للخلايا. وقد اقترح مزيج من المعالجة الإنزيمية/ الكيميائية والحرارية مع التحليل الميكانيكي لتعزيز كفاءة هذه الطرق، مع توفير الوقت والطاقة وتيسير عمليات التجهيز النهائي اللاحقة [١٧]. ويلي تمزيق الخلايا خطوة صلبة–سائلة لإزالة بقايا الخلية.

(٨,٢,٣) فصل الجزيئات اعتماداً على الحجم Size-Based Separation of Molecules

كثيراً ما يتم فصل الجزيئات اعتماداً على الحجم خلال عملية التجهيز النهائي من أجل تركيز المنتج، أو لإزالة الملوحة وتبادل المحلول المنظم. وتؤدي الأغشية دوراً سائداً في مثل هذا الفصل. وغالباً ما تتم إزالة الأملاح من الأحجام الصغيرة لمحاليل البروتين عن الفصل الغشائي باستخدام غشاء للفصل، تتحرك المواد المذابة منخفضة الوزن الجزيئي من منطقة التركيز الأعلى إلى التركيز المنخفض، وعند التوازن يتساوى الجهد الكيميائي للمركبات المنتشرة على جانبي الغشاء.

(٨,٢,٣,١) الترشيح الغشائي Membrane Filtration

يستخدم الترشيح الغشائي باستخدام أغشية ذات حجم مسام أقل من الترشيح الدقيق وذلك لفصل الجزيئات عالية ومنخفضة الوزن الجزيئي (الشكل رقم ٨,٤). يفصل الترشيح الفائق المواد المذابة البوليمرية في النطاق من ٠,٠٠١–٠,٠٢ ميكروميتر وغالباً ما يستخدم لإزالة المواد المذابة منخفضة الوزن الجزيئي من الجزيئات الكبيرة وكطرق لتركيز محاليل البروتين بعد الترويق باستخدام الترشيح الدقيق [٧، ١١]. ويتأثر التدفق الفعلي خلال الغشاء بالضغط عبر الغشاء (Δp) إلى جانب خصائص الغشاء وخصائص تدفق السائل. ومع ذلك،

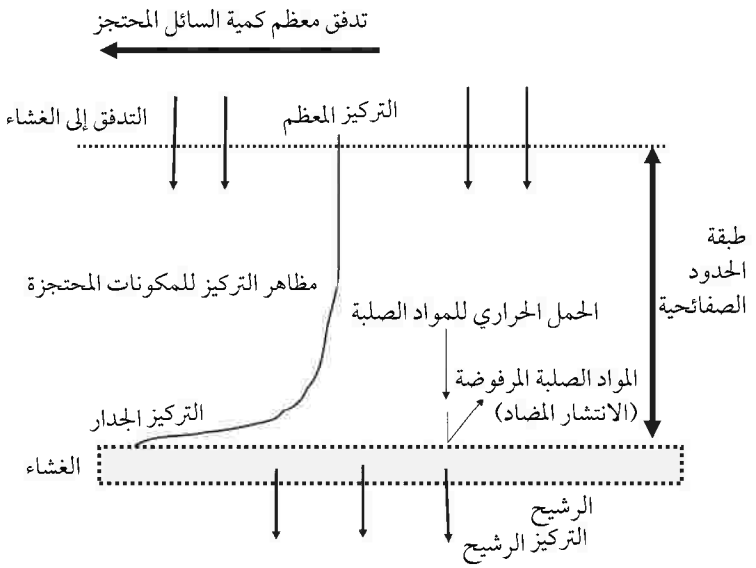
فإنه خلال الترشيح الفائق كما في الترشيح الدقيق، فإن الضغط عبر الغشاء يؤدي فقط دوراً إلى حدٍ معين. ومع الوقت يرتفع تركيز المواد المذابة عالية الوزن الجزيئي على سطح الغشاء، مؤدياً إلى ظاهرة تعرف باسم الاستقطاب التركيزي، ويتحدد التدفق بواسطة توازن تدفق الحمل الحراري إلى سطح الغشاء من البروتين وتدفقه العكسي إلى الجزء الأكبر من السائل نتيجة لاختلاف التركيز (الشكل رقم ٨,٧). ويمكن استنتاج تدفق الغشاء الناتج J على النحو التالي:

$$J = K' \ln \frac{C_{wall} - C_{permeate}}{C_{bulk} - C_{permeate}} \qquad (٨,٦)$$

حيث K' هو معامل نقل الكتلة ويساوي D_e/δ (D_e هي الانتشارية الفعالة للمذاب في طبقة السائل وδ هي سمك الطبقة)؛ وتكون C_{wall}، C_{bulk}، $C_{permeate}$، هي تركيز البروتين عند الجدار، الجزء الأكبر من السائل، والرشيح، على التوالي. وحيث إن $C_{bulk} > C_{permeate}$،

$$J = K' \ln \frac{C_{wall}}{C_{bulk}} \qquad (٨,٧)$$

وبذلك في حالة الاستقطاب التركيزي يكون التدفق مستقلاً عن الضغط عبر الغشاء ويعتمد على نسبة C_{wall} إلى C_{bulk}.

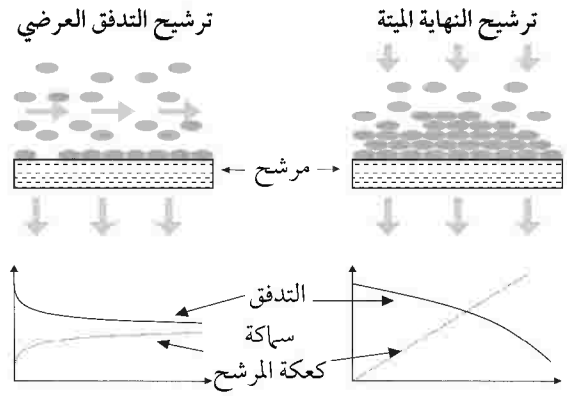


الشكل رقم (٨,٧). الاستقطاب التركيزي خلال الترشيح الدقيق/ الفائق. يزيد تركيز البروتينات والمواد المذابة الأخرى الكارهة للماء على سطح الغشاء مع الوقت، منتجاً انتشاراً عكسياً إلى الجزء الأكبر من السائل ومحداً من تدفق الرشيح خلال الغشاء [١٠].

وقد تم تبني ترشيح التدفق العرضي أو التماسي كطريقةٍ طبيعيةٍ للترشيح الغشائي حيث يتم توجيه الضغط بصورة غير عمودية على سطح الغشاء (كما في حالة ترشيح النهاية الميتة) ولكن بصورة متوازية له (الشكل رقم ٨,٨). ويوفر وضع الترشيح هذا قوة اجهاد قريبة من سطح الغشاء كافية لتقليل ترسيب الجسيمات والحد من امتصاص المواد المذابة الكارهة للماء والفساد الغشاء الناتج. ويعطي التدفق في ترشيح التدفق العرضي كدالة للضغط عبر الغشاء بالمعادلة:

$$J = \frac{\Delta p}{R_G + R_M} \qquad (٨,٨)$$

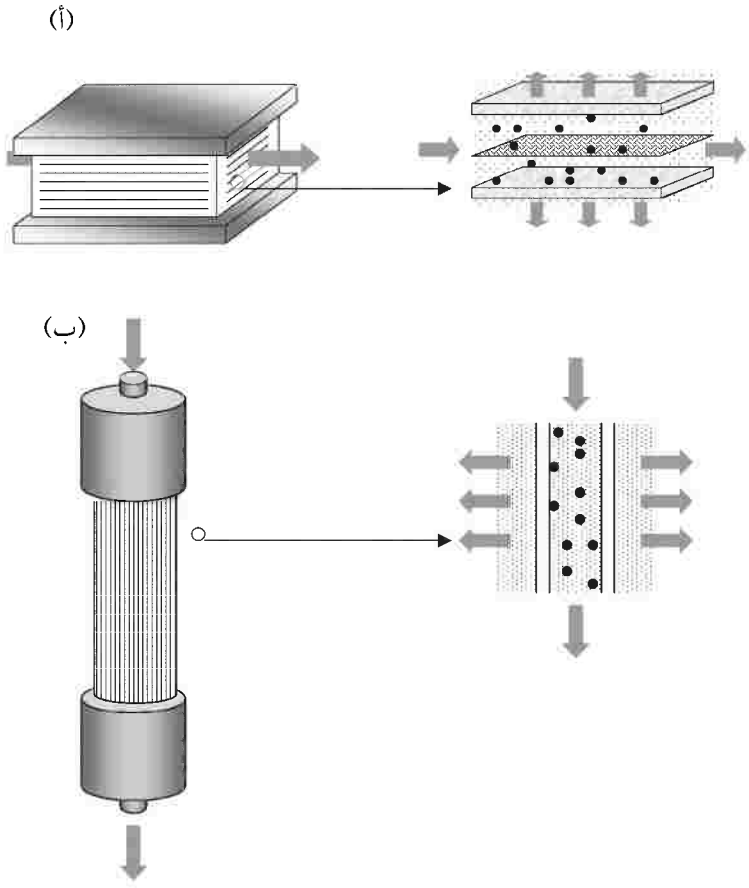
حيث R_G وR_M هي مقاومة الهلام والغشاء، على التوالي. تكون R_M ثابتاً في حين تتغير R_G مع تركيز المذاب والسرعة التماسية عبر الغشاء. ويمكن تعظيم معدل الترشيح عند السرعة المثلى للسائل.



الشكل رقم (٨,٨). مقارنة ترشيح التدفق العرضي مع ترشيح النهاية الميتة. يكون تدفق السائل عمودياً على سطح الغشاء في ترشيح التدفق العرضي، مما يؤدي إلى تقليل فساد الغشاء وانخفاض أقل في التدفق مقارنةً مع ترشيح النهاية الميتة التي يكون فيها تدفق السائل عمودياً على سطح الغشاء.

وتتوافر الآن أغشية كلٍ من الترشيح الدقيق والفائق في مواد مختلفة توفر تدفق خلالي جيد وهي سهلة التنظيف. وتتوفر وحدات الترشيح الغشائي على صورتين رئيستين: خراطيش أنبوبية (على سبيل المثال، الألياف الجوفاء) ووحدات لوحات مسطحة والتي يمكن أن تتخذ شكل نظام لوحة وإطار أو صورة دوامة حلزونية. وتستخدم نظم الألياف الجوفاء واللوحة والإطار عادةً لمعالجة المحاليل المغذية الخام (الشكل رقم ٨,٩). وتسمح هذه النظم بالمعالجة الدفعية أو المستمرة على حدٍ سواء للمحلول المغذي. ويعتمد نظام الألياف الجوفاء على التدفق الصفحي للحد من طبقة الهلام في حين تستخدم نظم اللوحة والإطار حواجز بين الأغشية لتوليد تدفق مضطرب وتقليل الفساد.

والتناضح العكسي والترشيح النانوي هما العمليتين الغشائيتن الأخرتين اللتان تجذبا الاهتمام لإزالة المواد المذابة الأيونية الأصغر من ٠,٠٠١ ميكروميتر عادةً. وهذه التقنيات غير شائعة الاستخدام للفصل في التقنية الحيوية، ومع ذلك فهي تستخدم على نطاقٍ واسع في تنقية المياه، في حين يستخدم الترشيح النانوي أيضاً لتليين المياه. وتتشابه التقنيتان إلى حدٍ ما في التشغيل، والفارق الأساسي هو أن الترشيح النانوي يتم عند ضغط أقل انخفاضاً وذو انتقائية رفض أقل. ويزيل التناضح العكسي الأيونات أحادية التكافؤ بمستوى ٩٨-٩٩٪ عند ٢٠٠ رطل لكل بوصة مربعة، وتتراوح إزالة الأيونات أحادية التكافؤ بواسطة غشاء ترشيح نانوي بين٥٠٪ و٩٠٪ اعتماداً على مواد وتصنيع الغشاء.



الشكل رقم (٨,٩). نظم ترشيح التدفق العرضي: (أ) نظام اللوحة والإطار ذو أغشية متراصة تتخللها فواصل، و(ب) خرطوشة ألياف جوفاء تضم حزمة من شعيرات غشائية في وحدة أنبوبية. ويتم حجز الجسيمات والجزيئات الأكبر من حجم مسام الغشاء على الغشاء في حين تمر المواد المذابة الأصغر عبر الغشاء.

ويستخدم ضغط معادل أو أكبر قليلاً من الضغط التناضحي لدفع جزيئات المذيب والمذاب عبر الغشاء [١٢]. ويتم التعبير عن تدفق المذيب والمذاب على النحو التالي:

$$N_1 = K_p(\Delta p - \pi) \qquad (٨,٩)$$

$$N_2 = C(1-\sigma)N_1 + K_{p'}\Delta C \qquad (٨,١٠)$$

حيث K_p و $K_{p'}$ هما معاملي النفاذية للمذيب والمذاب على التوالي، π هي الضغط التناضحي، وC متوسط تركيز المذاب في المحلول، ΔC هو فرق تركيز المذاب عبر الغشاء، وσ هي معامل الانكسار لجزيئات المذاب، وهو الجزء من جزيئات المذاب الذي يتم الاحتفاظ به على جانب واحد من الغشاء في وجود تدفق من المذيب.

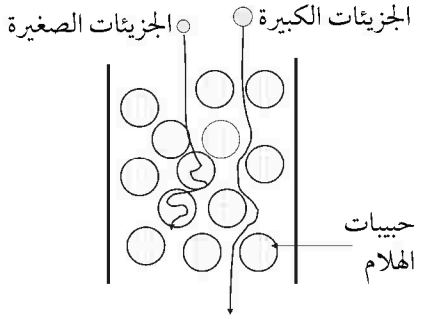
(٨,٢,٣,٢) الفصل اللوني باستبعاد الحجم Size Exclusion Chromatography

إلى جانب الترشيح الغشائي، فإن الفصل اللوني في صورة الفصل اللوني باستبعاد الحجم (المعروف أيضاً بالترشيح الهلامي) يعدُّ أيضاً تقنية فصل تعتمد على الحجم وتستخدم عادةً في المراحل الأخيرة لتنقية البروتينات [١٨]. ويتم الفصل على أساس الفترات الزمنية المختلفة التي تحتاجها الجزيئات ذات الأحجام المختلفة لتمر عبر مسام مصفوفة هلام فصل لوني معبأة في عمود. ويتم استبعاد الجزيئات الأكبر من حجم مسام المصفوفة من المسام وبالتالي يتم إزالتها بسرعة من العمود في الحجم الفارغ (خارج الجسيمات) بينما تتم إزالة الجزيئات الأصغر حجماً اعتماداً على وقت عبورها خلال المسام (الشكل رقم ٨,١٠). وتزال المواد المذابة التي تستبعد جزئياً فقط من المرحلة الثابتة في حجم يوصف بالمعادلة التالية:

$$V_e = V_o + K_p V_i \qquad (٨,١١)$$

حيث V_e، V_o، و V_i هي الحجم المزال، والحجم الفارغ، وحجم السائل الداخلي في مسام الجسيمات، على التوالي، وK_p هو معامل تقسيم الهلام المعرف بأنه الجزء من الحجم الداخلي المتاح للمذاب. وللجزيئات الكبيرة فإن K_p = صفر.

ويتم تقييد الفصل اللوني باستبعاد الحجم اللوني بالقدرة المنخفضة، أي أن حجم العينة يكون حوالي ٢-٥٪ من حجم عمود الفصل اللوني، ويتم تحسين الفصل من خلال زيادة ارتفاع العمود وإجرائه عند معدلات تدفق منخفضة. وينتج عن هذه التقنية المزيد من التخفيف للمنتج.



الشكل رقم (٨,١٠). الفصل اللوني باستبعاد الحجم لفصل الجزيئات المتفاوتة في الحجم. تضم المرحلة الثابتة مصفوفة ذات مدى حجم مسام محدد للسماح بمرور الجزيئات الصغيرة إلى المسام وتؤخر مرورها عبر العمود، في حين يتم استبعاد الجزيئات الأكبر وتمر دون عوائق من خلال العمود مع الطور المتحرك.

(٨,٢,٤) الفصل اعتماداً على تطاير المنتج Separations Based on Product Volatility

يمكن استخدام إزالة المنتج كبخار للتركيز وكوسيلة لفصله وتنقيته على حدٍ سواء. وغالباً ما يكون هذا الفصل مطلوباً أيضاً للإزالة المستمرة للمذيب أو الماء الناتج كمنتج ثانوي في العملية، وفي مثل هذه الحالة يجب أن يتم التكامل مع المفاعل الحيوي.

(٨,٢,٤,١) التقطير Distillation

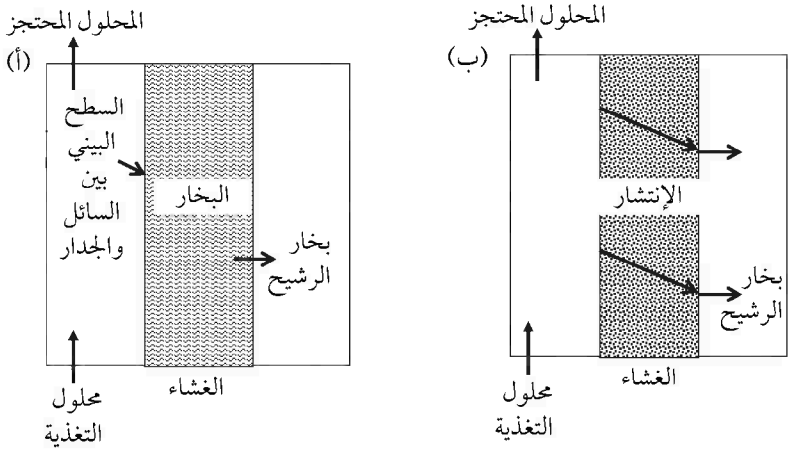
على الرغم من أنها عملية كثيفة الاستخدام للطاقة، إلا أن التقطير كان هو الطريقة المتاحة لاسترداد المنتجات المتطايرة مثل الإيثانول من الكميات الكبيرة من المحاليل المائية المغذية. وإذا تواجد أكثر من منتجٍ واحد متطاير في المحلول المغذي، فإنه يتم فصلها بواسطة التقطير التجزيئي. ويستخدم التقطير التفريغي لتسهيل التقطير عند درجات الحرارة المنخفضة، على سبيل المثال عند درجة حرارة عملية التخمير، عن طريق تقليل الضغط فوق خليط السائل المراد تقطيره إلى أقل من ضغط بخاره. وقد استخدمت هذه الطريقة لاسترداد الإيثانول مباشرةً من المخمر وأيضاً لمعالجة المواد الحساسة لدرجة الحرارة مثل البيتا-كاروتين لإزالة المذيبات دون ضرر لا مبرر له.

(٨,٢,٤,٢) التجريد الغازي Gas Stripping

يعدُّ التجريد الغازي بديلاً للتقطير حيث يتم إمرار غاز خلال المفاعل الحيوي لإزالة المنتج المتطاير، والذي يتم تكثيفه بعد ذلك واسترداده [١٩]. وتعدُّ الطريقة بسيطة، ولا تتطلب أجهزة باهظة الثمن. وعلاوةً على ذلك، لا يؤدي التجريد الغازي إلى إزالة المواد المغذية والمركبات الوسيطة في التفاعل، ويمكن أن يستخدم لإزالة المنتج في الموقع، مما يؤدي إلى خفض سمية المذيبات وزيادة الإنتاجية [٢٠].

(٣, ٤, ٢, ٨) التقطير الغشائي والتبخير المسبق Membrane Distillation and Pervaporation

تم توسيع إمكانات الأغشية إلى فصل المنتجات المتطايرة عن طريق التقطير الغشائي والتبخير المسبق، على التوالي [٢١، ٢٢]. ويتصل المحلول المغذي في كلٍ من التقنيتين بالجانب الداخل للغشاء، في حين يتم الحصول على المنتج الرشيح في شكل بخار على جانب المصب، والذي يتم بعد ذلك تكثيفه. ومع ذلك، فإن الفرق الأساسي بين الاثنين هو الدور الذي يؤديه الغشاء في الفصل (الشكل رقم ٨, ١١).



الشكل رقم (٨, ١١). فصل المنتجات المتطايرة خلال الأغشية في (أ) التقطير الغشائي و(ب) التبخير المسبق. في التقطير الغشائي يمر بخار المنتجات المتطايرة خلال مسام الغشاء ويتم تكثيفه على جانب الرشيح بعدة طرق مختلفة. في التبخير المسبق تنتشر الجزيئات في السائل المغذي خلال مسام الغشاء ويتم تحويلها إلى بخار على جانب الرشيح عن طريق تطبيق فراغ أو غاز حامل.

يستخدم غشاء التقطير غشاء غير مبلل دقيق المسام يمنع محاليل السائل من دخول مسامه؛ بسبب قوة التوتر السطحي، ويعمل فقط كحاجز للسطح البيني بين السائل والبخار دون المساهمة في أداء الفصل. يحدث الفصل في التقطير الغشائي عندما يمر البخار من المكونات عالية التطاير عبر مسام الغشاء من خلال آلية للحمل الحراري أو للانتشارية ويتكثف على جانب الرشيح للغشاء. وتكون القوة الدافعة للنقل هي فرق ضغط البخار عبر مسام الغشاء، والذي يتم الحفاظ عليه بوسائل مختلفة [٢٢].

وفي التقطير الغشائي ذو الاتصال المباشر يتصل كلاً من جانبي الغشاء بطورٍ سائل، ويستخدم السائل على جانب الرشيح كبيئة التكاثف للأبخرة التي تغادر محلول التغذية الساخن. وفي التقطير الغشائي ذو فجوة الهواء تتواجد فجوة هواء راكدة بين الغشاء وسطح التكثيف في حين في التقطير الغشائي ذي الغاز المكتسح يجتاح غاز خامل بارد جانب الرشيح من الغشاء حاملاً جزيئات البخار التي يتم تكثيفها خارج وحدة الغشاء، وفي التقطير

الغشائي التفريغي يتم استخدام تفريغ على جانب الرشيح والذي يكون أقل من ضغط التشبع للجزيئات المتطايرة التي يتم فصلها من محلول التغذية.

الأغشية الكارهة للماء المستخدمة في التقطير الغشائي هي تلك المستخدمة في الترشيح الدقيق والمصنعة من مواد فلوريدات البولي تيترافلوروإيثيلين (PTFE)، والبولي بروبيلين، والبولي فينيليدين، ولها حجم مسام في حدود ١٠ نانومتر–١ ميكروميتر. وقد استخدم التقطير الغشائي لإزالة المركبات العضوية المتطايرة من المحاليل المائية المخففة وحتى فصل المكونات غير المتطايرة، ومع ذلك فقد كان هناك قبول قليل للتطبيقات كبيرة النطاق بسبب القيود الكثيرة المتعلقة بخصائص الغشاء، والطاقة والتكاليف الاقتصادية.

من الناحية الأخرى، فإن التبخير المسبق يستخدم الأغشية الكثيفة المصنوعة من البوليمرات المتجانسة المنتفخة التي تجعل الأغشية نفاذة. وعلى عكس التقطير الغشائي تنتشر الجزيئات في سائل التغذية عبر الغشاء ويتم ادمصاصها في طور البخار في جانب المصب من الغشاء إما عن طريق خلق تفريغ وإما باستخدام غاز حامل [١٠]. وهكذا يعتمد الفصل على الذوبان النسبي وانتشارية كل مكون في مادة الغشاء مما يسمح بإزالة حتى المذيبات عالية الغليان. ويعطي تدفق الرشيح φ_m في التبخير المسبق على النحو التالي:

$$\phi_m = \frac{DKC}{d_m}\left(1-\frac{p_2}{p_1}\right) \qquad (٨,١٢)$$

حيث K هو ثابت الذوبان، D هو معامل الانتشار، C هو تركيز المكون في الغشاء، d_m هو سمك الغشاء، وp_1 و p_2 هما الضغط الجزئي على الجزء المحتجز والرشيح، على التوالي.

ويظهر التبخير المسبق انتقائية أعلى ولكن تدفقات أقل بكثير من التقطير الغشائي. واعتماداً على المكون المترشح فإن هناك وضعين: (أ) التبخير المسبق المحب للماء والذي يتم فيه فصل المياه من المخاليط المائية العضوية عن طريق ترشيحها بصورةٍ تفضيلية خلال غشاء محب للماء (على سبيل المثال كحول البولي فينيل) و(ب) التبخير المسبق المحب للمواد العضوية والذي يتم فيه ترشيح المركبات العضوية المستهدفة بصورةٍ تفضيلية من المخاليط المائية العضوية باستخدام أغشية محبة للمواد العضوية (على سبيل المثال، النيتريل، ومطاط البيوتاديين، والبولي داي ميثيل زيلوكسان).

وقد كان تطوير التبخير المسبق أيضاً بطيئاً نوعاً ما؛ نظراً لارتفاع استهلاك الطاقة، وانخفاض التدفق، وعدم كفاية الانتقائية، وصعوبة تصميم العملية. ومع ذلك، فقد كان هناك قدر كبير من الاهتمام على مدى السنوات في تطبيق التبخير المسبق للإزالة الانتقائية للمذيبات خلال التخمير وكذلك لتركيزها، وقد بذلت الجهود لصناعة أغشية ذات انتقائية محسنة. وهناك أيضاً اهتمام متزايد في تكامل التبخير المسبق مع التفاعلات الحفزية الحيوية لإزالة

المنتج في الموقع للمنتجات المثبطة [٢٣].ويتحقق فصل المخاليط الازوتروبيه بشكلٍ فعال عن طريق كلٍ من التقطير الغشائي والتبخير المسبق.

(٨, ٢, ٥) الفصل اعتماداً على ذوبان المنتج Separations Based on Product Solubility

تستخدم تقنيات الفصل التي تستخدم فرق ذوبان الجزيئات في طورين غير قابلين للامتزاج (أي الاستخلاص) أو نقص الذوبان تحت ظروف بيئية معينة (أي الترسيب أو التبلور) بصورةٍ شائعة لتركيز وتنقية المنتج. والميزة الرئيسة لهذه التقنيات هي بساطة التشغيل ولكنها تتطلب إضافة كواشف مساعدة والتي تحتاج إلى إعادة تدويرها.

(٨, ٢, ٥, ١) الاستخلاص Extraction

استخلاص السائل من السائل يعدُّ واحداً من أكثر وحدات التشغيل المتقدمة والمستخدمة على نطاقٍ واسع في الصناعات الكيميائية والتقنية الحيوية، بعد أن وجدت تطبيقات في تركيز وتنقية مجموعة متنوعة من المنتجات مثل الأستيرويدات، والمضادات الحيوية، والأحماض العضوية. ولاسترداد المنتجات الحيوية فإن الاستخلاص يتطلب معالجة الطور المائي (الذي يحتوي على المذاب) بمذيبٍ عضوي غير قابل للامتزاج، وبذلك سوف يوزع المذاب نفسه بين الطورين اعتماداً على الاختلاف في ذوبانه في السائلين [٧، ١٠].

وتسمى نسبة التركيز في الطورين بمعامل التوزيع ويعطي عن طريق $\alpha = Y_L/X_H$، حيث Y_L وX_H هي تركيزات المذاب في الطور الخفيف والطور الثقيل، على التوالي. ويمكن أن يتأثر معامل التوزيع بمذيب الاستخلاص (طبيعة التفاعل مع الماء)، وقيمة الأس الهيدروجيني (خاصةً للأحماض والقواعد الضعيفة)، ودرجة الحرارة، والأملاح (الأيونات العكسية للمواد المذابة الأيونية)، والمضافات الأخرى (المعدلات)، وإلى حدٍ صغير الضغط الخارجي على النظام.

على افتراض أن α ثابت وتدفق الكتلة للأطوار القابلة للامتزاج يكون محفوظاً، فإن توازن الكتلة على المذاب المستخلص يكون:

$$H(X_0 - X_1) = LY_1 \quad \text{or} \quad X_1 = X_0 - \frac{L}{H}Y_1 \tag{٨, ١٣}$$

باستبدال K_D في المعادلة السابقة،

$$X_1 = X_0 - \frac{L\alpha}{H}X_1 \tag{٨, ١٤}$$

$$\frac{X_1}{X_0} = \frac{1}{1+(L\alpha/H)} = \frac{1}{1+E} \qquad (٨,١٥)$$

حيث $E = L\alpha/H$ هو عامل الاستخلاص لمذاب في نظام محدد.

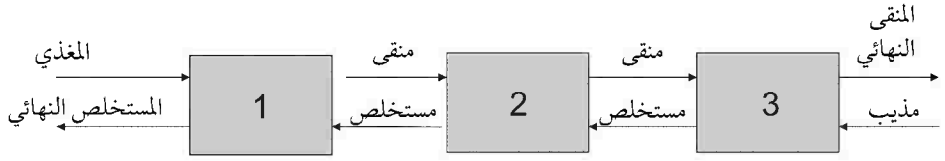
ويستخدم الاستخلاص متعدد المراحل في كثيرٍ من الأحيان لتحقيق كفاءة العملية القصوى، والذي يتم عادةً على النطاق الواسع في وضع معاكس (الشكل رقم ٨,١٢) باستخدام معدات مثل مستخلص بودبيلنياك للطرد المركزي، أو قواطع دلافال، أو جهاز فيستيفاليا للطرد المركزي الساكب. ولاستمرار التشغيل المعاكس، فإن المادة المتوازنة على المذاب المستخلص تنتج:

$$R = \frac{E(E^n - 1)}{E - 1} \qquad (٨,١٦)$$

حيث R هي نسبة الرفض (أي نسبة وزن المذاب المغادر في الطور الخفيف إلى ذلك في المرحلة الثقيلة) و n هو عدد مراحل التوازن. ويصبح جزء المذاب المستخلص:

$$\%\ \text{extraction} = 1 - \frac{1}{R+1} \qquad (٨,١٧)$$

وفي حالة الاستخلاص من مخلوط خام، فمن الأفضل إزالة الخلايا أو الجسيمات الأخرى لتجنب تشكيل المستحلبات في السطح البيني. وبعد الاستخلاص تتم إزالة المنتج من المذيبات إما عن طريق التقطير (للمنتج في حالة المذيبات عالية الغليان أو المذيبات ذات نقطة الغليان المنخفضة)، وإما عن طريق الاستخلاص العكسي إلى المرحلة المائية.



الشكل رقم (٨,١٢). الوضع المعاكس متعدد المراحل لاستخلاص السائل من السائل.

وقد يكون من السهل نسبياً استخلاص المواد المذابة المحبة للدهون؛ بسبب تفضيلها للتوزيع في الطور العضوي. ولكن في حالة استخلاص الجزيئات الأقل كرهاً للماء فإنه غالباً ما تؤخذ عوامل أخرى في الاعتبار. بالنسبة للمواد المذابة المشحونة فمن الممكن استغلال ثوابت تفككها لتحقيق فصل فعال، أي أنه يمكن عمل الفصل تحت قيمة الـ pK_a للأحماض وأعلى من قيمة الـ pK_a للقلويات عندما تكون في الغالب في صورةٍ غير متأينة كما هو مبين:

$$\text{pH-p}K_a = \log_{10}\left[\frac{\alpha^0}{\alpha} - 1\right] \text{ for acids} \quad (٨,١٨)$$

$$\text{p}K_a\text{-pH} = \log_{10}\left[\frac{\alpha^0}{\alpha} - 1\right] \text{ for bases} \quad (٨,١٩)$$

حيث α^0 هو معامل التوزيع الحقيقي، أي نسبة تركيز المذاب غير المتأين في الطور العضوي والمائي، على التوالي، وα هي معامل التوزيع الفعال، مع الأخذ في الاعتبار المكون المتأين للمذاب في الطور المائي. ويمكن استخدام الاختلافات في قيمة الـ pK_a للمكونات القابلة للتأين للتغلب على النسبة السلبية لمعاملات التوزيع وتحقيق لفصلها من خليط.

والاستخلاص التفاعلي هو طريقة أخرى لتسهيل الاستخلاص، والذي يعتمد على تفاعل عكسي بين الحمض والمستخلص (الناقل) مثل الأمينات الأليفاتية أو مركب فسفوري المضافة إلى المذيب [٢٤]. ويكون المتراكب المتكون أيضاً غير قابل للذوبان في الطور المائي، وعليه يتم حمل المذاب إلى الطور العضوي. ويجري تطبيق هذه الطريقة في استخلاص الأحماض العضوية.

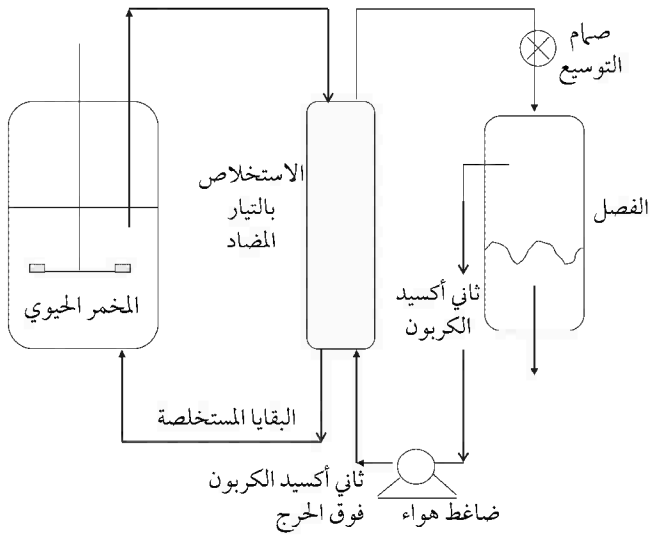
غالباً ما يكون الاستخلاص هو الأسلوب المفضل عندما يمكن تطبيقه لاسترداد المنتج؛ ومع ذلك تحتاج بعض العيوب مثل استرداد المذيبات المكلفة، والشواغل البيئية، وجوانب السلامة إلى النظر فيها. وعلاوةً على ذلك، تحد مشكلات تكوين المستحلب والسمية للخلايا من استخدام الاستخلاص بالمذيبات كتقنية لإزالة المنتج في الموقع.

ويتم تجنب الاتصال المباشر للمذيب بالخلايا عن طريق دمج الاستخلاص بالمذيبات مع التنفيذ الغشائي في تقنية تسمى الاستخلاص التنفيذي. ويمكن نقل الجزيئات التي تنقسم إلى السائل حاشيةً مسام الغشاء باستخدام الغشاء بوصفها حاجزاً مائياً بين محلول مائي مغذي ومذيب عضوي. على سبيل المثال، تستخدم الأغشية الكارهة للماء، والتي لها مسام مملوءة بالطور العضوي، لاستخلاص المنتجات غير القطبية من البيئة المائية.

استخلاص السوائل فوق الحرجة أدت العيوب المرتبطة بالاستخلاص بالمذيبات إلى اهتمامٍ متزايد في تطوير استخلاص السوائل فوق الحرجة (SFE) كتقنية استخلاص بديلة. والسوائل فوق الحرجة (SCFs) هي مواد تتواجد كسوائل فوق درجة حرارتها الحرجة وضغطها الحرج. ويكون الكثير من خصائص الـ SCFs (على سبيل المثال، الانتشارية، واللزوجة الحركية، والكثافة) متوسطة بين تلك في حالة الغازات والسوائل، والتي توفر ظروف أفضل للاستخلاص مثل نقل الكتلة أسرع مما هو عليه في السوائل [٢٥]. وعلاوةً على ذلك، تكون خصائص المذيبات من الـ SCFs شديدة الحساسية للتغيرات في كلٍ من درجة الحرارة والضغط، ويستخدم مذيب تعاوني (على سبيل المثال، الإيثانول)، والذي يوفر الفرصة لتصميم قوة المذيب لتطبيق معين. والـ SCF المستخدم في الاستخلاص

الحيوي هو ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج؛ بسبب درجة حرارته الحرجة المنخفضة نسبياً (٣١,٣ درجة) والضغط (٧٢,٩ بار). وهناك حالياً اهتمام كبير في استخدام ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج كمذيب "أخضر" خلال التحويلات الإنزيمية للمواد الكارهة للماء.

وفي عملية استخلاص نموذجية مستخدمة لاسترداد المنتج يتم استخلاص المواد الخام بثاني أكسيد الكربون فوق الحرج المضغوط في عمود استخلاص. ثم يتم نقل الـ SCF المحمل إلى جهاز فصل حيث يتم خفض الضغط بحيث يتحول السائل إلى غاز، محرراً المنتج كراسب. ويتم ضغط الغاز وإعادة تدويره إلى عمود الاستخلاص (الشكل رقم ١٣,٨).



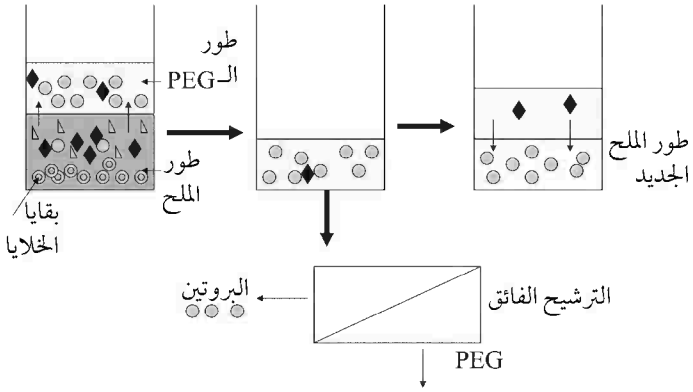
الشكل رقم (١٣,٨). مخطط لاستخدام استخلاص السوائل فوق الحرجة في عمليات التجهيز النهائي في التقنية الحيوية الصناعية. يتم استرداد المنتج المستخلص إلى ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج بعد خفض الضغط والغاز ويتم إعادة ضغط غاز ثاني أكسيد الكربون وإعادة تدويره [١٠].

وتجعل ضرورة وجود معدات عالية الضغط استخلاص السوائل فوق الحرجة أكثر تكلفة من الاستخلاص بالمذيبات. وعلى الرغم من هذا، فإنه تتواجد بعض التطبيقات المجدية اقتصادياً على المستوى الكبير (على سبيل المثال، استخلاص الزيوت والقهوة). وإلى جانب الاستخلاص المباشر للمحلول المغذي يمكن استخدام الـ SCF لإزالة بقايا المذيبات من المنتج المسترد عن طريق الاستخلاص بالمذيبات.

الاستخلاص المائي ثنائي الطور (ATPS) عندما يقتصر الاستخلاص بالمذيبات والسوائل فوق الحرجة على استرداد الجزيئات العضوية الصغيرة، فإنه يتم استخلاص البروتينات باستخدام النظم المائية ثنائية الطور على

النحو المذكور سابقاً في القسم (٨,٢,١) [١٤]. ويكون أساس الفصل في الـ ATPS هو التوزيع الانتقائي بين الطورين. وبينما تتوزع الجزيئات الصغيرة بصورة أكثر أو أقل تساوياً بين الطورين، يكون توزيع الجزيئات الكبيرة متغيراً للغاية. ويخضع هذا التوزيع إلى عددٍ من العوامل المتعلقة بخصائص الأطوار والمذاب وكذلك التفاعلات بين الاثنين. ويمكن جعل التقسيم أكثر انتقائية، على سبيل المثال عن طريق التلاعب في خصائص النظام لجعل نوع تفاعل معين سائداً.

يكون الـ ATPS سهل الاستخدام ويمكن أن يؤدي إلى تكامل الترويق، والتركيز، والتنقية للبروتينات في عملية تشغيل واحدة. ويتم استرداد بعض الإنزيمات على المستوى الصناعي عن طريق الـ ATPS. ويشيع استخدام النظم المصنوعة من البولي إيثيلين جليكول (PEG) والملح بسبب تكلفتها المنخفضة. ويتم اختيار ظروف الاستخلاص بحيث يتوزع البروتين المستهدف إلى الطور الأعلى الغني بالـ PEG بينما تتوزع جسيمات الخلايا وغالبية الملوثات الذائبة في الطور الأسفل (الشكل رقم ٨,١٣). ويتم فصل الطور بعد خلط مكونات الطور مع متجانسات الخلايا، ويتم استرداد البروتين من الطور الأعلى إما عن طريق خطوة تقسيم ثانية إلى طورٍ ملحي جديد وإما عن طريق الترشيح الفائق كما هو مبين في الشكل رقم (٨,١٤).



الشكل رقم (٨,١٤). استخلاص البروتينات في نظام مائي ثنائي الطور مصنوع من البولي ايثيلين جليكول (PEG) والملح. ويتم توزان متجانس الخلايا الذي يحتوي على البروتين المهم مع مكونات الطور في ظل ظروف تسمح للبروتين بأن يتوزع إلى الطور الأعلى الغني بالـ PEG. ويتم فصل الأطوار واسترداد المنتج من طور الـ PEG إما عن طريق الترشيح الفائق لإزالة البوليمر وإما بواسطة خطوة توزيع ثانية بحيث يتوزع البروتين إلى طور الملح والذي يمكن فصله منها بسهولة.

الفصل اللوني المعاكس يمكن لاستخلاص السائل من السائل أن يوفر فصل عالي الجودة للمواد المذابة عند إجرائه في وضع الفصل اللوني المعاكس. يمكن أن يكون الطورين السائلين غير القابلين للامتزاج مائي–عضوي،

أو عضوي–عضوي، أو مائي–مائي. ويتم استخدام طور مائي واحد كطورٍ ثابت والذي يتصل به الطور المتحرك في أوضاع مختلفة. ويوظف الوضع الأكثر تطوراً للفصل اللوني المعاكس حركة كوكبية لأنبوب حلزوني موجود حول طبلة في مجال طرد مركزي والذي يوفر مناطق متبادلة لخلط الأطوار وفصل السائلين غير القابلين للامتزاج في الملف [٢٦]. ويتم الاحتفاظ بالطور الثابت الثقيل في الملف بينما يتم ضخ الطور المتحرك الخفيف خلاله. ويتم إدخال المواد المذابة المراد فصلها إلى الملف مع الطور المتحرك وتتعرض لتوزيع متعدد المراحل. ويمكن تبني هذه التقنية لتطبيقات إزالة المنتج في الموقع، حيث يكون استخدام المذيبات التي توفر الاستخلاص الانتقائي مرغوباً فيه [٤]. وعند استخدام تقنية إزالة المنتج في الموقع، فإنه يمكن أيضاً تقييد الإنزيمات أو الخلايا الكاملة في الطور الثابت للملف في حين يتم توزيع المنتج بصورةٍ تفضيلية في الطور المتحرك.

(٨,٢,٥,٢) الترسيب والبلورة Precipitation and Crystallization

يعتمد الترسيب والبلورة على الانتقال من الطور السائل إلى الصلب تحت ظروف فيزيائية كيميائية محددة.

الترسيب يشيع استخدامه في عمليات التجهيز النهائي للبروتينات لتركيز المنتج، ويمكن أيضاً استخدامه لتحقيق درجة معينة من التنقية. وتشمل مزاياه القدرة على التكيف مع التجهيز المستمر والنطاقات الأكبر، والتشكيلة الواسعة من المرسبات الممكنة، والقدرة على الاحتفاظ بالنشاط الحيوي. وعلى الرغم من أن هناك وسائل عديدة لترسيب البروتينات، فإن الإزالة بالملح هي الأكثر شيوعاً باستخدام تركيزات عالية من كبريتات الأمونيوم أو كبريتات الصوديوم، والترسيب عن طريق إضافة المذيبات (مثل الإيثانول أو الأسيتون) عند درجة حرارة منخفضة.

في الإزالة بالملح، تتفاعل أيونات الملح المضاف مع الماء بقوةٍ أكبر، مما يسبب ترسيب البروتين بسبب زيادة التفاعلات الكارهة للماء. وتعطي قابلية ذوبان البروتينات كدالة لقوة المحلول الأيونية بواسطة:

$$\log\frac{S}{S_0} = -K_s(I) \qquad (٨,٢٠)$$

حيث S هو ذوبان البروتين في المحلول عند قوة أيونية I، S_o هو الذوبان عند قيمة قوة أيونية صفر، و K_s هو ثابت الإزالة بالملح، والذي هو دالة لدرجة الحرارة ودرجة الحموضة. وتساوي القوة الأيونية للمحلول

$$I = \frac{1}{2}\sum C_i Z_i^2 \qquad (٨,٢١)$$

حيث C_i وZ_i هما التركيز المولي والشحنة لأنواع الأيونات، على التوالي.

ويحدث ترسيب البروتينات عند إضافة المذيبات العضوية بسبب تقليل ثابت العزل الكهربائي للمحلول وفقاً لـ:

$$\log\frac{S}{S_0} = -\frac{K'}{D_\varepsilon^2} \qquad (٨,٢٢)$$

حيث D_ε هو ثابت العزل الكهربائي للمحلول ويعتمد الثابت 'K على درجة الحرارة والبروتين المستخدم. ويسهل خفض ثابت العزل الكهربائي من الترسيب بسبب زيادة التفاعلات الكهربائية بين جزيئات البروتين.

ويمكن أيضاً تطبيق الترسيب لإزالة الحمض النووي خلال تنقية منتج حيوي من الخلايا الميكروبية. ومن بين المنتجات الحيوية منخفضة الوزن الجزيئي، فإنه يتم ترسيب الأحماض العضوية كأملاح للكالسيوم. ويمكن أيضاً عزل الأحماض العضوية كمتراكبات شحيحة الذوبان، على سبيل المثال، يتم استرداد السيفالكسين عن طريق التراكب مع البيتا-نافثول وتكون الطريقة مناسبة لإزالة المنتج في الموقع [٢٧]. وأياً ما كان اختيار تقنية الترسيب، فإن المرء يحتاج للنظر في تأثيرها على عمليات التجهيز النهائية اللاحقة وأيضاً معاملة النفايات المتولدة.

التبلور هو واحد من أكثر وسائل التنقية القوية المتاحة وعادةً ما يستخدم كخطوة نهائية لصقل وصياغة المنتجات الكيميائية من محلول يحتوي على مجموعة متجانسة من جزيئات المنتج. وحتى في حالة المنتجات البروتينية، فإنه يتم الآن توسيع مفهوم التبلور الذي كان مقصوراً في السابق على تحديد تركيبها ثلاثي الأبعاد، وذلك من أجل تطبيقه كتقنية تجهيز نهائية للاسترداد مباشرةً من المحاليل غير النقية نسبياً وحتى من محلول التخمير [٢٨]. وتجعل إمكانية استبدال الأساليب المنافسة مثل الفصل اللوني بتقنية بسيطة نسبياً وغير مكلفة، البلورة تقنية جذابة، مع المزايا الإضافية من حيث الصياغة والتخزين. وقد تبين أن إزالة المنتج في الموقع من المخمر تكون ممكنة عن طريق دائرة بلورة خارجية [٢٩].

ويكون التشبع الفائق هو القوة الدافعة للتبلور، والتحكم في التشبع الفائق هو الجانب الحاسم للعملية. وغالباً ما يكون تبخر المذيبات غير مرغوب فيه؛ بسبب الثبات الحراري المحدود للمنتجات، وعليه فقد أجريت محاولات لاستخدام طرق بديلة لإزالة المياه. في نزح المياه التناضحي، يتم نقل المذيبات عبر أغشية انتقائية للمذيبات تحت ضغط. وتعتمد البلورة الاستخلاصية على ميل بعض مخلوطات المذيبات المائية للتقسيم إلى طورين سائلين عند التغيرات الصغيرة في درجة الحرارة بحيث يصبح المذاب المائي أكثر تركيزاً في حجم أصغر ويتبلور في نهاية المطاف، في حين تتم إعادة تدوير المذيب النقي.

يستخدم التبلور التجزيئي لفصل مخلوطات متعددة المكونات، على سبيل المثال الأحماض العضوية، والمونومرات، والمصاوغات، وما إلى ذلك، إلى أجزاء ضيقة، مما يؤدي في النهاية إلى درجات نقاء عالية للمكونات

المختارة. وتشمل طريقة الغشاء الهابط للتبلور التجزيئي (شركة سولزر كيمتيك، سويسرا) نمو البلورات على سطح يتم تبريده خارجياً بواسطة غشاء هابط لمبرد في الوقت نفسه. ويحفز تسخين جدار الأنبوب الذوبان الجزئي (التعرق) للبلورات ويتم تصريف المواد المنصهرة. وفي نهاية المطاف يتم إذابة طبقة البلورات المتبقية وجمعها كمنتج، في حين يتم إعادة تدوير جزء العرق من أجل البلورة. وعلى نحو مماثل، يمكن تعريض الرواسب المصروفة في الطور الأول لنفس الطريقة لتعطي عوائد أفضل.

تبلور المتصاوغات الفراغية هو الأسلوب السائد المستخدم في تحليل المخاليط الراسمية، والذي يقوم على أساس ربط عامل محلل إلى نظائر ضوئية ليعطي زوج من أملاح المصاوغات الفراغية والتي يمكن فصلها بسهولة بسبب الاختلاف في الذوبان [٣٠]. على سبيل المثال، يشيع استخدام إل-ليسين كعامل محلل لفصل النظائر الضوئية للإيبوبروفين؛ وملح دي-إيبوبروفين-إل-ليسينات له قابلية للذوبان أقل بكثيرٍ من ملح النظير الضوئي إل- وعليه يمكن فصله بسهولة [٣١]. وفي معظم الحالات، يتم استرداد العامل المحلل بعد فصل النظير الضوئي المطلوب من ملح المصاوغات الفراغية ويصبح متاحاً لإعادة استخدامه. وإذا تم إعادة راسمية النظير الضوئي المتبقي غير المرغوب فيه، فإنه يمكن استرداد مادة مطلوبة أكثر من المخلوط. ويمكن أيضاً استخدام تبلور المصاوغات الفراغية للحصول على نقاوة أعلى (على سبيل المثال، بعد التحليل الإنزيمي للراسيميات).

(٦, ٢, ٨) فصل الجزيئات اعتماداً على الادمصاص على مصفوفة صلبة

Molecular Separations Based on Adsorption to a Solid Matrix

إن ادمصاص المواد المذابة في الماء على مواد ماصة صلبة بواسطة آليات مختلفة هو وسيلة شائعة لفصلها عن سائل التغذية، وتوفر طريقة مفيدة لتركيز وتنقية المنتجات. في الادمصاص الفيزيائي، تهيمن القوى الضعيفة مثل قوى فان دير فال، في حين يستعمل ادمصاص التبادل الأيوني روابط أيونية قوية. والكربون المنشط هو مادة ماصة تستخدم في كثيرٍ من الأحيان لإزالة اللون من محاليل التخمير. وتستخدم راتنجات التبادل الأيوني وغيرها من الممتزات البوليمرية لفصل المواد العضوية الصغيرة، على سبيل المثال المضادات الحيوية، والأحماض الأمينية وغيرها، وأيضاً الجزيئات الكبيرة. وتعتمد قدرة الامتزاز على طبيعة الممتزات والمذاب، والظروف الفيزيائية الكيميائية المستخدمة.

وتستند عملية الامتزاز، مثل الاستخلاص على علاقة توازن بين تركيز المذاب في الطور السائل والطور المساعد (الصلب)، والتي تحدد إلى أي مدى يمكن للمذاب أن يدمص على سطح. وقد تم وصف علاقات التوازن عن طريق عدة أنواع من الامتزاز الأيزوثيرمي. ويستخدم أيزوثيرم فرويندليش على نطاقٍ واسع في النظم الصلبة- السائلة:

$$C_S^* = K_F C_L^{*(1/n)} \quad (٨,٢٣)$$

حيث C_L^* و C_S^* هي تركيزات التوازن من المذاب في الطور السائل والصلب، على التوالي؛ K_F و n هي ثوابت مميزة لنظام ادمصاص معين؛ وتعتمد أبعاد K_F على أبعاد C_S^* و C_L^* وقيمة n والتي تكون أكبر من ١ إذا كان الامتزاز ملائماً و أقل من ١ إذا كان الامتزاز غير مواتياً.

يستند أيزوثرم لانجموير على امتزاز الجزيئات كطبقة أحادية وكثيراً ما يستخدم لتحديد ادمصاصات البروتين:

$$C_S^* = \frac{C_{Sm} K_L C_L^*}{1 + K_L C_L^*} \quad (٨,٢٤)$$

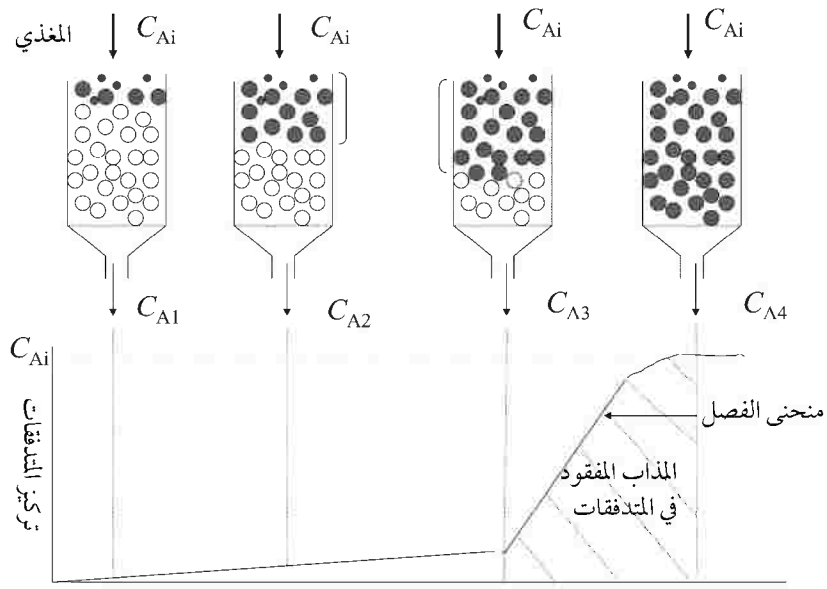
حيث C_{Sm} هي الحد الأقصى لتحميل المذاب على الممتزات. K_L هو ثابت توازن لانجموير الذي يعتمد على شدة قوي الربط على السطح؛ وقيمته دائماً أكبر من الصفر. وفي حالة البروتينات تعتمد K_L على نقطة التعادل الكهربية للبروتين، ودرجة الحموضة، والقوة الأيونية للمحلول.

وغالباً ما تستخدم ممتزات الجسيمات في أنواعٍ مختلفة من الموصلات الصلبة–السائلة مثل الوسادة المعبأة، والوسادة المتحركة، والوسادة المتخللة أو مقاومات الوعاء ذو التقليب. ومقاومات الوسادة المعبأة والمتحركة هي الأكثر استخداماً؛ لأنها توفر أكبر مساحة امتزاز لكل وحدة حجم. ويوضح الشكل رقم (٨,١٥). تشغيل ممتز الوسادة المعباءة سفلي التدفق. وقد تم اشتقاق الأغشية الدقيقة/ الفائقة بمجموعات نشطة لتسهيل ادمصاص المواد المذابة مباشرةً من المحلول الخام؛ وهذه يمكن إزالتها واستردادها في وقتٍ لاحق في الرشيح [١١].

ويعتمد تحليل الامتزاز في عمود الوسادة المعبأة على فرق توزان الكتلة في تدفقات المدخلات والمخرجات. ويحدث إدخال وإزالة المواد المذابة من جزء محدد فـي وسادة معبأة بشكلٍ رئيس بواسطة تدفق السائل إلى أسفل العمود، بينما يمكن ربط آليات أخرى لعمليات المزج الموضعي والانتشار داخل الفجوات بين جسيمات الممتزات. وسوف يحدث تراكم للمواد المذابة؛ بسبب الادمصاص إلى السطح الداخلي والخارجي للممتزات، وحتى فـي الفجوات بين جسيمات الممتزات. ويمكن تبسيط التحليل من خلال عدم أخذ آثار التشتت المحوري في الاعتبار لإعطاء:

$$U\frac{\partial C_L}{\partial z} + \varepsilon\frac{\partial C_L}{\partial t} = -(1-\varepsilon)\frac{\partial C_S}{\partial t} \quad (٨,٢٥)$$

حيث U هي سرعة السائل السطحية، C_L هو تركيز المذاب في السائل، C_S هو متوسط تركيز المذاب في الطور الصلب، Z هو عمق الوسادة، t هو الزمن، وε هو الجزء الفارغ في الوسادة. ويمثل الشق الأول في المعادلة نقل الحمل الحراري للمذاب في الوسادة، الشق الثاني هو معدل تغيير تركيز المذاب في السائل حول جزيئات الممتز، والشق الأخير هو معدل نقل المذاب من الطور السائل إلى الطور الصلب.



الشكل رقم (٨,١٥). انتقال منطقة الادمصاص في ممتز وسادة معبأة ومنحني الانفراج المقابل. يتم إدخال المحلول المغذي الذي يحتوي على المذاب بتركيز C_{Ai} في الجزء العلوي من عمود محمل بالممتز والذي يحمل المذاب، والمحلول الخارج من العمود يكون منخفض التركيز من المذاب. عندما يتحرك السائل إلى أسفل العمود تتحرك منطقة وسادة الممتز حيث يحدث معظم الادمصاص، وتتحرك منطقة الادمصاص إلى أسفل العمود وتصل في النهاية إلى أسفل الوسادة. وعندما يتشبع العمود تقريباً يبدأ تركيز المذاب في المحلول المتدفق في الارتفاع (نقطة التوقف) ويصل لمستوى تركيز الداخل. مأخوذة بإذن من دوران [٩]، الصحافة الأكاديمية.

وإذا كان محتوى السائل حول الجزيئات صغيراً مقارنةً مع إجمالي حجم الوسادة، فيمكن أيضاً إلغاء الشق الثاني. وعند استبدال $\delta C_s/\delta_t = K_a(C_L\text{-}C_L^*)$ (حيث K_a هو معامل نقل الكتلة الكلي الذي يصف نقل مقاومة الكتل الداخلية والخارجية)، فيمكن تبسيط المعادلة أكثر إلى:

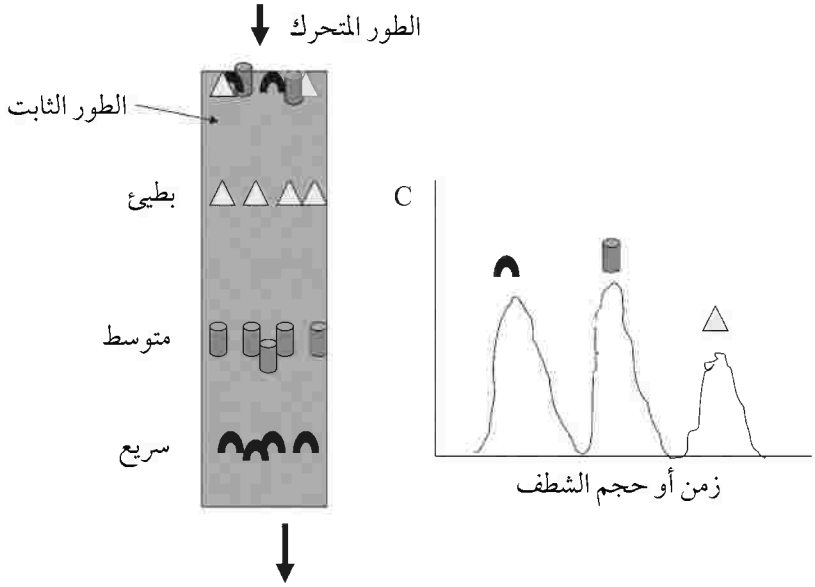
$$U\frac{\partial C_L}{\partial z} = -K_a(1-\varepsilon)(C_L - C_L^*) \qquad (٨,٢٦)$$

وسوف تعتمد قيمة K على خصائص السائل وظروف التدفق. وتسلط المعادلة سابقاً الضوء على أهمية نقل الكتلة في نظم الادمصاص. ونادراً ما يتحقق التوازن في نظم الادمصاص التجارية، حيث يتم التحكم في الأداء بواسطة معدل الادمصاص العام. ويمكن تحقيق تحسينات في الادمصاص عن طريق تقليل مقاومة نقل الكتلة.

وبعد الادمصاص من محلول التغذية يأتي غسيل المواد الماصة لإزالة المواد المذابة المرتبطة بطريقة بسيطة قبل إزالة المنتج المراد. وبعد ذلك تتم إعادة تدوير المواد الماصة بعد تجديدها.

(٨,٢,٦,١) الفصل اللوني الادمصاصي Adsorption Chromatography

يشكل الفصل اللوني على وسادة جسيمات ممتزة تقنية عالية الدقة لفصل المواد المذابة ويستخدم على نطاقٍ واسع من مستوى المختبرات إلى الصناعة لتنقية معظم المنتجات عالية القيمة للتقنية الحيوية [٧، ١٨]. وهو يستخدم فرق امتزاز الجزيئات على سطح مصفوفة مشتقة لتحتوي على مجموعات وظيفية مرتبطة تساهمياً (الشكل رقم ٨,١٦). ويمكن إزالة المواد المذابة المرتبطة بالمصفوفة بدرجات انجذاب مختلفة باستخدام مزيل مناسب. وكلما تحركت المواد المذابة إلى أسفل العمود مع تيار المزيل، فإنها تواصل الادمصاص من المصفوفة؛ وسوف تكون الكيانات ضعيفة الارتباط أكثر سهولة في إزالتها وتتحرك إلى الأمام بسرعة أكبر. وعليه ، فإن كل مكون مفصول بواسطة الفصل اللوني لديه حجم إزالة مختلف V_e (أي حجم المزيل المطلوب ليحمل المذاب خلال العمود حتى يخرج في تركيزه الأقصى).



الشكل رقم (٨,١٦). مبدأ الفصل اللوني السائل. تتم إزالة المواد المذابة المرتبطة بدرجات مختلفة إلى الطور الثابت في أوقات أو أحجام إزالة مختلفة من العمود، عن طريق تغيير تكوين الطور المتحرك بطريقة متدرجة أو مستمرة.

من الناحية المثالية فإنه ينبغي أن تخرج المواد المذابة من العمود في نطاقات إزالة ضيقة عند أزمنة مختلفة ومفصولة جيداً عن بعضها البعض. ومع ذلك، ففي الممارسة العملية تنتشر نطاقات الإزالة؛ بسبب آثار الانتشار التي قد يتعرض لها المذاب في العمود. ويتم تحليل ما يسمى بانتشار المنطقة في الفصل اللوني باستخدام مفهوم اللوحات النظرية. ويتم اعتبار العمود اللوني متكوناً من عدد من القطاعات أو اللوحات ذات طول H، ومقدارها

من نفس مقدار قطر جزيئات الممتز والتي يفترض أن يحدث التوازن خلالها. كلما انخفض ارتفاع اللوحة أو تساوى مع اللوحة النظرية (HETP) ضاقت قمة المذاب. ويتم التعبير عن الـ HETP عن طريق:

$$H = \frac{A}{u} + Bu + C \qquad (٨,٢٧)$$

حيث u هي سرعة السائل الخطية، A، B، C هي تأثيرات نقل الكتلة السائلة-الصلبة، أمام وخلف التشتت المحوري، والتوزيع غير المثالي للسائل حول التعبئة، على التوالي. ويؤدي خفض قيم A، B، C إلى انخفاض في الـ HETP.

ويرتبط الـ HETP لمذاب خاص بحجم إزالته وعرض قمة الإزالة كما يظهر على الكروماتوجرام. وبافتراض أن قمم الإزالة تكون متناظرة، فإنه يمكن حساب عدد اللوحات النظرية N كما يلي:

$$N = 16\left(\frac{V_e}{w}\right)^2 \qquad (٨,٢٨)$$

w هي عرض قاعدة القمة. وتنطبق المعادلة أعلاه عندما يتم إدخال العينة كنبضة ضيقة. ويتم تعيين طول العمود L بواسطة N و HETP وفقاً لما يلي:

$$N = \frac{L}{H} \qquad (٨,٢٩)$$

وعليه، فإنه بالنسبة لعمود معين فكلما زادت N زاد عدد مراحل التوازن وكان الفصل أكثر كفاءة. وفي حالة القمم الواسعة، فيمكن أن يحدث التداخل حتى عند عدد اللوحات العالي. وتحدد قدرة العمود على فصل القمم (أي التحليل R) كذلك أداء عمود الفصل اللوني:

$$R = \frac{2(V_{e1} - V_{e2})}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)} = \frac{\Delta t_r}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \qquad (٨,٣٠)$$

حيث V_{e1} و V_{e2} هي أحجام الإزالة، w_1 و w_2 هي عرض القمم عند القاعدة، وσ_1 وσ_2 هي الانحرافات المعيارية للمكونات ١ و٢، على التوالي؛ Δt_r هي المسافة بين أعلى القمتين الممثلتين بكلٍ من V_{e1} و V_{e2}. ينبغي أن تكون R أكبر من ١ لتوفير فصل جيد للمكونات.

ويمكن أن تتم إزالة المواد المذابة المرتبطة باستخدام الطور المتحرك في وضع أيزوقراطي (يكون تركيب الطور المتحرك ثابتاً خلال الفصل) أو غير أيزوقراطي (يتغير تركيب الطور المتحرك). ويستخدم وضع بديل للإزالة في الفصل اللوني الإزاحي، حيث يتم إدخال مزيح، وهو مادة ذات انجذاب عالي للغاية بالنسبة للطور الثابت، إلى العمود والتي تتنافس على مواقع الادمصاص وتزيح المكونات المرتبطة من العمود.

يتم تكوين الأطوار الثابتة المستخدمة في الفصل اللوني للمنتجات الحيوية من كلٍ من المواد غير العضوية (مثل السيليكا) والعضوية (البوليمر الاصطناعي والطبيعي). ومن أجل الحصول على مساحة سطح عالية، فإنه يتم استخدام المصفوفات المسامية ذات متوسط حجم مسام ١٠٠-٣٠٠ ميكروميتر. ويتم نقل الكتلة داخل مسام الجسيمات أساساً عن طريق الانتشار. من الناحية الأخرى، يحدث نقل الكتلة عن طريق الحمل الحراري بدلاً من الانتشار في نظم الطور الثابت اعتماداً على صور الغشاء. وتتيح حركية الادمصاص السريعة وانخفاض الضغط مرة أخرى باستخدام معدلات مرتفعة وسهولة زيادة المستوى في الفصل اللوني بغشاء الادمصاص. وتستخدم حالياً أطوار ثابتة جديدة وهي الدعامات المتجانسة، والتي يتم صبها كأطوار متجانسة متصلة بدلاً من الجزيئات الفردية المعبأة في عمود [٣٢، ٣٣]. ويمكن استخدام الدعامات المتجانسة لتحقيق الفصل الكفء عند معدلات التدفق العالية.

ويعدُّ الفصل اللوني التبادلي للأيونات إلى حدٍ بعيد هو الأسلوب الأكثر استخداماً على نطاقٍ واسع؛ بسبب قابليته للتطبيق العام، وفصله الجيد، وقدرته العالية. ويمكن استخدامه في المرحلة الأولى من عملية التجهيز النهائي لتوفير التنقية وتقليل حجم سائل العملية. ويتم فصل المركبات على مبادل للأيونات وفقاً للاختلاف في شحنات سطحها. وتستخدم مبادلات الأنيونات (التي لها مجموعات موجبة الشحنة مثل الداي إيثيل أمينو إيثيل) لربط المواد المذابة سالبة الشحنة وتستخدم مبادلات الكاتيونات (التي لها مجموعات سالبة الشحنة، على سبيل المثال، الكاربوكسي ميثيل) لربط المواد المذابة موجبة الشحنة. وتتم إزالة المواد المذابة إما عن طريق زيادة تركيز الملح وإما عن طريق تغيير الرقم الهيدروجيني للطور المتحرك.

ويتم فصل المواد غير القطبية بدون تغيير عن طريق الفصل اللوني عكسي الطور على أطوار ثابتة ذات روابط كارهة للماء مرتبطة تساهمياً (سلاسل الألكيل-C_4، C_8، C_{18} أو المجموعات الوظيفية العطرية). ويتطلب التفاعل القوي للمذاب مع الطور الثابت إزالته من خلال استخدام المزيلات المائية العضوية. ويعتمد الفصل اللوني ذو التفاعلات الكارهة للماء (HIC) الذي يستخدم لتنقية البروتينات على التفاعلات الكارهة للماء الضعيفة نسبياً بين الروابط الكارهة للماء الضعيفة والأحماض الأمينية الكارهة للماء التي يمكن الوصول إليها على سطح البروتين. ويمكن تعزيز الادمصاص على الـ HIC عند تركيز الملح العالي في حين يتم تسهيل الإزالة عن طريق خفض تركيز الملح أو درجة الحرارة أو قطبية البيئة.

والفصل اللوني الانجذابي، على أساس التعرف الجزيئي، هو الصورة الأكثر انتقائية للفصل اللوني للبروتينات. وهو يستغل الارتباط الانتقائي للبروتين إلى رابطة انجذابية مقيدة على مصفوفة. وقد تكون الروابط تخصصية لبروتين أو مجموعة من البروتينات، وتتراوح من الأجسام المضادة، والمستقبلات، ونظائر أوساط التفاعل، والمثبطات، والعوامل المساعدة لأيونات المعادن، وقد تكون أيضاً ذات تخصصية حيوية زائفة مثل

الأصباغ الاصطناعية. وتكون الروابط الحيوية حساسة دائماً للتلف وأيضاً أكثر تكلفة. وعليه فإنها تستخدم في نهاية مخطط التنقية. ومن الناحية الأخرى، يمكن استخدام الروابط غير الحيوية مبكراً في عملية التنقية ويمكن أن تساعد على تقليل عدد خطوات الحصول على منتج نقي.

كما تم استغلال الفصل اللوني بشكلٍ كبير في الفصل الفراغي على أساس درجة اختلاف التفاعل بين الطور الثابت والنظائر الضوئية المختلفة، مما يؤدي بذلك إلى أوقات احتفاظ مختلفة ثم الفصل. ويوجد الكثير من الأطوار الثابتة الفراغية المتاحة ولكن أثبتت قلة فقط، مثل السكريات العديدة والأطوار القائمة على البروتينات، أنها تكون متعددة الاستعمالات. وقد تم اقتراح عملية للفصل اللوني هجينة مع التبلور حيث يمكن أن يوفر الفصل اللوني فصلاً أولياً جيداً للنظائر الضوئية، ويصبح أكثر اقتصاداً أن نجمع بينه مع التبلور لاسترداد المنتج الصلب في صورةٍ نقية (كيرال للتقنيات، كاليفورنيا، الولايات المتحدة الأمريكية). ومع ذلك، فإن التطوير الناجح لمثل هذه العملية الهجينة يعتمد على تصميم كلٍ من عمود الفصل اللوني والنظام التبلور.

(٨,٢,٦,٢) الفصل اللوني المستمر Continuous Chromatography

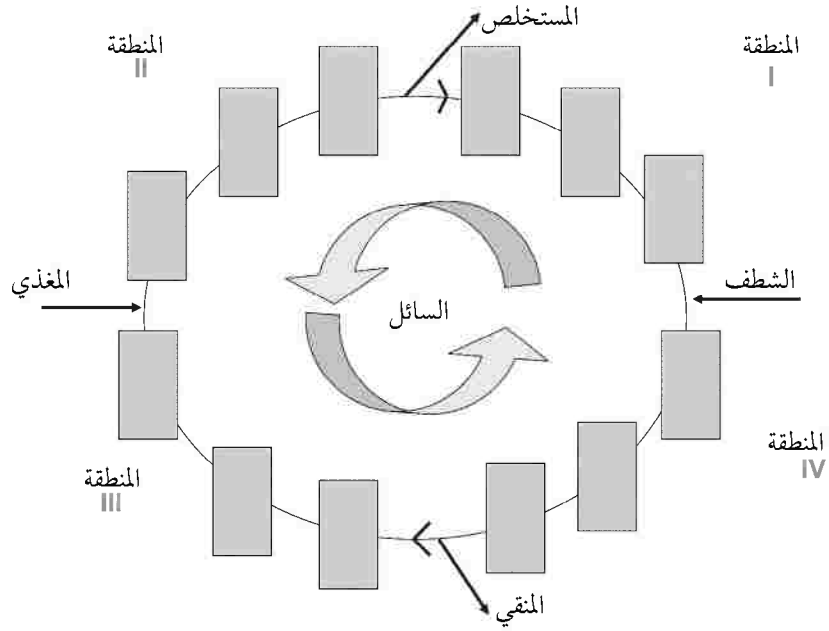
تقليدياً، كان إجراء الفصل اللوني يتم في وسادة معبأة عن طريق توظيف تمريرات متتابعة للمحلول المغذي، ومحلول الغسيل المنظم، ومحلول الإزالة خلال العمود. ولعزل المنتج المستهدف من محلول التغذية غير المصفى فإنه يتم تطبيق الفصل اللوني الادمصاصي باستخدام الوسادة المتخلخلة/ الممتدة [٣٤]. وهنا يتم ضخ المحلول المغذي في اتجاه صاعد خلال وسادة من جسيمات الممتزات معبأة في عمود عند معدل تدفق يؤدي إلى خلخلة الوسادة، مما يؤدي إلى مساحة بين حبيبات الممتزات، والسماح بذلك للجسيمات بالمرور. وتكون الوسادة الممتدة أكثر استقراراً من الوسادة المتخلخلة بسبب توزيع أحجام الجسيمات التي تتحرك إلى مستويات مختلفة، والسماح بالفصل المماثل لعمود الفصل اللوني المعبأ.

في الفصل اللوني المستمر يتحرك الممتز ومحلول الإزالة في اتجاهات معاكسة فيما يتعلق بنقطة إدخال العينة. ويتم هذا إما مع طريق وسادة متحركة، وإما مع طريق عمود متحرك، أو وضعية محاكية للوسادة المتحركة. ويمكن أن تكون حركة الوسادة وتدفق السائل عمودية أو معاكسة بالنسبة لكلٍ منهما. ويبدو أن التطبيق الممكن للفصل اللوني المستمر يمكن أن يكون كعملية إزالة للمنتج في الموقع لحصاد وفصل المنتجات من العمليات التخميرية أو الإنزيمية المستمرة.

وتقنية محاكاة الوسادة المتحركة (SMB) هي تقنية فصل لوني مستمر متعددة الأعمدة تنطوي على حركة معاكسة من السائل والطور الثابت الموجودين في الأعمدة [٣٥]. وعلى الرغم من تطبيقها على المستوى الكبير لما

يقرب من ٤٠ عاماً في صناعة البترول، فقد تم فقط مؤخراً الاعتراف بإمكاناتها في صناعات المواد الكيميائية الدقيقة، ومستحضرات التجميل والصناعات الدوائية. وقد تم استخدام الـ SMB لفصل السكريات والأحماض الأمينية والبروتينات، والمخاليط الراسمية، ولنزع الأملاح، ويمكن أيضاً أن تكون مفيدة في فصل النظائر الضوئية.

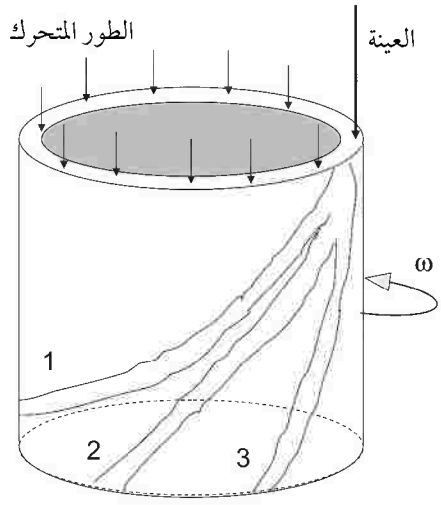
كما هو مبين في الشكل رقم (١٧, ٨)، تنقسم الوسادة المتحركة التقليدية في الـ SMB إلى أربع مناطق: المنطقة I حيث يجب أن تتم إزالة المنتج الأقوى ارتباطاً تماماً، المنطقة II حيث يجب أن تتم إزالة المنتج الأقل ارتباطاً تماماً، المنطقة III حيث يجب أن يتم ادمصاص المنتج الأقوى ارتباطاً تماماً، والمنطقة IV حيث يجب أن يتم ادمصاص المنتج الأقل ارتباطاً تماماً. وتتكون الـ SMB النموذجية من ٤-٢٤ عموداً موزعة داخل المناطق المختلفة والتي تكون متصلة في محاذاة حلقية بصمامات متعددة الاتجاهات. والعوامل المهمة التي يجب مراعاتها في عملية الـ SMB هي معدلات تدفق التيارات المختلفة، وعدد الأعمدة، وطول العمود وقطره، وحجم الجسيمات، وفترة تحول الأعمدة، وتركيز المحلول المغذي.



الشكل رقم (١٧, ٨). الفصل اللوني المحاكي للوسادة المتحركة. تتكون الوسادة المتحركة التقليدية من أربع مناطق مختلفة. يتم إدخال مخاليط التغذية إلى النظام بين المناطق I و II ويتم نقلها مع الطور المتحرك إلى المنطقة III، حيث يتم ادمصاص المركبات ذات الانجذابية العالية إلى المادة الماصة وتنقل مع الطور الثابت إلى المنطقة I حيث يتم إزالتها عن طريق مزيج من محلول إزالة جديد يتم إدخاله بين المناطق I و IV. يتم نقل المكونات الأقل ادمصاصاً في المنطقة III عن طريق الطور المتحرك إلى المنطقة IV حيث يتم ادمصاصها ونقلها مع الطور الثابت إلى المنطقة II للإزالة. ويتم التحكم في أحداث الامتزاز والإزالة المختلفة عن طريق معدلات التدفق التي يتم ضبطها بواسطة ٣ أو ٥ مضخات خارجية ومرات تبديل العمود، وقد تختلف معدلات التدفق من منطقة إلى منطقة. ويتم الحفاظ على التدفق الداخلي للطور المتحرك باستخدام مضخة إعادة تدوير التي عادةً ما توضع بين العمود الأول والأخير.

وتوفر الـ SMB وسيلة لزيادة إنتاجية الفصل اللوني، مع خفض في استهلاك محلول الإزالة وتخفيف المنتج. ومع ذلك، فإن قصور التقنية يكون؛ بسبب أن المحلول المغذي الذي يحتوي على خليط متعدد المكونات يمكن فقط أن ينقسم إلى تيارين من المنتج، كلاً منهما يمكن أن يكون له أكثر من مركب واحد. في حين يكون الوضع الأيزوقراطي هو الطريقة الأكثر شيوعاً لتشغيل النظام، فإن أنواعاً مختلفة من التدرجات، على سبيل المثال، المذيبات والملح والضغط، تسمح بتقليل أحجام محلول الإزاحة والراتنج عدة مرات. وقد استخدم مفهوم الـ SMB لتصميم مفاعل محاكي للوسادة المتحركة (SMBR)، والذي يتم فيه إضافة إنزيم ببساطة خلال وحدة الـ SMB سواءً في صورةٍ مقيدة أو إلى الطور المتحرك في صورةٍ قابلة للذوبان. وهذا يسمح للمادة البادئة بأن يتم تحويلها بشكلٍ مستمر في جميع أقسام الـ SMBR [٣٦].

والفصل اللوني الحلقي المستمر (CAC) هو الفصل اللوني الوحيد الذي يسمح بالفصل المستمر للخليط متعدد المكونات [٣٧]. يحتل الطور الثابت في الـ CAC مساحة حلقية مشكلة بين أسطوانتين متحدتي المركز، إحداها تغطي الأخرى. ويتم تدوير الوسادة الحلقية حول محورها العمودي بعد منفذ ثابت والذي يتم من خلاله تغذية العينة بصورةٍ مستمرة. ويترشح محلول الإزالة المنظم إلى الأسفل خلال باقي الحلقة. بمرور الوقت، تتشكل مجموعات مكونات حلزونية من نقطة التغذية إلى النقاط المختلفة في الجزء السفلي من العمود الحلقي (الشكل رقم ١٨, ٨)، والتي تعتمد منحدراتها على سرعة الإزالة، وسرعة الدوران، ومعامل توزيع المكون بين طور السائل والممتز. وكلما كان امتزاز المادة المذابة أقوى ظهرت أبعد من نقطة الإدخال أسفل الوسادة. ويمكن أيضاً استخدام الإزالة غير الأيزوقراطية لفصل الـ CAC.

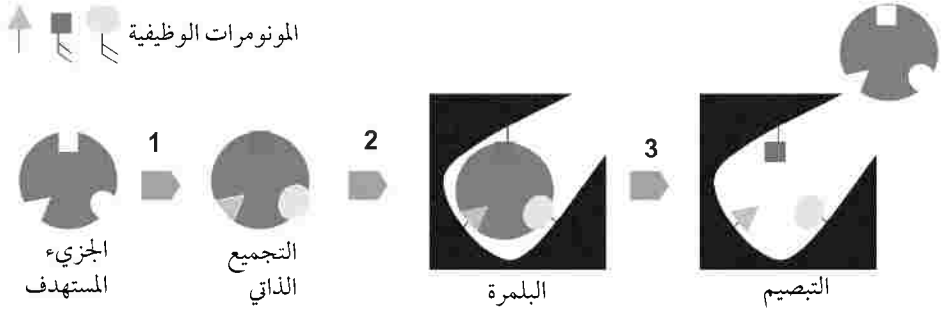


الشكل رقم (١٨, ٨). الفصل اللوني الحلقي المستمر. يتم إدخال العينة في نقطة ثابتة إلى الوسادة الحلقية الدوارة للطور الثابت، بينما يتم إمرار الطور المتحرك على المساحة المتبقية. يتم فصل المكونات ١، ٢، و٣ الموجودة في العينة على أساس معامل توزيعها بين الطور الثابت والمتحرك، وتتم إزالتها عند نقاط مختلفة من العمود [٣٧].

(٨,٢,٧) مواد التبصيم الجزيئي لالتقاط المنتج انتقائياً

Molecularly Imprinted Materials for Selective Product Capture

إن التبصيم الجزيئي هو تقنية لإدخال مواقع تعرف انتقائية في شكل بصمة للجزيء المستهدف في مصفوفة بوليمر عالية الارتباط، ومن ثم توفير بنية ذات انتقائية عالية للغاية للفصل [٣٨]. لإعداد بوليمرات التبصيم الجزيئي (MIPs)، يتم ربط القالب (الجزيء المستهدف) مع مونومرات وظيفية في مذيب قبل إضافة بادئ الارتباط والبلمرة. بعد البلمرة، يتم إزالة القالب خارج شبكة البوليمر تاركاً بصمة لهيكل القالب (الشكل رقم ٨,١٩). ويسمح هذا بالتعرف التخصصي على الجزيء المستهدف وبالتالي يميز بين الجزيئات وثيقة الصلة في الخليط. ويمكن أن يتم إنتاج الـ MIP باستخدام نهج تساهمية أو غير تساهمية، على الرغم من تفضيل هذه الأخيرة بسبب بساطتها. في النهج الأول يتم اشتقاق القالب كيميائياً بواسطة جزيئات تحتوي على مجموعات قابلة للبلمرة باستخدام روابط تساهمية قابلة للعكس. في النهج غير التساهمي يتجمع القالب مع المونومرات الوظيفية باستخدام التفاعلات المختلفة مثل فان دير فال الكارهة للماء، أو الكهربائية. وقد استخدمت الـ MIPs للفصل اللوني لمجموعة واسعة من فئات المنتجات، بما في ذلك المركبات المماثلة هيكلياً، والنظائر الضوئية، والمصاوغات، وما إلى ذلك [٣٩، ٤٠]. كما تم استخدامها أيضاً كتقنية إزالة للمنتج في الموقع، على سبيل المثال لاسترداد مركبات الأيض الثانوية المنتجة عن طريق التخمير [٤١] والتخليق الإنزيمي للأسبارتام. وقد استخدمت هذه التقنية أكثر على النطاق التحليلي، ومع ذلك فهناك اهتمام كبير في تطبيقات المستوى الأوسع، ولكن هذا يتطلب تحسينات في قدرات ارتباط وتكاليف الـ MIPs.



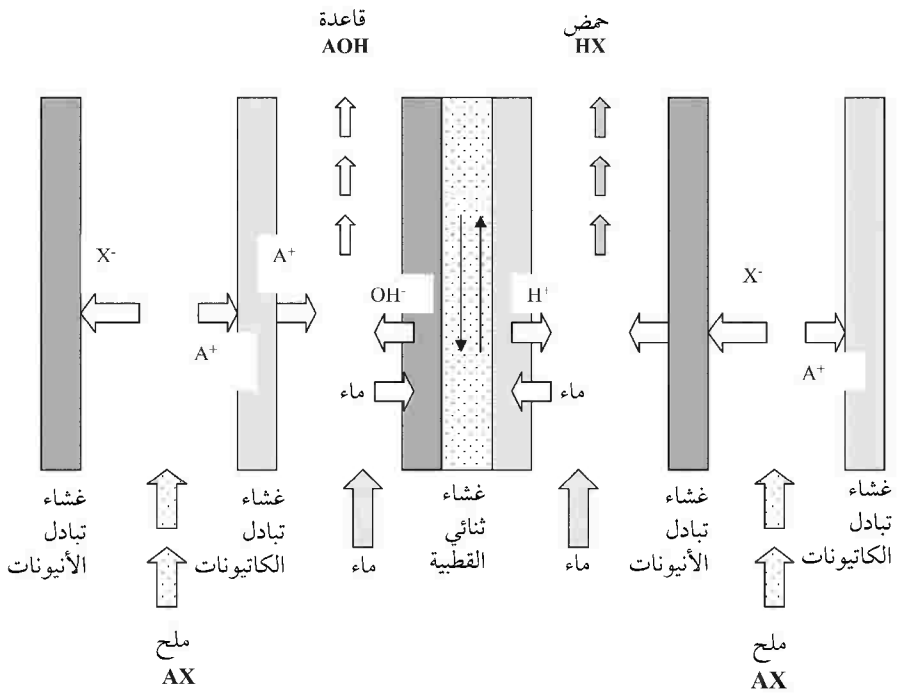
الشكل رقم (٨,١٩). تخليق بوليمر التبصيم الجزيئي عن طريق نهج غير تساهمي. تشمل الخطوات المختلفة: (١) التجميع الذاتي للجزيء المستهدف (قالب) مع المونومرات الوظيفية، (٢) البلمرة في وجود عامل الارتباط، و(٣) استخلاص القالب من شبكة بوليمر التبصيم. مجاملة من ماثيو لينوار، قسم التقنية الحيوية، جامعة لوند.

(٨,٢,٨) الفصل الغشائي للمواد المذابة الأيونية: الفصل الغشائي الكهربائي

Membrane Separation of Ionic Solutes: Electrodialysis

يستخدم الفصل الغشائي الكهربائي لفصل المركبات المتأينة من المركبات غير المتأينة بواسطة أغشية التبادل الأيوني تحت تأثير من تدرج الجهد. وتسمح الأغشية ذات المجموعات المشحونة الثابتة انتقائياً بمرور الأيونات

المشحونة المعاكسة وترفض أيونات الشحنة العكسية، مما يسمح بالتركيز، وإزالة أو فصل المحاليل الكهربائية. وقد تم تطوير الفصل الغشائي الكهربائي ثنائي القطب أو "تقسيم الماء" لتحويل محاليل الملح المائية إلى أحماض وقواعد وقد تم تطبيقه لاسترداد الأحماض العضوية من بيئة التخمير بدون إضافة المواد الكيميائية. ويستند المبدأ على استخدام الأغشية ثنائية القطب التي يتم فيها صف الأغشية المنفذة للأنيونات والكاتيونات معاً. وبتوجيه مثل هذه البنية المركبة بحيث تواجه طبقة تبادل الكاتيونات القطب الموجب وفرض مجال جهد عبر الغشاء فإنه من الممكن تقسيم الماء إلى أيونات هيدروجين$^{+}$ وهيدروكسيل$^{-}$ مما يسبب ترحيل الأيونات إلى القطب ذو الشحنة العكسية. وهذا يؤدي إلى إنتاج محاليل حمضية وقاعدية على أسطح الأغشية ثنائية القطب. وعند وضع أغشية ثنائية القطب متعددة مع أغشية تبادل للأنيونات والكاتيونات في متراص للفصل الغشائي الكهربي بين زوجٍ واحد من الأقطاب الكهربائية فإنه يمكن تحويل محاليل الملح المائية إلى أحماض وقواعد (الشكل رقم ٨,٢٠). وعيب الأغشية ثنائية القطب هو عدم تحملها للكاتيونات متعددة التكافؤ، مثل الكالسيوم والماغنيسيوم التي تشكل هيدروكسيدات غير قابلة للذوبان على السطح البيني الحرج للأغشية ثنائية القطب حيث تنفصل الأيونات. وبالتالي فإنه من الضروري إزالة هذه الأيونات لمنع فساد الأغشية ثنائية القطب.



الشكل رقم (٨,٢٠). الفصل الغشائي الكهربائي ثنائي القطب. يؤدي الغشاء ثنائي القطب الواقع بين غشاء تبادل للأنيونات والكاتيونات إلى تقسيم المياه إلى أيونات هيدروجين$^{+}$ وهيدروكسيل$^{-}$ والتي تستخدم في متراص للفصل الغشائي الكهربائي للجمع بين أنيونات وكاتيونات الملح لإنتاج الأحماض والقواعد.

(٨ , ٢ , ٩) الفصل الفراغي باستخدام الأغشية Chiral Separations Using Membranes

إلى جانب الفصل اللوني، توفر الأغشية تقنية محتملة قابلة لزيادة المستوى [٤٢]. ويمكن الاستفادة من غشاء انتقائي للنظائر الضوئية من أجل السماح بالنقل الانتقائي لأحد النظائر الضوئية من خليط راسمي أو غشاء غير انتقائي لتسهيل عملية انتقائية للنظائر الضوئية.

يمكن أن يكون الغشاء الانتقائي للنظائر الضوئية بوليمر كثيف أو سائل (الذي هو نفسه فراغي أو له مجموعة مضافة فراغية). ويمكن تصميم غشاء سائل لاحتواء ناقل انتقائي للنظائر الضوئية يشكل بصورةٍ انتقائية متراكب مع أحد النظائر من خليط راسمي في محلول التغذية، وينقله عبر الغشاء، ويحرره على الجانب الآخر. ورغم أنه يمكن الحصول على انتقائيات عالية في مثل هذه الأنظمة، إلا أن الأغشية السائلة تفتقر إلى الاستقرار على مدى فترات طويلة من الزمن وغالية الثمن للتشغيل على النطاق الواسع.

يمكن صنع غشاء البوليمر الانتقائي للنظائر الضوئية من دعامة مسامية غير انتقائية مغلفة بطبقة رقيقة من بوليمر انتقائي للنظائر الضوئية، أو غشاء ترشيح فائق ذي عنصر فراغي مقيد، أو بوليمرات التبصيم الجزيئي (كما هو موضح أعلاه). وحيث إن النقاء الضوئي المطلوب غالباً لا يمكن تحقيقه في خطوةٍ واحدة، فإنه يمكن استخدام سلسلة من وحدات الغشاء الفراغي.

(٨ , ٢ , ١٠) الإزالة بالتجفيف/ المذيبات Drying/Solvent Removal

عادةً ما تستخدم إزالة المياه المتبقية أو المذيبات خلال المراحل النهائية لتجفيف المنتج ليكون جاهزاً للتخزين، ولكن قد تكون هناك حاجةً لها أيضاً خلال المراحل الأولى من عملية التجهيز النهائي كوسيلة لتركيز المنتج من المحاليل المخففة. وتتوفر مجموعة متنوعة من أساليب ومعدات التجفيف ويتم تصنيفها وفقاً لطريقة انتقال الحرارة، على سبيل المثال، التوصيل (أي من خلال الاتصال مع سطح ساخن)، والحمل الحراري (على سبيل المثال، عن طريق الرش في غاز جاف ساخن)، والإشعاع، أو مزيج من هذه الطرق. ويمكن إضافة إضافات مختلفة إلى المنتج قبل التجفيف للحفاظ على الاستقرار، وتحسين ذوبان المنتج، ...إلخ.

ويمكن إجراء التجفيف لكميات أقل من المنتجات في غرفة حيث يوضع المنتج على أرفف ويحدث نقل الحرارة جزئياً عن طريق التوصيل وجزئياً عن طريق الحمل الحراري. وعلى النطاق الأوسع، يتم تسهيل التجفيف على دفعات في الكثير من مجففات التوصيل عن طريق استخدام الطبقات المتقلة ميكانيكياً لتوفير جهد حراري موحد على المواد التي يجري تجفيفها، وإنتاجية عالية، وإمكانية التطوير لعملية مستمرة. يتم إزالة المياه في مجففات الأسطوانة الدوارة عن طريق التوصيل الحراري على طبقة رقيقة من المحلول على سطح مسخن بالبخار لأسطوانة دوارة.

والتجفيف بالرذاذ هو المثال الأكثر أهمية لطريقة التجفيف بالحمل الحراري للمنتجات الحيوية، وينطوي على توليد رذاذ جوي من قطيرات صغيرة عن طريق فوهة أو قرص دوار، وتوجيهها إلى تدفق من الغاز الساخن (١٥٠-٢٥٠ درجة مئوية). ويحدث التبخير بسرعة تاركاً وراءه جزيئات المنتج الصلبة.

ويمثل التجفيف التجميدي أو التجفيد واحداً من أقل الأساليب قسوة ويستخدم لتجفيف المنتجات الصيدلانية. ويستند مبدأ التجفيف على تسام السائل من المواد المجمدة.

(٨,٣) أمثلة على التجهيز النهائي لمجموعات المنتجات المختلفة

Examples of Downstream Processing of Different Product Groups

(٨,٣,١) الكحولات Alcohols

إن الإيثانول والبيوتانول (الأسيتون-بيوتانول) هما الكحولان المنتجان عن طريق التخمير تحت الظروف اللاهوائية. وقد جذب كلاً منهما الاهتمام ليس فقط للتطبيق كوقود حيوي ولكن أيضاً كجزيئات أولية لإنتاج المواد الكيميائية الأخرى. ويعد الإيثانول حالياً منتجاً رئيساً في جميع أنحاء العالم (حوالي ٩ مليارات جالون خلال ٢٠٠٦م)، ومن المتوقع زيادة إنتاجه خلال السنوات القادمة في الكثير من البلدان. وتختلف المواد الخام المستخدمة تبعاً للمنطقة، على سبيل المثال، يستخدم قصب السكر في البرازيل في حين يكون نشا الذرة في الولايات المتحدة في المقام الأول.

عادةً تستخدم العمليات الصناعية لإنتاج الإيثانول التقطير كخطوة الاسترداد الرئيسة. ويرجع حوالي ٤٠٪ من إجمالي الطاقة اللازمة لتحويل الذرة إلى الإيثانول إلى تكاليف التقطير. وقبل التقطير، يتم تسخين سائل التخمير (البيرة) وإرساله من خلال أسطوانة مفرغة للغاز لتبخير البخار المحتوي على الإيثانول في المقام الأول والماء مع بعض ثاني أكسيد الكربون المتبقي. ويتم تكثيف أبخرة الإيثانول والماء بعد ذلك ويتحدا مع تيار السائل الذي يتم إدخاله إلى عمود التقطير، في حين يتحد أي بخار غير متكثف مع ثاني أكسيد الكربون المنتج أثناء التخمير ويتم إرساله من خلال جهاز تنقية ثاني أكسيد الكربون. وتتم إزالة حوالي ٩٠٪ من الإيثانول خلال التقطير بنسبة ٤٠٪ من وزن بخار الإيثانول/ الماء. ويجري استرداد الإيثانول لاحقاً من عمود تقطير البيرة من خلال عمل مشترك من المقوم، والمجرد، والمناخل الجزيئية. ويخرج أكثر من ٩٩٪ من الإيثانول من الجزء العلوي للمقوم كناتج تقطير. ويتم تغذية المنتج المتبقي في أسفل إلى عمود التجريد لإزالة المياه الإضافية ثم مزج الإيثانول المقطر من التجريد مع المحلول المغذي إلى المقوم. ويتم تغذية ناتج التقطير من المقوم الذي يحتوي أساساً على الإيثانول، إلى المناخل الجزيئية، والتي تقبض على آخر آثار المياه لتعطي إيثانول بدرجة نقاء ٩٩,٦٪ [٤٣]. ويتم إنتاج وقود الإيثانول بعد خلط الإيثانول المنقي مع ما يقرب من ٥٪ من البنزين المغير طبيعته.

ويتم تغذية بقايا الجزء السفلي من عمود البيرة التي تحتوي على كمية كبيرة من الماء والمواد غير القابلة للتخمير مثل البروتين، والزيوت، والألياف، والمواد الكيميائية غير المستهلكة أثناء التخمير (تصل إلى ١٥٪ مواد صلبة) إلى وعاء التخزين، وطردها مركزياً لإزالة أكثر من ٨٠٪ من المياه معطيةً حبوب تقطير رطبة بتركيز ٣٧٪ مواد صلبة. ويعاد تدوير جزء من المياه من المنتج السائل والمعروف باسم الرقيق مرةً أخرى لعملية تسييل النشا في حين يتم تغذية المتبقي إلى المبخر. ويتم خلط المركز من المبخر مع حبوب التقطير الرطبة وتجفف في مجففات الأسطوانة الدوارة.

في عملية بيوستيل®٢٠٠٠م لإنتاج الإيثانول (شيماتور للهندسة، السويد) (الشكل رقم ٨,٢١)، تتم إزالة الكحول بشكلٍ مستمر من عملية التخمير، والحفاظ على تركيز الكحول بنسبة ٤,٥٪ وزناً. ويتم تغذية محلول التخمير لفواصل طرد مركزي لفصل الخميرة التي يتم إعادة تدويرها إلى المخمر، في حين تتم معالجة البيرة الرائقة على النحو الوارد سابقاً. ويتم ضخ معظم البيرة منخفضة الإيثانول (البيرة الضعيفة) بعد التقطير من خلال مبادل حراري متجدد ونظام تبريد قبل أن يتم إعادة تدويرها إلى المخمر.

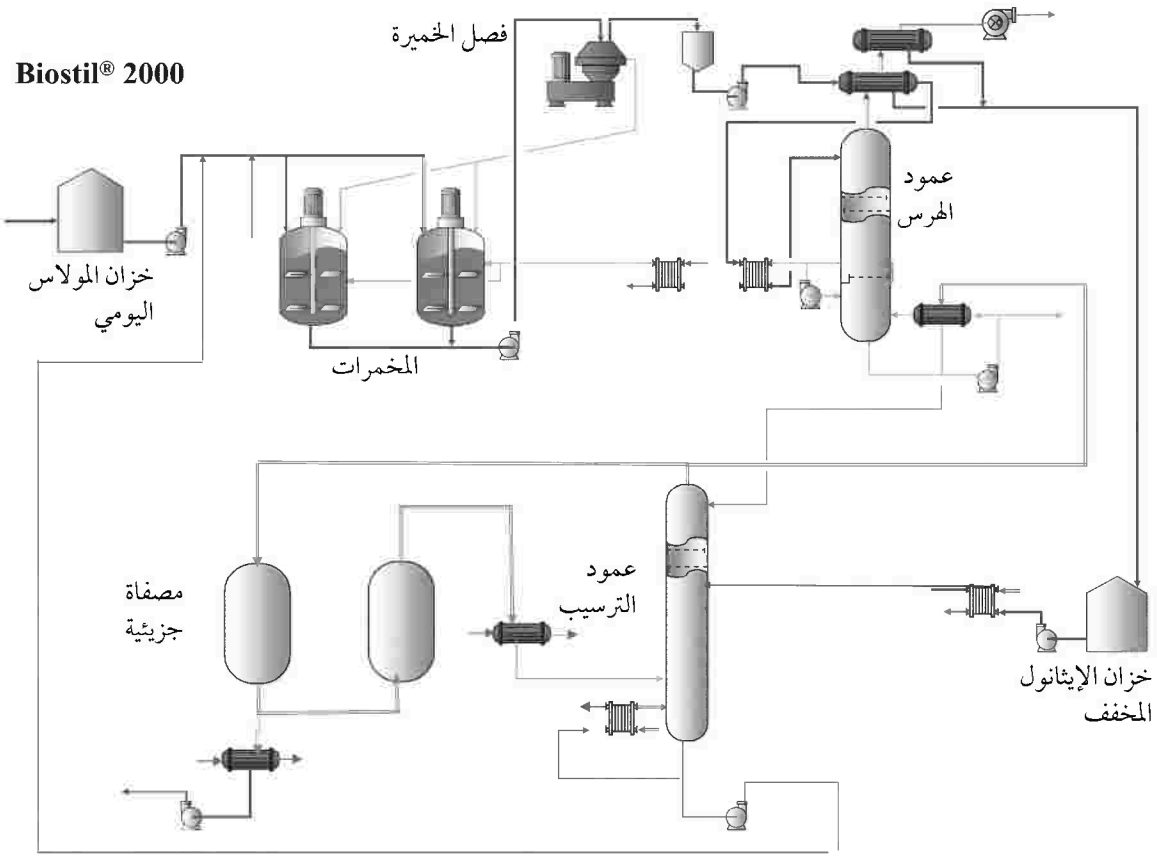
وقد تم اقتراح التبخير المسبق كوسيلة بديلة لاسترداد الإيثانول. ويكون مخطط التجهيز النهائي هو إزالة الكحول من محلول التخمير بواسطة التبخير المسبق، وتركيزه إلى حوالي ٨٠٪ عن طريق التقطير، وفي النهائية يتم استخدام التبخير المسبق لتحضير الإيثانول النقي. وقد أشارت دراسات مختلفة إلى إمكانات التبخير المسبق لتحسين اقتصاديات العملية، ولكنها تقترح تحسينات في أداء الغشاء والتكاليف [٤٤]. ولاسترداد الإيثانول من المحلول الخام، فإن أغشية التبخير المسبق المتاحة لها انتقائية منخفضة وتتدهور مع الوقت؛ بسبب ادمصاص المكونات الأخرى مثل الأحماض والجلسرين. وقد أظهر تعديل الأغشية أنه يحسن الأداء [٤٥].

(٨,٣,٢) الأحماض العضوية Organic Acids

تشكل الأحماض العضوية مجموعة مهمة من المواد الكيميائية التي تنتج عن طريق التخمير. وبينما يعدُّ أن حمض الخليك والسيتريك منتجات تقليدية، فقد تزايد الاهتمام في إنتاج حمض اللاكتيك والسكسينيك تخميرياً كمواد كيميائية أولية بصورةٍ كبيرة خلال العقد الماضي.

وتوجد عدة طرق قابلة للتطبيق لاسترداد الأحماض العضوية؛ إلا أن الوسائل التقليدية لاستردادها كأملاح للكالسيوم لاتزال تمارس على نطاقٍ واسع [٤٦-٤٩]. يتم إضافة فائض من هيدروكسيد/ كربونات الكالسيوم لمعادلة الحمض أثناء التخمير، ويمكن الحصول على ملح الكالسيوم للحمض كراسب أو ابقائه في المحلول. ويساعد هذا الأخير في فصل المنتج بسهولة من الخلايا والجسيمات الأخرى. وفي نهاية التخمير يتم ترشيح المحلول

لإزالة المواد الصلبة، ومعالجته بالكربون، وتبخيره، وترويقه بحمض الكبريتيك لتحويل الملح إلى الحمض الحر ويتم ترشيح كبريتات الكالسيوم المتكونة. ويمكن تنقية الرشيح أكثر باستخدام أعمدة الكربون والتبادل الأيوني والتبخير لإنتاج منتج ذي درجة تقنية. ويتم تحويل حمض اللاكتيك ذو الدرجة التقنية إلى المنتج عالي النقاوة الثابت حرارياً عن طريق الأسترة بالميثانول أو الإيثانول، واسترداد الأستر عن طريق التقطير، متبوعاً بالتحليل المائي، والتبخير، وإعادة تدوير الكحول. والعيب الرئيس لهذه العملية هو الكميات الكبيرة من كبريتات الكالسيوم الناتجة كمنتج جانبي.



الشكل رقم (٨,٢١). عملية بيوستيل®٢٠٠٠م لإنتاج الإيثانول. يتم استرداد الإيثانول باستمرار من محلول التخمير للحفاظ على تركيز منخفض في المخمر. فصل خلايا الخميرة يتم بواسطة الطرد المركزي ثم إعادة تدويرها إلى المخمر، في حين يتم إرسال المحلول الرائق (البيرة) إلى عمود التقطير (الهريس) حيث تتم إزالة الإيثانول حوالي ٤٠٪ إيثانول/ بخار ماء (الإيثانول الضعيف). ويتحقق الاسترداد اللاحق للإيثانول النقي من نواتج التقطير عن طريق المقوم والتجريد، وتتم إزالة آخر البقايا للماء بواسطة المناخل الجزيئية. مجاملة من شيماتور للهندسة، كارلسكوجا، السويد.

واستخلاص السائل من السائل باستخدام مستخلص رباعي الأمين الكاره للماء (ألامين®٣٠٤-١) هو أسلوب تقليدي لاسترداد الأحماض العضوية من محلول التخمير. ويتم تجريد المذيب المحمل بالماء الساخن. ويسمح هذا باسترداد الحمض الحر بدلاً من الملح المقابل. ويتم تبخير الماء لإعطاء الحمض المتبلور [٥٠]. وتتم إعادة تدوير خليط المذيب والأمين المجدد. وقد تم تطبيق هذا الأسلوب لجميع الأحماض العضوية وتم اعتباره طريقة تنقية فعالة واقتصادية. وفي الآونة الأخيرة، تم تطوير عملية استرداد متكاملة لحمض السكسينيك مكونة من الاستخلاص التفاعلي، والتقطير التفريغي، والبلورة، منتجةً نقاء لحمض السكسينيك بدرجة ٩٩,٨٪ وإنتاجية حوالي ٧٣٪ من محلول تخمير مانهيميا ساكسينيسيبرودوسينس [٥١]. ويساعد التقطير التفريغي على إزالة حمض الخليك من المنتج.

وقد تم ذكر تطوير آخر للاستخلاص باستخدام تقنية رباعي الأمين/ الكربونات. ويتم استخلاص حمض اللاكتيك المنتج على صورة لاكتات الصوديوم، من المحلول المركز بواسطة خليط من رباعي الأمين والمذيب تحت ضغط من ثاني أكسيد الكربون، مما يعطي راسب من بيكربونات الصوديوم ومستخلص أمين-حمض اللاكتيك. بينما يتم الحصول على حمض اللاكتيك بواسطة الاستخلاص الرجعي بالماء الساخن عند ١٤٠ درجة مئوية و١٠٠ رطل لكل بوصة مربعة، ويتم تسخين بيكربونات الصوديوم لإنتاج كربونات الصوديوم وثاني أكسيد الكربون ويتم إعادة تدويرهما في العملية.

وقد اجتذب الفصل الغشائي الكهربائي الكثير من الاهتمام لإنتاج حمض اللاكتيك؛ لأنه لا ينتج نفايات ملحية [٥٢]. يتم تغذية محلول التخمير بعد الترشيح الدقيق إلى وحدة الفصل الغشائي الكهربائي. وقد تم تطوير وضعية عملية تسمي عملية "ED المزدوجة" والتي تستخدم وحدة فصل غشائي كهربائي لإزالة الملح لإزالة الكاتيونات متعددة التكافؤ وتركيز ملح اللاكتات، يليها وحدة الفصل الغشائي الكهربائي عن طريق "تقسيم المياه" مع أغشية ثنائية القطب حيث يتم تحويل الأنواع الأيونية لصور حمضها وقاعدتها المعادلة وفصلها. ويتم تحويل لاكتات الصوديوم إلى حمض اللاكتيك الذي يتم تخصيبه أثناء تقدم العملية. ويتم نقل أيونات الصوديوم عبر الغشاء الكاتيوني وترتبط مع أيونات الهيدروكسيل لتكوين هيدروكسيد الصوديوم الذي يتم إعادة تدويره للتخمير. وهذا يتيح للعملية أن تعمل بكفاءة واقتصاد. وقد تم تطوير طريقة مماثلة لاسترداد حمض السكسينيك النقي والتي يتم تمريرها بعد ذلك من خلال جهاز البلورة التبخيري لإنتاج بلورات نقية جداً [٥٣، ٥٤].

(٨,٣,٣) الأحماض الأمينية Amino Acids

كانت الأحماض الأمينية بين المنتجات الأولى التي تصنع عن طريق التخمير على نطاقٍ صناعي. وفي عملية تجهيز نهائي نموذجية لاسترداد حمض أميني، يتم فصل الخلايا عن طريق الطرد المركزي أو الترشيح متبوعاً بإزالة

اللون من المحلول الرائق قبل المرور على عمود التبادل الأيوني. وتتم إزالة الحمض الأميني المرتبط وبلورته (بعد التبخير)، يليه مزيد من التكييف بواسطة التجفيف والغربلة. ويتم إنتاج بعض الأحماض الأمينية (على سبيل المثال، إل-ثريونين) في تركيزات عالية جداً مع كميات منخفضة جداً من المنتجات الجانبية، ويمكن بلورته مباشرةً دون الحاجة إلى خطوة التبادل الأيوني.

(٤, ٣, ٨) الإنزيمات والبروتينات/ الببتيدات Enzymes and Proteins/Peptides

تشمل البروتينات مجموعة متنوعة من الجزيئات الكبيرة المختلفة في التكوين، والحجم وخصائص السطح، والوظيفة؛ ويتم استغلال هذه الاختلافات في فصل البروتينات عن بعضها ببعض. والإنزيمات الضخمة هي من بين البروتينات المتاحة تجارياً (على سبيل المثال، الأميليزات، والزيلانيزات، والبروتييزات، والليبيزات) والإنزيمات التشخيصية (مثل الجلوكوزأوكسيديز، والبيروكسيديز، واليوريز)، والبروتينات العلاجية (على سبيل المثال، الأجسام المضادة وحيدة النسيلة، وهرمون النمو البشري، والأنسولين). وتحدد تطبيقات البروتينات درجة التنقية المطلوبة؛ فالإنزيمات الضخمة هي تحضيرات خام نسبياً، ومركزة يتم صياغتها لتلبية الاحتياجات للنشاط والاستقرار، في حين تتطلب البروتينات العلاجية مستويات عالية جداً من النقاء (>٩٩٪).

حالياً، يتحقق إنتاج البروتينات على النطاق الواسع أساساً باستخدام مجموعة متنوعة من العوائل المؤتلفة بما في ذلك البكتيريا والخمائر والفطريات والخلايا الثديية. وغالباً ما يحدد العائل المنتج اختيار طريقة فصل الصلب من السائل وطريقة تحلل الخلايا النهائية المستخدمة. ويعتمد موقع المنتج المستهدف خارج/ داخل الخلايا أو قبل الغشاء البلازمي أيضاً على العائل. وعادة ما يتم تفضيل إفراز البروتينات إلى البيئة خارج الخلايا من أجل تجنب خطوة تمزيق الخلايا القاسية، وأيضاً لأنه في هذه الحالة يجب التعامل مع عدد أقل من الملوثات خلال التنقية. ويتم إنتاج الإنزيمات الضخمة دائماً خارج الخلية؛ وبعد ترويق المحلول يتم تركيز الإنزيمات عن طريق الترسيب أو الترشيح الفائق وعادةً ما تتم صياغتها كمنتجات سائلة.

يمكن أن يؤدي إنتاج البروتينات داخل الخلايا في إيشيريشيا القولون إلى التعبير عنها كأجسام مشتملة غير قابلة للذوبان، والتي لديها ميزة كونها بروتين نقي تماماً. ومع ذلك، فإن استرداد البروتين النشط يتطلب إذابة البروتين المتجمع في ظل ظروف مغيرة لطبيعته يليها إعادة طي للبروتين المذاب عن طريق الإزالة البطيئة للعامل المغير للطبيعة [٧].

وعادةً ما تتم التنقية عالية الدرجة للبروتينات باستخدام طرق فصل لونية مختلفة اعتماداً على خصائص سطحها و/ أو خصائص التعرف الجزيئي. وتعتمد المصفوفات المستخدمة للفصل اللوني للبروتينات عادةً على المواد الهلامية المحبة للماء مثل الأجاروز. وتتطلب تنقية البروتينات العلاجية عدداً من خطوات التلميع لإزالة كافة

الملوثات الناشئة من العائل المنتج (على سبيل المثال، الدنا، والفيروسات، والسموم الداخلية، وبروتينات خلية المضيف)، وبيئة الزراعة، وكذلك المتغيرات المتحللة والمتجمعة للمنتج. ويمكن إجراء التنقية الانتقائية للبروتين من المحلول الخام الرائق بفضل بروتين انجذاب التاج المنصهر وراثياً مع البروتين. وامتداد بقايا الحمض الاميني الهيستيدين هي واحدة من العلامات الأكثر شيوعاً للتمكين من تنقية البروتين المؤتلف بواسطة الفصل اللوني الانجذابي ذي أيون المعدن المقيد.

وقد تم أيضاً استخدام النظم المائية ثنائية الطور أو الفصل اللوني ذي الوسادة الممتدة لاستعادة البروتينات مباشرةً من المواد الأولية غير الرائقة. ويسمح هذا بدوره بخفض عدد الخطوات التجهيز النهائي.

(٨,٣,٥) المضادات الحيوية Antibiotics

كما هو الحال في الأحماض الأمينية، فإن المضادات الحيوية كانت بعضاً من منتجات التقنية الحيوية سابقة النجاح. وتقنية الفصل الرئيسة لتنقيتها هي إما استخلاص السائل من السائل وإما الادمصاص. والبنيسيلين، والتتراسيكلين، والإريثروميسين، والباسيتراسين هي أمثلة على المضادات الحيوية التي تمت تنقيتها عن طريق الاستخلاص. يتم استخلاص البينيسيلين والتتراسيكلين عند قيمة أس الهيدروجيني منخفضة في حين يتم إجراء استخلاص الإريثروميسين عند درجات أس هيدروجيني مرتفعة، وذلك باستخدام المذيبات مثل خلات البيوتيل. وبأخذ البنيسيلين كمثال، يبدأ التجهيز النهائي بالترشيح لفصل فطر البنسيليوم نوتاتوم، ويتم تبريد الرشيح إلى درجة صفر-٤ قبل إضافة كبريتات الأمونيوم أو حمض التانيك لتحفيز ترسيب البروتين. ويتم خفض درجة الرقم الهيدروجيني للرشيح الرائق إلى ما دون pK_a للبنيسيلين متبوعةً بالاستخلاص باستخدام مذيب (أسيتات البيوتيل) بنسبة إلى المحلول ١,٠. وتتم معالجة المذيب المحتوي على البنيسيلين بالكربون المنشط ثم الاستخلاص الرجعي بمحلول الفوسفات المائي المنظم (درجة الحموضة ٥-٧,٥) عند نسبة محلول منظم إلى مذيب ١,٠-٢,٠. ويمكن إعادة هذه العملية وفي نهاية المطاف يتبلور المضاد الحيوي سواءً من الطور المائي أو المذيب في مفاعل التقليب الحيوي. ويتم فصل البلورات بواسطة الترشيح، وغسلها بمذيبات متطايرة نسبياً لإزالة الشوائب المتبقية، وتجفيفها تحت تفريغ، وفي النهاية مع الهواء الساخن. يتم استرداد المذيب المستخدم في الاستخلاص بواسطة التقطير ويعاد تدويره.

(٨,٣,٦) الكاروتينات Carotenoids

كان هناك اهتمام متزايد خلال الـ ١٠-٢٠ سنة الماضية في تطوير المصادر الميكروبية للكاروتينات المهمة صناعياً لاستخدامها في الأغذية والأعلاف، والمستحضرات الصيدلانية ومستحضرات التجميل [٥٥]. وقد تم

أيضاً تطوير التحسينات في العوائد من المصادر الميكروبية عن طريق الطفرات أو العمليات المعتمدة على هندسة مسارات تخليق الكاروتينات. ويتم إنتاج منتجات الكاروتينات الميكروبية من جنس الدوناليلا، والهيماتوكوكس بلوفياليس والفافيا رودوزيما تجارياً.

على الرغم من أنه يمكن استخدام الكتلة الحيوية الكلية كمصدر للكاروتينات، إلا أنه يجب استخلاص الكاروتينات في تطبيقات الأغذية والصحة. وقد تم تطبيق وسائل مختلفة لاستخلاص وتنقية الكاروتينات من مزارع الطحالب. والاستخلاص بالمذيبات من الكتلة الحيوية المجففة المطحونة هو وسيلة شائعة لاسترداد الكاروتينات. في عملية الإنتاج التجاري للأستازانثين بواسطة الهيماتوكوكس بلوفياليس، يتم تحرير الكاروتين المتراكم في خراجات الطحالب بواسطة طحن الخراجات الجافة عند -١٧٠ درجة مئوية في وجود المواد المضادة للأكسدة. وقد وجد أن الاستخلاص بثاني أكسيد الكربون فوق الحرج يكون فعالاً للاسترداد الكمي للأستازانثين وغيره من الكاروتينات من الهيماتوكوكس بلوفياليس المطحونة المجففة والمسحوقة [٥٦].

وقد أدى الفصل اللوني المعاكس إلى استرداد وجودة عاليين للزياكسانثين من مستخلص خام تم الحصول عليه بواسطة الاستخلاص بالمذيبات من الطحلب الدقيق المتصبن ميكروسيستيس إيروجينوزا [٥٧].

(٨,٣,٧) المستحلبات الحيوية Biosurfactants

المستحلبات الحيوية هي جزيئات نشطة سطحياً يتم إنتاجها من قبل مجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة. ومن الممكن أيضاً إنتاج المستحلبات الحيوية القائمة على السكر (على سبيل المثال، أسترات السكر وجليكوسيدات الألكيل) باستخدام التخليق الإنزيمي. على الرغم من أن الإنتاج الصناعي لا يزال محدوداً، فقد أثارت المستحلبات الحيوية الاهتمام لمجموعة متنوعة من التطبيقات مثل معالجة البيئة، وتحسين استخراج النفط، ومستحضرات التجميل ومستحضرات الأدوية؛ بسبب قابليتها للتحلل الحيوي، وسميتها المنخفضة، وثباتها العالي في درجة الحموضة العالية. وقد ذكرت عدة طرق لاسترداد المستحلبات الحيوية، مثل الترسيب بالأحماض، والاستخلاص بالمذيبات، ترسيب كبريتات الأمونيوم، والتبلور، والطرد المركزي [٥٨]. وقد ذكرت أيضاً بعض الإستراتيجيات غير التقليدية الأخرى التي تستفيد من النشاط السطحي وقدرتها على تكوين المذيلات و/ أو الحويصلات، والتي تكون قابلة للتطبيق للاسترداد المستمر على المستوى الكبير للمستحلبات الحيوية من محاليل المزارع. وهي تشمل تجزئة الرغوة، والترشيح الفائق، والادمصاص على راتنجات البوليستيرين، و الفصل اللوني التبادلي للأيونات.

(٨,٣,٨) البولي هيدروكسي ألكانوات Polyhydroxyalkanoates

تمثل البولي هيدروكسي ألكانوات (PHAs) فئة معقدة من بولي أسترات التخزين التي تترسب كمشتملات داخل الخلايا غير قابلة للذوبان في عدد من الكائنات الحية الدقيقة [٥٩]. تمتلك الـ PHAs خصائص مواد مشابهة لمختلف اللدائن الحرارية الاصطناعية واللدائن المستخدمة حالياً (من البروبيلين إلى المطاط الصناعي)، ولكن لديها ميزة كونها غير سامة، ومتوافقة حيوياً، وقابلة للتحلل الحيوي [٦٠]. وتشمل الكائنات الحية الدقيقة التي تنتج كميات عالية من الـ PHAs الألكاليجينز لاتوس، والأزوتوباكتر فينيلاندي، والكوبريافيداس نيكاتور (التي كانت تسمى سابقاً رالستونيا يوتروفا)، ولكن يتم الإنتاج التجاري للبوليمر باستخدام إيشيريشيا القولون المؤتلفة. وقد تم تحقيق استرداد البولي (٣-هيدروكسي بيوتيرات) (PHB) بواسطة طرق متنوعة مثل التمزيق الميكانيكي للخلايا، والتحلل الفيزيائي والكيميائي، والإنزيمي للخلايا الميكروبية، وتركيبات من الطرق المختلفة [١٧، ٦١، ٦٢]. ومن المعروف أن الاستخلاص بالمذيبات يؤدي إلى تنقية مناسبة للـ PHB مع انخفاضات متواضعة في وزنه الجزيئي [٦٣]، ولكن هذه الطريقة باهظة التكلفة، وتخلق مشكلات في التصريف، وتغير في مورفولوجية حبيبات البوليمر. ويعدُّ التمزيق الكيميائي للخلايا لتحرير الـ PHB من الكتلة الحيوية واحداً من أكثر الخيارات فاعلية واقتصادية [٦٤]. ويؤدي استخلاص البوليمر عن طريق هضم الخلايا بمحلول الأمونيا المائي، وهيدروكسيد الصوديوم أو هيدروكسيد البوتاسيوم من الأزوتوباكتر فينيلاندي وإيشيريشيا القولون المؤتلفة، على التوالي، إلى ارتفاع استرداد البوليمر النقي [٦٤، ٦٥].

شكر وتقدير Acknowledgements

يعبر المؤلف عن امتنانه لمؤسسة بحوث البيئة الإستراتيجية (ميسترا) للدعم المالي.

المراجع References

[١] Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. (2001) Downstream processing in biotechnology, in *Basic Biotechnology* (eds C. Ratledge and B. Kristiansen), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 187-211.

[٢] Mattiasson, B. and Holst, O. (eds) (1992) *Extractive Bioconversions,* Marcel Dekker, New York.

[٣] Freeman, A., Woodley, J.M., and Lilly, M.D. (1993) *In situ* product removal as a tool for bioprocessing. *Biotechnology,* **11,** 1007-1012.

[٤] Lye, G.J. and Woodley, J.M. (1999) Application of *in situ* product removal techniques to biocatalytic processes. *Trends Biotechnol.,* **17,** 395-402.

[٥] Schügerl, K. (2000) Integrated processing of biotechnology products. *Biotechnol. Adv.,* **18,** 581-599.

[٦] Stark, D., Jaquet, A., and von Stockar, U. (2003) *In-situ* product removal in whole cell bio-technology during the last 20 years. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.,* **80,** 149-175.

[٧] Stephanopolous, G. (ed.) (1993) *Biotechnology Volume 3, Bioprocessing* (series editors: H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, and P. Stadler), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[٨] Medronho, R.A. (2003) Solid-liquid separation, in *Isolation and Purification of Proteins* (eds R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson), Marcel Dekker, New York, pp. 131-190.

[٩] Doran, P.M. (1995) *Bioprocess Engineering Principles,* Academic Press, London.

[١٠] Krijgsman, J. (1992) *Product Recovery in Bioprocess Technology,* BIOTOL Series (ed. R.O. Jenkins), Butterworth Heinemann, Oxford.

[١١] Ulber, R., Plate, K., Reif, O.-W., and Melzner, D. (2003) Membranes for protein isolation and purification, in *Isolation and Purification of Proteins* (eds R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson), Marcel Dekker, New York, pp. 191-223.

[١٢] Shuler, M.L. and Kargi, F. (2002) *Bioprocess Engineering. Basic Concepts,* 2nd edn, Prentice Hall, New Jersey.

[١٣] Save, S.V. and Pangarkar, V.G. (1995) Harvesting of *Saccharomyces cerevisiae* using colloidal gas aphrons. *J. Chem. Tech. Biotechnol.,* **62,** 192-199.

[١٤] Hatti-Kaul, R. (2001) Aqueous two-phase systems: a general overview. *Mol. Biotechnol.,* **19,** 269-277.

[١٥] Harrison, S.T.L. (1991) Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnol. Adv.,***9,** 217-240.

[١٦] Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. (2003) Release of protein from biological host, in *Isolation and Purification of Proteins* (eds R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson), Marcel Dekker, New York, pp. 1-27.

[١٧] Harrison, S.T.L., Dennis, J.S., and Chase, H.A. (1991) Combined chemical and mechanical processes for the disruption of bacteria. *Bioseparation,* **2,** 95-105.

[١٨] Freitag, R. and Horvath, C. (1995) Chromatography in the downstream processing of biotechnological products. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.,***53,** 17-59.

[١٩] Qureshi, N. and Blaschek, H.P. (2001) Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. *Renew. Energy,* **22,** 557-564.

[٢٠] Goldberg, K., Edegger, K., Kroutil, W., and Liese, A. (2006) Overcoming the thermo-dynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells. *Biotechnol. Bioeng.,* **95,** 192-198.

[٢١] Khayet, M. and Matsumara, T. (2004) Pervaporation and vacuum membrane distillation process: modeling and experiments. *AIChE J.,* **50,** 1697-1712.

[٢٢] El-Bourawi, M.S., Ding, Z., Ma, R., and Khayet, M. (2006) A framework for better understanding membrane distillation separation process. *J. Memb. Sci.,* **285,** 4-29.

[٢٣] Etschmann, M.M.W., Sell, D., and Schrader, J. (2005) Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethyacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysts with organo-philic pervaporation. *Biotechnol. Bioeng.,* **92,** 624-634.

[٢٤] King, C.J. (1996) Chemically assisted solvent extraction, in *Downstream Processing of Natural Products-A Practical Handbook* (ed. M. Verrall), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 93-103.

[٢٥] Randolp, T.W. (1990) Supercritical extractions in biotechnology. *Trends Biotechnol.,* **8,** 78-82.

[٢٦] Ito, Y. and Bowman, R.L. (1970) Counter-current chromatography: liquid-liquid partition chromategraphy without solid support. *Science,* **167,** 281-283.

[٢٧] Schroen, C.G.P.H., Nierstrasz, V.A., Bosma, R., Kroon, P.J., Tjeerdsma, P.S., DeVroom, E., VanderLaan, J.M., Moody, H.M., Beeftink, H.H., Janssen, A.E.M., and Tramper, J. (2002) Integrated reactor concepts for the enzymatic synthesis of cephalexin. *Biotechnol. Bioeng.,* **80,** 144-155.

[٢٨] Schmidt, S., Havekost, D., Kaiser, K., Kauling, J., and Henzler, H.-J. (2005) Crystallization for the downstream processing of proteins. *Eng. Life Sci.,***5,** 273-276.

[٢٩] Buque-Taboada, E.M., Straathof, A.J.J., Heijnen, J.J., and van der Wielen, L.A.M. (2004) *In situ* product removal using a crystalization loop in asymmetric reduction of 4-oxoisophorone by *Saccharomyces cerevisiae. Biotechnol. Bioeng.,* **86,** 795-800.

[٣٠] Bayley, C.R. and Vaidya, N.A. (1992) *Chirality in Industry, The Commercial Manufacture and Applications of Optically Active Compounds*(eds A.N. Collins, G.N. Sheldrake, and J. Crosby), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

[٣١] Tung, H.H., Waterson, S., Reynolds, S., and Paul, E. (1995) Resolution of ibuprofen via stereospecific crystallization. *AIChE Symp. Ser.,***91,** 64-68.

[٣٢] Strancar, A., Podgornik, A., Barut, M., and Necina, R. (2002) Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.,***76,** 49-85.

[٣٣] Xie, S., Allington, R.W., Fréchet, J.M.J., and Svec, F. (2002) Porous polymer monoliths: an alternative to classical beads. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*,**76,** 87-125.

[٣٤] Mattiasson, B. (ed.) (1999) *Expanded Bed Chromatography,* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

[٣٥] Imamoglu, S. (2002) Simulated moving bed chromatography (SMB) for application in bioseparation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **76,** 211-231.

[٣٦] Bechtold, M., Makart, S., Heinemann, M., and Panke, S. (2006) Integrated operation of continuous chromatography and biotrans-formations for the generic high yield production of fine chemicals. *J. Biotechnol.,* **124,** 146-162.

[٣٧] Wolfgang, J. and Prior, A. (2002) Continuous annular chromatography. *Adv. Biochem. Bioeng Biotechnol.,* **76,** 233-255.

[٣٨] Mosbach, K. and Ramström, O. (1996) The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Bio-technology,* **14,** 163-170.

[٣٩] Kempe, M. and Mosbach, K. (1995) Molecular imprinting used for chiral separations. *J. Chromatogr. A.,* **694,** 3-13.

[٤٠] Nicholls, I.A., Andersson, L.I., Mosbach, K., and Ekberg, B. (1995) Recognition and enantio-selection of drugs and biochemicals using molecular imprinted polymer technology. *Trends Biotechnol.,* **13,** 47-51.

[٤١] Ju, J.Y., Shin, C.S., Whitcombe, M.J., and Vulfson, E.N. (1999) Imprinted polymers as tools for the recovery of secondary metabolites produced by fermentation. *Biotechnol. Bioeng.,* **64,** 232-239.

[٤٢] Kemmere, M.F. and Keurentjes, J.T.F. (2001) Membranes in chiral separations, in *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach* (ed. G. Subramanian), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 127-150.

[٤٣] Kwiatkowski, J.R., McAloon, A.J., Taylor, F., and Johnston, D.B. (2006) Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Ind. Crops Prod.,* **23,** 288-296.

[٤٤] Wasewar, K.L. and Pangarkar, V.G. (2006) Intensification of recovery of ethanol from fermentation broth using pervaporation: economical evaluation. *Chem. Biochem. Eng. Q.,* **20,** 135-145.

[٤٥] Ikegami, T., Kitamoto, D., Negishi, H., Haraya, K., Matsuda, H., Nianai, Y., Koura, N., Sano, T., and Yanagishita, H. (2003) Drastic improvement of bioethanol recovery using a pervaporation separation technique employing a silicone subber-coated silicalite membrane. *J. Chem. Technol. Biotechnol.,* **78,** 1006-1010.

[٤٦] Zeikus, J.G., Jain, M.K., and Elankovan, P. (1999) Biotechnology of succinic acid pro-duction and markets for derived industrial products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **51,** 545-552.

[٤٧] Datta, R. and Henry, M. (2006) Lactic acid: recent advances in products, process and technologies-a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.,* **81,** 1119-1129.

[٤٨] Joglekar, H.G., Rahman, I., Babu, S., Kulkarni, B.D., and Joshi, A. (2006) Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. *Sep. Purif. Technol.,* **52,** 1-17.

[٤٩] Song, H. and Lee, S.Y. (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb Technol.,* **39,** 352-361.

[٥٠] Baniel, A.M. and Eyal, A.M. (1995) Citric acid extraction. US Patent 5,426,220.

[٥١] Huh, Y.S., Jun, Y.-S., Hong, Y.K., Song, H., Lee, S.Y., and Hong, W.H. (2006) Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succinici-producens. Process Biochem.,* **41,** 1461-1465.

[٥٢] Bailly, M. (2002) Production of organic acids by bipolar electrodialysis: realizations and perspectives. *Desalination,* **144,** 157-162.

[٥٣] Glassner, D.A. and Datta, R. (1992) Process for the production and purification of succinic acid. US Patent 5,143,834.

[٥٤] Zeikus, J.G., Elankovan, P., and Grethlein, A. (1995) Utilizing fermentation as a processing alternative: succinic acid from renewable resources. *Chem. Proc.*, **1995,** 71-73.

[٥٥] Johnson, E.A. and Schroeder, W.A. (1996) *Microbial Carotenoids, Advances in Bio-chemical Engineering and Biotechnology,* vol. 53 (ed. A. Fiechter), Springer-Verlag, Heidel-berg, pp. 119-178.

[٥٦] Nobre, B., Marcelo, F., Passos, R., Beirão, L., Palavra, A., Gouveia, L., and Mendes, R. (2006) Supercritical carbon dioxide extraction of asta-xanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis. Eur. Food Res. Technol.,* **223,** 787-790.

[٥٧] Chen, F., Li, H.-B., Wong, R.N.-S., Ji, B., and Jiang, Y. (2005) Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the micro-alga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A,* **1064,** 183-186.

[٥٨] Mukherjee, S., Das, P., and Sen, R. (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.,* **24,** 509-515.

[٥٩] Steinbüchel, A. and Füchtenbush, B. (1998) Bacterial and other biological systems for poly-ester production. *Trends Biotechnol.*, **16,** 419-427.

[٦٠] Lee, S.Y. (1996) Bacterial polyhydroxy-alkanoates. *Biotechnol. Bioeng.*, **49,** 1-14.

[٦١] Koning, G.J.M., Kellerhals, M., Meurs, C.V., and Witholt, B. (1997) A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from pseudomonads. Part 2: Process development and economic evaluation. *Bioprocess Eng.,* **17,** 15-21.

[٦٢] Tamer, I.M., Moo-Young, M., and Chisti, Y. (1998) Optimization of poly(β-hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus* : combined mechanical and chemical treatments. *Bioprocess Eng.,* **19,** 459-468.

[٦٣] Hahn, S.K., Chang, Y.K., and Lee, S.Y. (1995) Recovery and characterization of poly(3-hydroxy-butyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol.,* **61**, 34-39.

[٦٤] Choi, J. and Lee, S.Y. (1999) Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxy-butyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnol. Bioeng.*, **62,** 546-553.

[٦٥] Page, J.W. and Cornish, A. (1993) Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly-β-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.,* **59,** 4236-4244.