الفصل السادس

التحفيز الحيوي التطبيقي: نظرةٌ عامة

APPLIED BIOCATALYSIS: AN OVERVIEW

بيدرو فيرنانديز و يواخيم كابرال

Pedro Fernandes and Joaquim M.S. Cabral

(٦,١) المقدمة Introduction

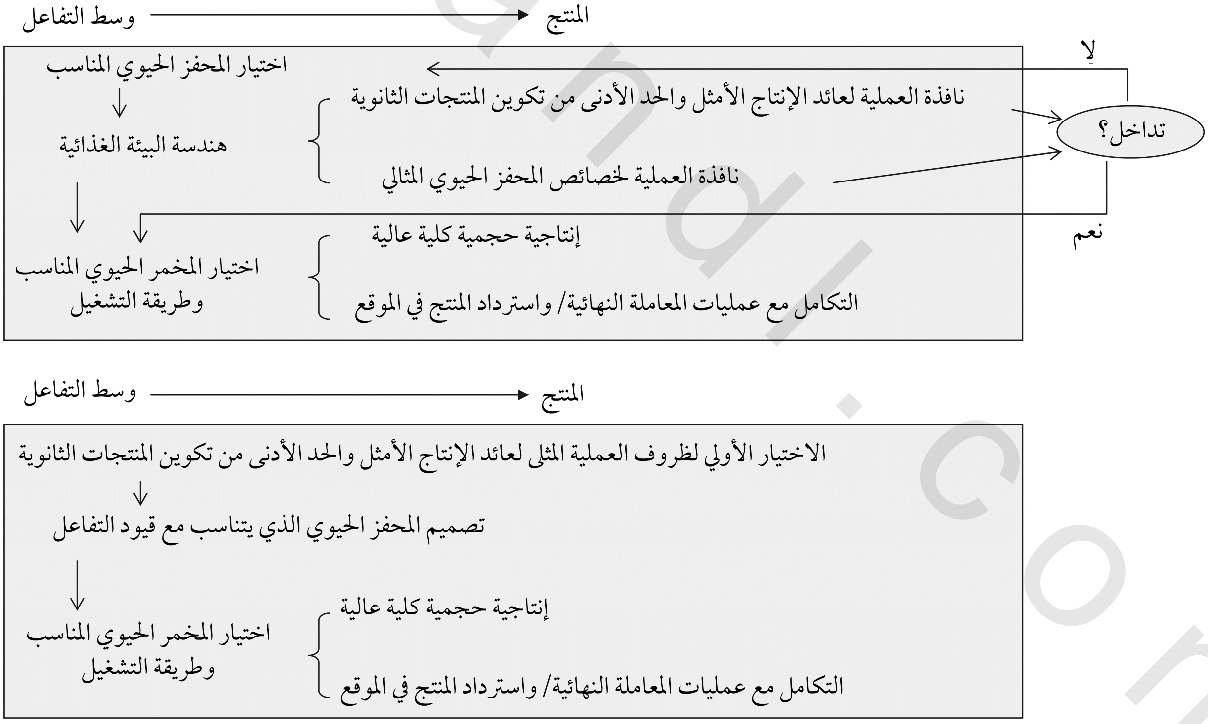
يستند مفهوم التحفيز الحيوي التطبيقي على استخدام محفز حيوي لتحفيز التحول الكيميائي لوسط تفاعل معين إلى الناتج، بطريقة انتقاء كيميائية/ اتجاهية/ فراغية، تحت ظروف معتدلة ومحكومة [١]. ويمكن أن يكون المحفز الحيوي إما إنزيم معزول وإما خلية كاملة تحتوي على الإنزيمات المطلوبة. ووفقاً لطبيعة المحفز الحيوي، فإن التحول عادةً ما يوصف بأنه تحفيز حيوي أو تحويل حيوي [٢]. وخلال النص بأكمله سيتم استخدام مصطلح "التحويل الحيوي" الواسع لتعيين أي من هذه التحويلات، إلا إذا كانت هناك حاجة للتخصيص في هذا السياق.

في الوقت الراهن تستخدم الإنزيمات المعزولة والخلايا الكاملة، في صورة حرة أو مقيدة، في إنتاج وتصنيع مجموعة كبيرة من المركبات والبضائع، كما تمت مناقشته بالتفصيل في فصولٍ مختلفة من هذا الكتاب. تستخدم المحفزات الحيوية على نطاقٍ واسع في إنتاج السلع والكيماويات الدقيقة، ومنتجات العناية بالمستهلك والمستحضرات الصيدلانية الحيوية؛ وفي تطوير تطبيقات التحليل والتشخيص؛ وفي التحليل الحيوي للمركبات الضارة أو النفايات؛ وفي قطاع الطاقة؛ وفي ترميم الأعمال الفنية التالفة [٣-٩]. وعلى الرغم من هذا الانتشار الواسع، فإنه لابد من الإشارة إلى أن مهمة تطوير، وتحسين، وتنفيذ نظام تحويل حيوي فعال ليست مهمة سهلة، حيث إنه لابد من النظر في عدة جوانب بعناية. فاختيار المحفز الحيوي، وطبيعته وتركيبه، وخصائص بيئة التحويل الحيوي، وتركيب المفاعل الأكثر أفضلية هي خصائص يجب التحقق منها، وتكون علاوةً على ذلك مترابطة.

بعد تحديد خطوة/ مسار التحفيز، فإن النهج التقليدي لتطوير نظام تحويل حيوي معين يركز على خصائص المحفز الحيوي؛ لأنها سوف تعمل في ظل ظروف تشغيلية صارمة ويمكن أن تكون تكلفتها جزء مهم من

obeikandi.com

التكاليف الكلية للعملية [١٠]، على الرغم من المبالغة في كثيرٍ من الأحيان لهذه الخاصية الأخيرة [١، ١١]. وعلاوةً على ذلك، فالتحسينات الأخيرة في إنتاج المحفز الحيوي [١٢، ١٣]، جنباً إلى جنبٍ مع زيادة تكاليف المواد الخام، تميل إلى تقليل أهمية المحفزات الحيوية فـي تكاليف العملية [١٠]. ومن ناحيةٍ أخرى، فإن فهمنا المتزايد لتركيب الإنزيم وآليات التفاعل [١٤]، إلى جانب طرق التطوير السريع لمحفزات حيوية ذات خصائص محسنة (على سبيل المثال، النشاط، والتخصصية، والاستقرار، لا سيما تحت ظروف تفاعل غير تقليدية)، والإنجذاب إلى أوساط التفاعل الغير عادية [١٥]، وكذلك طرق الفحص عالية الإنتاجية التي تسمح بتعريف المحفزات الحيوية الجديدة/ المحسنة و/ أو الأنشطة التحفيزية الجديدة [١٦، ١٧]، قد ساهمت جميعاً في توسيع أوساط التفاعل المستهدفة بالتحفيز الحيوي. وسمحت أيضاً بتركيزات مرتفعة من وسط التفاعل وعليه زيادة الإنتاجية، ومهدت الطريق لتحول فـي النهج التقليدي. وهذا يعني، إجبار المحفز الحيوي ليناسب نظام تحفيز حيوي تم تصميمه حول التفاعل، مع الأخذ في الاعتبار الديناميكا الحرارية للتفاعل وخصائص وسط التفاعل والمنتجات (الشكل رقم ١ ,٦)[١٠].



الشكل رقم (١ ,٦). لـمحة موجزة عن الخطوات الرئيسة التي ينبغي النظر فيها عند تصميم نظام التحويل الحيوي. النهج التقليدي (أ) يركز على خصائص المحفز الحيوي، في حين أن النموذج الناشئ الجديدة (ب)، المتصور منذ البداية، يعتمد على قيود التفاعل. مقتبس من [١٠، ١٨، ١٩].

obeikandi.com

يتطلب تنفيذ مثل هذه النقلة النوعية مزيجاً من تقنيات عديدة، مع التكاليف المترتبة على المدى القصير، ولكن من المحتمل أن تكون العائدات مجزية على المدى المتوسط والبعيد. وينبغي أيضاً تصميم نظام التحول الحيوي لتسهيل استرجاع المنتج، من خلال استرداد المنتج في الموقع مباشرة، إما من خلال نقلٍ مستمرٍ للمنتج إلى مرحلةٍ ثانية سائلة أو صلبة [٢٠-٢٢]، أو من خلال تكوين مرحلة صلبة ثانية [٢٣]. وهناك اعتبارات خاصة مطلوبة أيضاً إذا كانت خطوة التحفيز الحيوي هي جزء من مسار يتضمن أيضاً التحفيز الكيميائي. ويكون المزج بين التحفيز الكيميائي والإنزيمي جذاباً بشكلٍ خاص في تخليق البوليمرات، حيث إن المواد الخام غالباً ما تكون مركبات ذات عدة مجموعات وظيفية عضوية متشابهة، والتي يميزها الإنزيم بسهولة لطبيعة انتقائه الفراغية، على العكس من المحفز الكيميائي الذي يتطلب استخدامه حماية وعدم حماية كل هذه المجموعات عدا المجموعة المستهدفة للتغيير. يمكن بلمرة الوحدات البنائية بواسطة التحفيز الكيميائي بسرعة أكبر من النهج الإنزيمي [١٥، ٢٤]. وقد استخدم الجمع بين النهجين في تخليق البوليمرات القائمة على السكر [٢٥]، والببتيدات [٢٦، ٢٧]، والنيوكليوتيدات الديوكسي ريبوزية [٢٨]، وأحماض البيتا الأمينية [٢٩]، والعقاقير المساعدة البوليمرية من البروفينات [٣٠].

(٦, ٢) تصميم نظام التحويل الحيوي The Design of the Bioconversion System

(٦, ٢, ١) المحفز الحيوي The Biocatalyst

(٦, ٢, ١, ١) الاختيار Selection

عند اختيار محفز حيوي مناسب لتحويل حيوي معين، يجب أخذ الكثير من الخصائص بعين الاعتبار. وهذه تشمل النشاط، والانتقائية، والاستقرار في العمل تحت ظروف التشغيل المطلوبة (درجة الحموضة، ودرجة الحرارة، وتركيب البيئة، ووسط التفاعل، وتركيزات المنتج). ويمكن اتخاذ عدة مناهج في اختيار المحفز الحيوي للتحويل الحيوي المقصود، أي استخدام المحفز الحيوي القائم، والتعديل الوراثي للمحفز الحيوي القائم أو الكشف عن المحفزات الحيوية الجديدة [١٩، ٣١]. والتصفح خلال المراجع هو النهج الشائع لاختيار محفز حيوي قائم. ويمكن استكمال هذا العملية التقليدية بالمعلومات التي تم جمعها من قواعد بيانات مثل بريندا (http://www.brenda.uni-koeln.de)، التي تعطي تقييم سهل للتفاصيل عن الإنزيمات الموجودة، مثل أوساط التفاعل الطبيعية والمنتجات، والعوامل المساعدة، والمسارات، والمثبطات. وقد يسهم هذا بشكلٍ ملحوظ في الإسراع في الاختيار. وقد أضيفت حديثاً بيانات استخراج النص (AMENDA and FRENDA) إلى المخزون.

وينبغي أن يؤخذ في الاعتبار أن استخدام الإنزيمات الموجودة تحت ظروف تفاعل غير عادية قد يكشف نشاطات حفزية حيوية غير مستغلة. وهذا يمكن أيضاً تحقيقه من خلال التعديل الوراثي للمحفزات الحيوية

القائمة عن طريق التطفيرات موجهة-المكان أو التطفيرات العشوائية. ويمكن أيضاً إجراء هذه التعديلات لزيادة النشاط و/ أو الاستقرار و/ أو الانتقائية.

ويأخذ النهج الثالث للكشف عن المحفز الحيوي وهو التصفح عن الكائنات الدقيقة ذات أنشطة جديدة في الاعتبار التنوع الكيميائي الحيوي الكبير في الطبيعة. وينبغي الإشارة إلى أن هذا النهج لا يزال بعيداً عن الاستغلال الكامل، حيث إن أقل من ١٠٪ من الكائنات الدقيقة (مثل البكتيريا) الموجودة في بيئة معينة يمكن زراعتها في بيئات قياسية [٣٢]. وقد أدى تطور التقنيات التي تسمح بالكشف عن أعداد كبيرة من الكائنات الحية من خلال طرق كشف بسيطة ورخيصة، وسريعة، وانتقائية، مع الأتمتة، وإلى تحسن هذه العملية الشاقة عادة.

(٢, ١, ٢, ٦) خلايا كاملة أو إنزيمات معزولة؟ Whole Cells or Isolated Enzymes?

ينصح باستخدام إنزيم معزول لتحفيز تفاعل من خطوة واحدة، شريطة أن يكون العزل واضحاً ورخيصاً والإنزيم الناتج يكون مستقراً في بيئة خالية من الخلايا. وتشير التقديرات إلى أنه لكي تكون هذه الطريقة قادرة على المنافسة مع عمليات الخلايا الكاملة يجب أن لا تتعدى تكلفة الإنزيم ٥-١٠٪ من التكلفة الإجمالية للمنتج [١٨]. وقد استخدم عدد من الإنزيمات المعزولة في صورة نقية (جزئياً) في نظم التحويل الحيوي، مثل الألكحول ديهيدروجينيزات، الألدوليزات، الأميليزات، الأميلوجليكوزيدات، الكاتاليزات، السليوليزات، البيتا-جالاكتوزيدات (وتشمل اللاكتيزات)، مصاوغات الجلوكوز، مؤكسدات الجلوكوز، الإنيولينيزات، الكيتوليزات، اللاكيزات، الليبيزات، البكتينيزات، البولليولانيز المحلل لإسترات ميثيل البكتين، الأسيليزات للبنيسيلين ج، الفسوسفوليبيزات، والتريبسينات [١٩، ٣٣]. وقد تكون إزالة الإنزيم من بيئته الطبيعية، مع ذلك، معقدة ومكلفة، وقد يكون الإنزيم المعزول أقل استقراراً و/ أو يفقد النشاط التحفيزي. ويلاحظ في كثيرٍ من الأحيان فقدان النشاط التحفيزي عند استخدام الإنزيمات المرتبطة بالغشاء (مثل الأوكسيجينيزات المحتوية على الحديد، مثل السيتوكروم P450s وهيدروكسيلاز الألكان) [٣٤، ٣٥].

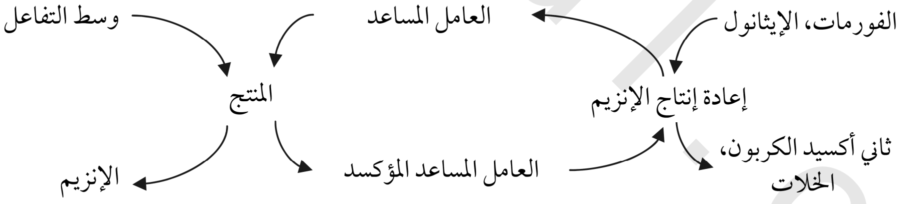
وقد تجعل تفاعلات الأكسدة-والاختزال، والتي تحتاج عوامل مساعدة مثل الأسيتيل Co-A، ATP، FAD، ونيوكليوتيدات السكر أو ٣'-فوسفوأدينوزين-٥'-فوسفوسلفات (PAPS)، أيضاً استخدام الخلايا الكاملة كمحفزات حيوية جذاباً، حيث إن العوامل المساعدة مكلفة وتتطلب التوفير المستمر لجعل نظام التحويل الحيوي مجدياً اقتصادياً. ويعدُّ استخدام الخلايا الكاملة بمساعدة مصدر كربوني يوفر طاقة الحفظ للخلية، وكذلك القدرة الاختزالية لتوفير العوامل المساعدة [١]، أكثر فعالية من حيث التكلفة، على الرغم من أنها قد تؤدي إلى تكوين نواتج ثانوية وتعرقل استرداد المنتج [٣٦]. وقد اقترحت عدة أساليب كيميائية، وكيميائية-كهربائية،

وكيميائية-إنزيمية، وإنزيمية للسماح باستخدام الإنزيمات في نظم التحويل الحيوي ذات تفاعلات الأكسدة والاختزال [٣٧، ٣٨].

ولكي تكون مفيدة وعملية، فإن جميع هذه الطرق تحتاج إلى الامتثال لبعض الاحتياجات اللازمة لتوفير العوامل المساعدة [٣٧]:

- ينبغي أن يكون عدد التحول الكلي للعامل المساعد (المعرف بالعدد الكلي لمولات المنتج الناتجة من مول من العامل المساعد خلال وقت التفاعل الكامل) عالياً (على الأقل من $١٠^{٣}-١٠^{٥}$).
- يجب أن تكون جميع المواد المستخدمة (الإنزيمات والكواشف) متاحة بسهولة ويمكن الوصول إليها، ورخيصة نسبياً ومستقرة تحت ظروف التشغيل، ولا ينبغي أن تتداخل مع نظام التفاعل الرئيس جنباً إلى جنبٍ مع المنتجات الثانوية لخطوة التجديد.
- ينبغي أن تكون خطوة التجديد ملائمة حركياً وحرارياً.

وتفضل الطرق الإنزيمية المعتمدة على تفاعل مزدوج (الشكل رقم ٦,٢) حالياً لتوفير العوامل المساعدة، نظراً؛ لأنها توفر أفضل ملائم لتلك المتطلبات، على الرغم من أن الطرق الكيميائية-الإنزيمية، المعتمدة على استخدام المحفزات الكيميائية، مثل المتراكب الفلزي العضوي الروديوم (٢،٢'-ثنائي البيريديل)(خماسي الميثيل الداينيل الحلقي) [٣٩] وسيبولكرات الزنك/ كوبالت الثلاثي [٣٨] تبدو واعدة لتوفير العوامل المساعدة.



الشكل رقم (٦,٢). تخطيط لنظام تحفيز حيوي ذي تجديد إنزيمي للعوامل المساعدة. إنزيمات التجديد الشائعة مثل الألكحول ديهيدروجينيز (ADH)، الفورمات ديهيدروجينيز (FDH)، الجلوكوز ديهيدروجينيز (GDH).

مقارنةً مع الإنزيمات المعزولة، فإن محفزات الخلية الكاملة عادةً ما تكون أسرع وأرخص، وحيث إن الإنزيمات محمية من البيئة الخارجية، فإنها من المرجح أن تكون أكثر استقراراً على المدى الطويل. فمن جهة، في نظام الخلية الكاملة توجد عدة إنزيمات، بالإضافة إلى الإنزيم المطلوب، وهي الميزة التي من المرجح أن تؤدي إلى تكوين نواتج ثانوية. ويمكن تصور المعالجة الحرارية للخلايا للقضاء على النشاط الإنزيمي غير المرغوب فيه، شريطة أن يتحمل الإنزيم المطلوب المعالجة [٤٠-٤٢]. وتشمل البدائل الأخرى لتفادي النشاط الإنزيمي غير المرغوب فيه

obeikandl.com

استخدام خلايا مجفدة [٤٣]. ومع ذلك، إذا لم يكن لتلك الإنزيمات الإضافية أي تأثير على نقاء المنتج والإنتاجية، فإنه يفضل استخدام الخلايا الكاملة للتكلفة ومسائل التبسيط المذكورة آنفاً.

من الناحية الأخرى، يميل التحويل الحيوي باستخدام الخلايا الكاملة إلى إظهار معدلات تحويل أقل من الإنزيمات الحرة، تقريباً بعامل واحد أو اثنين من حيث الحجم؛ بسبب قيود انتقال الكتلة الناجمة عن جدران الخلايا والأغشية الخلوية، والتي تعمل بمثابة حواجز مادية وعليه تقلل نفاذية وسط التفاعل (والناتج) [٤٤-٤٨]. وقد تغير قيود انتقال الكتلة هذه أهمية محاولات الكشف لتعريف المحفزات الحيوية للخلايا الكاملة، حيث إن بعضها قد توصف بأنها غير نشطة إذا لم يتم الكشف عن التفاعل في الوقت المناسب، على الرغم من أن الخلية لديها الإنزيمات النشطة. وقد يتم إجراء تنفيذ الخلية (تعديل الجدار الخلوي) للتغلب على قيود انتقال الكتلة هذه. ويمكن استخدام عدة مناهج لتغيير تركيب جدار الخلية أو الغشاء بدون التأثير على المحفز الحيوي. وتعتمد الأساليب التقليدية على الطرق الفيزيائية-الكيميائية مثل [٢٠، ٤٧]:

- التجفيف بالحرارة.
- التجفيف بالأسيتون.
- الدورات المتكررة من التجميد والإذابة.
- الصوتنة (التأثير بالموجات الصوتية).
- إضافة المنظفات (بروميد السيتيل ميثيل أمونيوم، بلورونيك ف-٦٨، تريتون إكس-١٠٠).
- التحضين مع المذيبات العضوية (كلوروفورم، إثيل الإثير الثنائي، سلفوكسيد ثنائي الميثيل، الكحولات قصيرة السلسلة، التولوين).
- الإجهاد بكلوريد الصوديوم.

عند إجراء التحويل الحيوي بواسطة الخلايا النامية، فإنه يمكن إجراء تنفيذ الخلية بالتأثير في بيئة النمو من خلال إضافة مركبات تتداخل مع آليات تكوين جدار الخلية أو تشكيل الغشاء. ومن الأمثلة على ذلك استخدام الجليسين، أيزونيازيد، دي-إل-نورليوسين، وميتا-فلوروفينيل آلانين، أو الكاتيونات الكثيرة مثل البروتامين، البوليميكسين ب نونابتيد، والبولي إيثيلين أمين [٤٩-٥١].

وتنتشر هذه الإستراتيجيات للحد من قيود انتقال الكتلة بشكلٍ جيد، ولكن تم تطويرها بطريقة المحاولة والخطأ، وإضافة الكثير من الخطوات إلى العمليات الحيوية، ولكن يمكن عرقلة النشاط التحفيزي الحيوي المطلوب. وكذلك من المحتمل أن تسبب عوامل تنفيذ الخلية صعوبات في المعاملة النهائية.

ويستند نهج مختلف إلى استخدام تكنولوجيا الحمض النووي المؤتلف لتغير نفاذية الخلية بطريقة يمكن التنبؤ بها من خلال استحداث الطفرات في البروتينات المشتركة في تخليق جدر الخلايا أو الأغشية [٤٧، ٤٨، ٥٢]. وأمكن أيضاً باستخدام الهندسة الجزيئية تقليل تأثير حاجز النفاذية عن طريق تعبير إنزيم داخل الخلية غير متشابه في الحيز قبل البلازميدي في بكتيريا سالبة لصبغة الجرام [٥٣].

وعند الحاجة إلى تحويلات حيوية متعددة الخطوات تشمل مجموعات من التفاعلات الإنزيمية، على سبيل المثال في إنتاج جزيئات كبيرة ومعقدة، فإن الخلايا الكاملة هي بالتأكيد الخيار المفضل حيث إن هذه التفاعلات معقدة لأدائها في المختبر [١٥، ٢٨، ٣٤]. بعض الأمثلة على التحويلات الحيوية متعددة الخطوات تشمل انشقاق السلسلة الجانبية للإستيرول لإنتاج مركبات الستيرويدات الوسيطة، وإنتاج إل-ميثيونين من الهيدانتوين، وإنتاج ٢' -ديؤكسي ريبونيكليوزيدات، وتخليق الكاروتينويدات. والعمليات الإنزيمية حرة-الخلية نادرة نسبياً، ويقتصر استخدام نظم تحفيز حيوي من هذا القبيل على ارتباط اثنين من الإنزيمات [٥٤، ٥٥].

ويمكن زيادة إمكانات نظم التحويل الحيوية المستندة على الخلايا الكاملة من خلال استخدام الهندسة الأيضية والتطور الموجه. ويسمح التحليل الكمي لتنظيم الأيض بالتعرف على النقاط الحرجة في مسارات الأيض، وهذا يمهد الطريق للتغييرات الوراثية، والتي تستهدف تحسين المسارات الطبيعية. وعلاوةً على ذلك، يمكن تعديل المسارات الموجودة لإنتاج مركبات جديدة ويمكن سحب المسارات معاً [١٥]، ومن ثم خلق حقل غير محدود تقريباً للتحفيز الحيوي التطبيقي.

(٣, ١, ٢, ٦) تقييد المحفزات الحيوية Immobilization of Biocatalysts

تعتمد البحوث الأساسية في توصيف خصائص المحفز الحيوي والتحويل الحيوي على استخدام المحفزات الحيوية الحرة معلقة أو مذابة في مرحلة سائلة. وعندما يتم التأسيس، يتم السعي بعد ذلك عادة لتقييد المحفز الحيوي، ولكن في الحالات الخاصة التي تتطلب محفز حيوي حر، كما في صياغة المنظفات (مساحيق الغسيل)، وصناعة الخبز والجبن. وبعض المزايا الفعلية على مستوى العملية الناتجة من تقييد المحفز الحيوي في نظام التحويل الحيوي يمكن توقعها بسهولة. ويسهل عدم تجانس نظام التحفيز الحيوي المقيد من استرداد المحفز الحيوي والمنتج، ويتيح إعادة الاستخدام المتعدد للمحفز الحيوي، والطريقة المستمرة للعملية، والمدى الواسع من المفاعلات الحيوية. يوفر التقييد بيئة وقائية للمحفز الحيوي؛ كما أنه أيضاً، في الحالة الخاصة للإنزيمات، قد يحاكي إلى حدٍ ما طريقة وجودها الطبيعية في الخلايا، حيث ترتبط الإنزيمات في كثيرٍ من الأحيان بالأغشية الخلوية. وعليه يمكن أن يسبب التقييد استقرار تركيب الإنزيمات، ونشاطها الحفزي. وإلى جانب هذه المزايا، تم تسجيل بعض السلبيات الناتجة من التقييد، كالملخصة في الجدول رقم (١, ٦).

الجدول رقم (١ ,٦). مميزات وسلبيات تقييد المحفزات الحيوية.

		التأثيرات الرئيسة/ خصائص معينة
المميزات	المحفز الحيوي مقيد في المفاعل	إعادة استخدام المحفز الحيوي، طريقة تشغيل مستمرة، تجنب تلوث المنتج بالمحفز الحيوي وتسهيل استرجاع المنتج من داخل الخلية
	تعريف البيئة الدقيقة للمحفز الحيوي	إمكانية تصميم النشاط والتخصصية للمحفز الحيوي، استقرار المحفز الحيوي، حماية المحفزات الحيوية الحساسة للإجهاد وتقليل التثبيط البيني
	تركيز عالي من الحفز الحيوي	زيادة معدلات التفاعل، إنتاجية حجمية عالية
السلبيات/ المعوقات	طرق تجريبية	تتطلب وقت زائد، عملية تعتمد على الحالة، تصميم وتحكم معقد
	تكلفة عالية	تحتاج إلى مواد إضافية، معدات، وقت
	فقد لنشاط المحفز الحيوي خلال عملية التقييد	التعرض لدرجات أس هيدروجيني متطرفة، درجات حرارة عالية، إجهاد عالي، أو إجهاد ميكانيكي، مركبات سامة، قيود انتقال الكتلة، إعاقة/ منع موضع النشاط وإضعاف وصول مركبات وسائط التفاعل الكبيرة، تغيير درجة الأس الهيدروجيني للبيئة الدقيقة
	فقد لنشاط المحفز الحيوي خلال عملية التقييد	فقد المحفز الحيوي بسبب التسرب أو عدم الإمتزاز؛ تآكل الجسيمات، الذوبان، التمزق بسبب نمو الخلايا؛ فقد الدقائق (الجسيمات ذات قطر أقل من ٥٠-١٠٠ ميكروميتر) في التدفق الخارج؛ تراكم المثبطات/ الملوثات في البيئة الدقيقة
	عوائق تشغيلية	قد تكون هناك حاجة إلى خصائص معينة للمفاعل، تراكم المعلقات الصلبة، التحكم في تركيب المحاليل المغذية

بتصرف من [١٩،٥٦].

يمكن إجراء التقييد بطرقٍ فيزيائية أو كيميائية (الشكل رقم ٣ ,٦)، باستخدام ناقلات عدة (الجدول رقم ٢ ,٦). بالإضافة إلى ذلك، فالكثير من المواد الشائعة، وبعض منهم من غير المرجح في اللمحة الأولى، يمكن استخدامها، مثل رقائق الخشب [٥٩]، الحجر الإسفنجي [٦٠]، والزبيب الجاف [٦١]، وقشر البرتقال [٦٢]. وتؤدي خصائص الناقل دوراً رئيساً في أداء المحفز الحيوي المقيد وستكون هناك حاجة لمجموعة معينة من الخصائص. وتشمل هذه ما يلي:

● مساحة السطح: مساحة السطح الكبيرة (فوق ١٠٠ م٢/ جم) [٥٦] متوقعة فـي كثيرٍ من الأحيان، والتي تأتي في صالح الناقلات المسامية. فـي الحالة الأخيرة يجب أن تتسع المسام بما يكفي لاستيعاب المحفز الحيوي بحيث يمكن أن يهاجر وسط التفاعل والمنتج بسهولة.

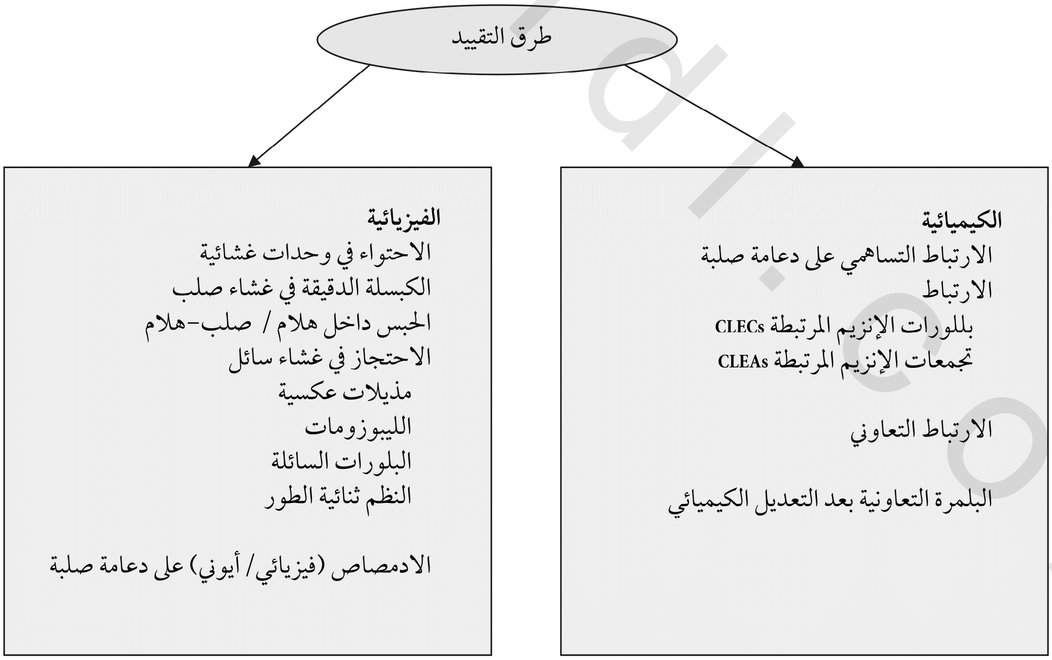
● غير قابل للذوبان في وسط التفاعل.

● ثبات ميكانيكي وكيميائي وحيوي، وذلك لتحمل الإجهاد الهيدروديناميكي والميكانيكي، وتكون خاملة للمواد الكيميائية في وسط التفاعل وللتحلل الميكروبي. سهولة التجديد (في حالة الناقلات غالية الثمن).

● شكل وحجم الدعامة؛ لأنه يؤثر فـي انخفاض الضغط المترابط ومعدل التدفق في مفاعلات العمود، وعليه معدل الترشيح خلال الاسترداد فـي طريقة الدفعة المتكررة، وكذلك الانتشار. وقد تكون الجسيمات الكروية ذات قطر من ١٥٠ حتى ٣٠٠ ميكروميتر هـي الوسيلة الأفضل [٥٦] ولكن للتحويلات الحيوية على مقياس النانو.

● طبيعة الناقل المحب للماء/ الكاره للماء، حيث إنها تؤثر في التقييد غير التساهمي وعلى توافر وتوزيع وسط التفاعل/ المنتج.

● طبيعة، وكثافة السطح، وتوزيع المجموعات الوظيفية.



الشكل رقم (٦,٣). تصنيف طرق التقييد. بتصرف من [١٩، ٥٦-٥٨].

obeikandi.com

الجدول رقم (٢ , ٦). أمثلة للناقلات شائعة الاستخدام لتقييد المحفزات الحيوية.

البوليمرات الطبيعية	الكربوهيدرات: الأجار، الأجاروز، الألجينات، الكيتين، الكيتوزان، الديكستران، الجيلان، الكابا-كاراجينان، البكتين، البكتات، البكتينات البروتينات: الكيراتين، الكولاجين، الجيلاتين
البوليمرات المخلقة	البولي أكريلات، البولي أميدات، البولي بروبيلين، البولي ستيرين، البولي زيلوسان، البولي يوريثان، البولي فينيلات، بوليمرات الزيلان/ السيليكا جل، أكسيدات المعادن الانتقالية

وقد يتطلب تقييد المحفز الحيوي على سطح ناقل صلب تعديلات كيميائية (تنشيط) للمحفز الحيوي [٦٣] أو للناقل [٥٦]، وفي كثيرٍ من الأحيان ما يؤدي الأول إلى خسارة حادة في النشاط. وبدلاً من ذلك يمكن استخدام عامل ازدواجي كوسيط بين المجموعات الوظيفية للمحفز الحيوي والناقل، والتي قد تؤدي أيضاً دور الفاصل، مما يقلل من عائق الفراغية. وفي نهجٍ أكثر تهذيباً، يمكن استخدام تقنية الحمض النووي المؤتلف لتعديل المحفز الحيوي، حتى يمكن أن يدمص على ناقل معين. وتنتشر هذه الأساليب، أو خليط منها، على نطاقٍ واسع، ويتم نشر طرق جديدة أو منهجيات محسنة بمعدل كبير. وبصفة خاصة فإن استخدام تغليف محلول المادة الهلامية يجمع أهمية كبيرة حيث إنه يعطي محفزات حيوية مرنة وقوية [٦٤، ٦٥]، وكذلك مجاميع الإنزيم المرتبطة [٥٨]، وبلورات الإنزيم المرتبطة [٦٦]، والتحفيز الحيوي في مستوى النانو [٦٧، ٦٨].

في ضوء مقياس النانو متناهي الصغر لجزيئات الإنزيم، فإن هذه المحفزات الحيوية يمكن فقط أن تستفيد من نسب مساحة السطح الكبيرة إلى الحجم للمواد النانومترية. وتشمل هذه المواد جسيمات النانو المصنوعة من السيليكا، وأكسيد الحديد الأسود (الماجنتيت) والذهب وأنابيب الكربون النانوية، وألياف النانو البوليمرية. ويمكن أن يجمع التركيب النانوي بين مكونات محبة وكارهة للماء، وبالتالي تسهل انتشار أوساط التفاعل المحبة للماء والنواتج إلى/ من مرحلة محبة للماء حيث يكون الإنزيم مقيداً. ويسمح هذا النهج بزيادة قدرها أكثر من ٢٠٠ ضعف في عدد تحول التفاعلات المحفزة بإنزيم بيروكسيديز الفجل في الهيبتان، بالمقارنة مع الإنزيم الحر [٦٩].

ويبدو أن نهج مقياس النانو يوفر حلاً مناسباً للقضايا المتناقضة في كثيرٍ من الأحيان التي يتم التعرض لها في تحسين نظم الإنزيمات المقيدة، وهي مساحة السطح الكبيرة وتحميل الإنزيم التي عادة ما تؤدي إلى مشكلات نقل الكتلة خلال الدعامات. وهناك بعض السلبيات، رغم ذلك، وخصوصاً انتشار الجسيمات في بيئة التحويل الحيوي واستردادها، ومحدودية ترتيب المفاعل الحيوي، والشواغل الصحية والبيئية المرتبطة بمعالجة الجسيمات النانوية [٦٧، ٦٨].

على الرغم من كونه مفيداً للغاية، إلا أنه غالباً ما يؤدي التقييد إلى تغييرات في خصائص المحفز الحيوي (الجدول رقم ٣,٦). وهذه يجب أن يتم تقييمها بعناية، حيث إنها تتداخل في تصميم العملية. بغض النظر عن العدد الواسع من الطرق الدعامات المتاحة، فليس من الممكن أن نخص بالذكر طريقة واحدة، ودعامة واحدة على أنها هي الأنسب لجميع المحفزات الحيوية والتطبيقات. ويجب اختيار الدعامة وطريقة التقييد بعين الاعتبار طبيعة وخصائص وسط التفاعل، المنتج، والمحفز الحيوي. فعلى سبيل المثال، تتسرب الإنزيمات المنخفضة الوزن الجزيئي بسهولة من الدعامات القائمة على الهلام؛ وإذا استخدمت أوساط التفاعل كبيرة الجزيئات في نظام التحويل الحيوي، فإن طريقة الانحباس ليست أيضاً خياراً جيداً؛ نظراً لقيود الانتشار القصوى؛ إذ إن أوساط التفاعل الكارهة للماء لا تنقسم إلى الدعامات المحبة للماء.

الجدول رقم (٣,٦). تأثير التقييد على حركية وخصائص المحفز الحيوي.

تأثيرات تشكيلية	تغيرات في التركيب الرباعي للإنزيمات عند الارتباط بناقل صلب؛ تغير طبيعة الإنزيم الناتجة من تأثير الكيماويات المستخدمة في طرق انحباس/ تغليف. تغيرات في علاقة درجة الحرارة بالنشاط، وفي الثبات الحراري والتشغيلي والتخزيني بالمقارنة مع الصورة الحرة الغير مقيدة.
تأثيرات فراغية	موانع ثلاثية الأبعاد والتي تحد من الوصول إلى وسط التفاعل.
تأثيرات تقسيمية	تحدث هذه عند شحن الناقل أو أن له طبيعة محبة/ كارهة للماء على العكس من بيئة الوسط. وينتج عنها تركيزات مختلفة من المركبات في كل جهة من السطح البيني. تغير في علاقة الأس الهيدروجيني بالنشاط. نفس الاستنتاج عند شحن المركبات المستخدمة أو لها طبيعة محبة/ كارهة للماء على العكس من الناقل.
تأثيرات نقل الكتلة	حيث إن وسط التفاعل يجب أن يهاجر من بيئة الوسط إلى الموقع النشط للمحفز الحيوي المقيد، تحدث مقاومة في نقل الكتلة الخارجي والداخلي (الانتشار)، الأخير يكون فقط في الدعامات المسامية. يمكن أن تقلل معدلات التدوير العالية من مقاومات نقل الكتلة الخارجي. تحدث مقاومة الانتشار خلال التفاعل، ولذلك يعتمد معدل التفاعل الكلي على تركيز وسط التفاعل والمسافة من سطح الدعامة الخارجية.
تأثيرات أخرى	تغيرات في التخصصية، ثوابت الحركية، الثبات الحراري والتشغيلي والتخزيني للمحفز الحيوي المقيد بالمقارنة مع الصورة الحرة غير المقيدة.

وعلاوةً على ذلك، فكل الطرق تقدم مزايا وسلبيات. فالادمصاص أو الامتزاز بسيط ورخيص وفعال ولكن في كثيرٍ من الأحيان يتم عكسه بسهولة بالتغيرات في درجة الأس الهيدروجيني، وأيونية المحلول أو الظروف

الهيدروديناميكية؛ وتضمن طرق التعلق والارتباط التساهمي تقييد قوي ودائم، مع ثبات طويل المدى، لكنها مكلفة وغالباً ما يقل نشاط الإنزيم بصورة كبيرة مع التقييد. وترتبط طرق الانحباس، والكبسلة الدقيقة، وحبس مفاعل الغشاء عادةً بمقاومات نقل كتلة كبيرة، ولاسيما الأولى، على الرغم من أنها طرق معتدلة جداً التي تؤثر بالكاد في النشاط الحفزي الجوهري. ويمكن تحويل مقاومات نقل الكتلة هذه إلى ميزة في مفاعلات الغشاء لتحويل أوساط التفاعل عالية الوزن الجزيئي أو غير القابلة للذوبان، مثل النشا، والسليولوز، والإنيولين، أو البروتينات، حيث يحتفظ الغشاء بها جنباً إلى جنبٍ مع المحفز الحيوي، الموجود في صورة ذائبة (الإنزيم) أو معلقة (الخلايا)، بينما يسمح للنواتج منخفضة الوزن الجزيئي بالخروج. ولذلك فاختيار ظروف التقييد الأكثر مناسبة لمحفز حيوي معين هي عملية محاولة وخطأ، تهدف إلى تحديد أفضل حل وسط من أجل الإبقاء على النشاط الحفزي والثبات التشغيلي.

(٦,٢,٢) بيئة التحويل الحيوي The Bioconversion Medium

بعد اقتصارها فقط على التطبيق في البيئات المائية المتجانسة، فقد أثبتت عمليات التحويل الحيوي كونها فعالة في وجود المذيبات العضوية (القابلة للامتزاج بالماء أو غير القابلة للامتزاج) [١٩، ٧٠]، والسوائل الأيونية [٧١، ٧٢]، والسوائل ذات درجات الحرارة فوق الحرجة [٧٣، ٧٤]، والمرحلة الغازية [٧٥]، والنظم المائية ذات المرحلتين [٧٦]، وفي البيئات السائلة-الصلبة (المساعدة بالراتنجات) [٢٢]. وعادةً ما تتم تسمية هذه المناهج بأنها "محفزات حيوية غير تقليدية". وهناك أمثلة توضيحية للتطبيقات الحديثة في الجدول رقم (٦,٤). والأسباب الرئيسة الكامنة وراء الحاجة إلى بيئات تحويل حيوي أخرى غير المائية هي القابلية الشحيحة للذوبان في الماء لمعظم أوساط التفاعل و/ أو النواتج في هذه البيئات، فضلاً عن الدور المحتمل السام أو المثبط لهذه المركبات على المحفز الحيوي، والذي يمكن خفضه إذا كان المحفز الحيوي والمركبات في مراحل مختلفة. في كلتا الحالتين، يمكن أن تتأثر الإنتاجية بشدة إذا تم التحويل الحيوي في بيئة مائية.

وفقاً لستراتهوف [٩٣]، فإنه في حالة المركبات ذات ذوبان مائي بين حوالي ٠,٠٠٠٣ و ١ مولار، فإنه تكون هناك حاجة إلى مرحلة ثانية للوصول إلى إنتاجية مقبولة. علاوةً على ذلك، فقد وجد أن تركيز وسط التفاعل ونقاء النواتج المتماثلة يرتبط عكسياً في عدة نظم تحويل حيوي، وعليه تخفض تركيز وسط التفاعل في بيئة التفاعل مما يعزز الانتقائية [٩٤]. ويمكن أن تستخدم مرحلة مساعدة ثانية كميزة، لتوفير تجمع للمركبات شحيحة الذوبان في المرحلة حيث يوجد المحفز الحيوي و/أو الحفاظ على تركيزها في مرحلة تحت المستويات السامة/ المثبطة.

obeikandl.com

الجدول رقم (٤ ,٦). بعض الأمثلة الحديثة لنظم التحويل الحيوي غير التقليدية.

المحفز الحيوي	النظام	المرجع
تجمعات إنزيم البنيسيلين أسيليز المرتبطة وإنزيم البنيسيلين أسيليز المرتبط على السطح الهلامي للبولي أكريلاميد	تخليق السيفاليكسين في بيئة الإيثيلين جليكول	[٧٧]
ألفا-أميليز والجلوكوأميليز	تحلل النشا في أنظمة البولي إيثيلين جليكول/ ديكستران المائية ثنائية المرحلة	[٧٨]
الليبيزات المغلفة في الهلاميات العضوية المعتمدة على المستحلبات الدقيقة	أسترة حمض اللاوريك و١-بروبانول في ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج	[٧٩]
إيشيريشيا القولون المؤتلفة المحتوية على الزايلين مونوأوكسيجينيز	أكسدة البسودوكومين إلى ٣,٤-داي ميثيل بنزالدهيد في (٢-إيثيل هيكسيل) فثالات: بيئة مائية صغرى	[٨٠]
الليبيز	تحليل أسترات الإيبوكسي إينول في محلول أس هيدروجيني:هيكسان	[٨١]
الليبيز المقيد	أسيلة النارينجين والروتين بفينيل البيوتيرات في السوائل الأيونية	[٨٢]
سكاروميسيس سيرفيسي	اختزال ٤-كلورو أسيتوأسيتات لينتج (س)-٤-كلورو-٣-هيدروكسي بيوتانوات في السوائل الأيونية	[٨٣]
الليبيز	الأسترة الاختيارية للنظائر الضوئية لـ (±)-مينتول في السوائل الأيونية والمذيبات العضوية	[٨٤]
الليبيز المقيد على ألياف الكربون	الأسترة الناقلة بين فينيل أسيتات و ن-بروبانول في المرحلة الغازية	[٨٥]
خلايا الرودوكوكس أريثروبولسي المجفدة	تحليل ١-كلوروبيوتان وحمض الهيدروكلوريك في المرحلة الغازية	[٨٦]
الليبيز	تخليق استرات كحول الأيزوأميل في ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج	[٨٧]
الليبيز المقيد والكيوتينيز المقيد	الأسترة الناقلة ل(ر، س)-٢-فينيل-١-بروبانول بفينيل البيوتيرات في البيئات فوق الحرجة، السوائل الأيونية والمذيبات العضوية	[٨٨]
سلالة إيشيريشيا القولون المعبرة بإفراط للسيكلوهيكسانون مونوأوكسيجينيز	أكسدة باير-فيليجر الغير متماثلة باستخدام تغذية وسط التفاعل في الموقع وإزالة المنتج براتنج دويكس أوبتيبور ل-٤٩٣	[٨٩]
سلالة مايكوباكتريوم NRRL B3805	انشقاق السلسلة الجانبية للسيتوستيرول في محلول الأس الهيدروجيني ديوكتيل فثالات: تريس هيدروكلوريك	[٩٠]
الليبيز	الأسيلة المختارة للجليكوزيدات في الشوائل الأيونية	[٩١]
إيشيريشيا القولون المؤتلفة	نزع مجموعة الأسيل من البنيسيلين ج لحمض ٦-الأمينوبينيسلانيك في البولي إيثيلين جليكول/ فوسفات البوتاسيوم	[٩٢]

obeikandl.com

(١, ٢, ٢, ٦) المذيبات العضوية Organic Solvents

يعد استخدام المذيبات العضوية في بيئة التحويل الحيوي إلى حدٍ بعيد من أقدم البدائل للنظم المائية النقية [٩٥-٩٧]، ولكن تم تأسيس هذا النهج فقط في أوائل تسعينيات القرن الماضي [٩٨]. ومزايا هذا النهج وعيوبه مؤكدة (الجدول رقم ٥, ٦).

ويمكن لنظم التحويل الحيوي المحتوية على المذيبات العضوية أن تكون إما متجانسة وإما غير متجانسة، وهذا يتوقف على ما إذا كانت المذيبات المستخدمة قابلة للامتزاج بالماء (على سبيل المثال، الأسيتونيتريل، سلفوكسيد ثنائي الميثيل، وجلايكول الإثيلين، الجلسرين، والميثانول، البروبيلين جلايكول) أو غير قابلة للإمتزاج بالماء (أثير ثنائي الأيزوبروبيل، خلات الإيثيل، أثير الميثيل-تي-بوتيل، أوكتان، ن-أوكتانول والتولوين). وتفضل النظم الأخيرة تكامل العملية؛ نظراً لأنها تسمح باسترداد المنتج مباشرة وتوفر تجمع لأوساط التفاعل/ المنتجات السامة أو المثبطة، حيث إنه توجد فقط كميات ضئيلة منها المرحلة المائية. كما أنها أيضاً تمكن الحفز البيني من خلال إتاحة سطح بيني مائي-عضوي، والذي يكون مطلوباً لبعض الإنزيمات لإظهار النشاط المطلوب (التنشيط البيني)؛ وذلك نتيجة للتغيرات التشكيلية عند الإدمصاص أو الامتزاز على السطح البيني المعين [٩٣، ٩٩، ١٠٠].

الجدول رقم (٦, ٥). مميزات وعيوب استخدام المذيبات العضوية في بيئات التحويل الحيوي.

المميزات	تحسين الذوبان لأوساط التفاعل والنواتج غير القطبية، زيادة إنتاجية الحيز/ الوقت وكذلك الإنتاجية الحجمية عكس التوازن الحراري الديناميكي، مفضلاً التخليق على التحلل. يتيح التفاعلات غير المفضلة في البيئات المائية (على سبيل المثال: الأسترة الناقلة، أسترة مجموعة الثيو، تحلل مجموعة الحمض الأميني) يمكن عكس انتقائية المتشابهات اعتماداً على المذيب العضوي يتم تجنب التفاعلات الجانبية المعتمدة على الماء الغير مرغوبة يتم تقليل التلوث الميكروبي ثبات الإنزيم في البيئة قليلة الماء
العيوب	تغير طبيعة المحفز الحيوي و/ أو تثبيطه بالمذيبات العضوية زيادة تعقيد النظام عوائق تقسيمية وعوائق نقل الكتلة (في النظم العضوية-السائلة ذات المرحلتين السائلتين) التثبيط البيني للإنزيمات (في النظم العضوية-السائلة ذات المرحلتين السائلتين)

ويمكن تقسيم النظم غير المتجانسة أكثر إلى نظم غير متجانسة دقيقة وكبيرة. ويلاحظ في النظم غير المتجانسة الدقيقة فصل المراحل فقط على النطاق المجهري، كما في حالة المذيلات العكسية، في حين أنه في النظم غير المتجانسة يوجد فصل واضح بين المراحل، كما يحدث في النظم ذات المرحلتين السائلتين، أو النظم التي تستخدم الإنزيمات المسحوقة أو المقيدة.

ويمكن إرجاع سمية المذيبات العضوية، وهي مشكلة رئيسة مرتبطة باستخدامها في نظم التحويل الحيوي، إلى التفاعلات مع المجموعات غير القطبية للإنزيم والتعطيل النهائي للتفاعلات الكارهة للماء، والتنافس مع جزيء البروتين على الماء الأساسي المطلوب من قبل هذا الأخير للتشكيل السليم لسلسلة البولي بيبتيد. ويمكن للمذيبات في نهاية المطاف أن تنزع مثل طبقة المياه الأساسية هذه. وعندما تستخدم الخلايا الكاملة، يمكن أن يعزى التأثير الضار للمذيب إلى تراكمه في الغشاء السيتوبلازمي، مغيراً من تركيبه ومانعاً الخلية من القيام بمهامها الرئيسة، مثل تبديد درجة الحموضة والجهد الكهربائي ومثبطاً لوظائف بروتين الغشاء، مما يؤدي في نهاية المطاف إلى تحلل الخلايا وموتها [١٠١].

يجب أن تؤخذ عدة جوانب في الاعتبار عند التفاعل بين المذيب، ووسط التفاعل، والناتج، والمحفز الحيوي. يجب أن يتوافق المذيب المناسب حيوياً مع المحفز الحيوي، وأن يظهر تجاذب عالٍ مع أوساط التفاعل و/ أو النواتج، وأن يكون رخيصاً، وغير قابل للتحلل الحيوي، وغير سام للإنسان، وله درجة غليان عالية نسبياً (تفضيلياً أقل من الماء)، ويكون قليل التطاير. وينبغي أيضاً أن يؤخذ في الاعتبار أن المذيب العضوي قد يؤثر على انتقائية المحفز الحيوي. وقد بذلت جهود واسعة النطاق للتنبؤ بالتوافق الحيوي للمذيب على أساس الخصائص الفيزيائية للمذيب. ومعامل هانش (لوغاريتم P_{oct} أو قيمة π)، أي لوغاريتم معامل التقسيم في نظام قياسي ذي مرحلتين من أوكتانول-ماء، هو المعيار الأكثر استخداماً لتوقع التوافق الحيوي. وهو يقترح أنه كلما زاد اللوغاريتم P_{oct} كلما كان المذيب أكثر توافقاً حيوياً؛ ومعظم الخلايا الكاملة متوافقة فقط مع المذيبات ذات لوغاريتم P_{oct} أعلى من ٤. ومع ذلك، فهي بعيدة عن كونها مضمونة [٩٣].

ويمكن إرجاع محدودية مثل هذا النموذج التنبؤي إلى الآليات التي تشمل تفاعلات المحفز الحيوي/ المذيب، والتي تكون معقدة للغاية بالنسبة للتوافق الحيوي للمذيب بحيث يمكن التنبؤ بها بواسطة معيار فيزيائي واحد [١٠٢، ١٠٣]. ويجب اختيار الظروف الهيدروديناميكية المناسبة وقيم نسبة حجم المرحلة عند تصميم نظام التحويل الحيوي، من أجل تعزيز نقل الكتلة ومن ثم زيادة معدل التفاعل الكلي. ويجب أعطاء عناية خاصة لتفادي استحلاب بيئة التفاعل، مما يحد من نقل الكتلة. علاوةً على ذلك، قد تكون المفاعلات ذات احتياطات السلامة الإضافية، أي مبدأ الحماية من الانفجار، مطلوبة [١٠٤].

obeikandi.com

(٢, ٢, ٢, ٦) السوائل الأيونية Ionic Liquids

نظراً للضغوط المتزايدة من المنظمات الحكومية والكيانات التنظيمية والمنظمات غير الحكومية، والرأي العام من أجل حماية البيئة، فإن هناك اتجاهاً لتطوير مذيبات بديلة مناسبة والتقنيات التي يمكن أن تحل محل المذيبات العضوية التي تعدُّ مسؤولة عن إنتاج النفايات الخطرة. والسوائل الأيونية هي أملاح تكون في حالة سائلة في درجة حرارة غرفة، وعلى عكس المذيبات العضوية، فإنها عملياً ليس لديها أي ضغط بخاري، وتوفر إمكانية تطوير العمليات الخضراء النظيفة. وكما هو الحال مع المذيبات العضوية، توجد سوائل أيونية قابلة/ وغير قابلة للامتزاج بالماء.

يمكن تكييف الخصائص الفيزيائية للسوائل الأيونية، مثل الكثافة، وطبيعة التفاعل مع الماء، ودرجة الذوبان، واللزوجة؛ وذلك لتلبية متطلبات نظام التحويل الحيوي عن طريق تغيير طبيعة الأنيونات والكاتيونات. والسوائل الأيونية لديها علاوةً على ذلك ثبات حراري وتخزيني مرتفعين، والقدرة على إذابة مجموعة واسعة من المركبات، من غير العضوي إلى العضوي، والبوليمرية، وهي أيضاً غير تفاعلية، ويمكن أن تستخدم في تفاعلات انتقائية المتشابهات وانتقائية المجسمات [٧٢].

وتحتفظ إنزيمات الهيدروليزات، مثل البروتييز والليبزات، والأوكسيدوريداكتيزات، والديهيدروجينيزات بنشاطها الحفزي في وجود السوائل الأيونية، ويبدو أن جميع الإنزيمات التي تعمل في المذيبات العضوية تعمل أيضاً في السوائل الأيونية. وقد تبين أن استخدام السوائل الأيونية يزيد من النشاط الإنزيمي، والثبات، وانتقائية المتشابهات والمجسمات بالمقارنة مع استخدام المذيبات العضوية، ولكن هذا الاتجاه ليس مطلقاً [٩١، ٩٤، ١٠٥]. فقد وجد أن جميع السوائل الأيونية ليست مناسبة للتحفيز الحيوي. فالإنزيمات تميل إلى الاحتفاظ بالنشاط الحفزي في السوائل الأيونية التي تحتوي على فوسفات ثنائي الميثيل، بورات رباعي الفلور (كلاً يذوب في الماء)، بيس-ميثيل ثلاثي الفلور-أميد السلفونيل، فوسفات سداسية الفلور (كلاً لا يذوب في الماء)، ولكن ليس في السوائل الأيونية التي تحتوي على الكلور، والنترات، وسلفيد الكربون ثلاثي الفلور، أو أنيونات الخلات [١٠٦، ١٠٧]. كما وجد أن الخلايا الكاملة أيضاً تحتفظ بنشاطها في السوائل الأيونية التي تحتوي على بيس-ميثيل ثلاثي الفلور-أميد السلفونيل، فوسفات سداسية الفلور [٨٣]. ومع ذلك، فإن استخدام السوائل الأيونية في التحويلات الحيوية بالخلايا الكاملة يكون أقل انتشاراً منه في التحفيز الحيوي الإنزيمي.

عند اختيار سائل أيوني مناسب للتطبيق في نظام تحويل حيوي، لابد من مراعاة بعض القضايا. ينبغي أن يكون السائل الأيوني متاحاً خالياً من الشوائب التي قد تعرقل العملية، وغير مسبب للتآكل، وغير سام، ومتوافق حيوياً. وعلاوة على ذلك، يجب أن تكون الأساليب المناسبة لعزل المنتج، مثل التقطير، وثاني أكسيد الكربون فوق الحرج، والفصل اللوني بالعمود، أو الاستخلاص قابلة للتطبيق. ونظراً لتكلفة السوائل الأيونية، التي يمكن أن

تكون أكبر بضعفين من المذيبات العضوية الشائعة، فإن جدوى استخدام السوائل الأيونية على نطاقٍ واسع تعتمد بقوة على الاسترداد الفعال للسائل الأيوني وإعادة استخدامه [١٠٥]. ومن أجل أن يستخدم بفعالية، يجب أن يذيب السائل الأيوني المركبات الموجودة بما لا يقل عن ما يصل إلى عدة مئات من الميللي مولار، ويجب أن يكون معامل التوزيع لوسائط التفاعل والنواتج بين السوائل الأيونية ومحلول الأس الهيدروجيني أعلى من ٢,٠، وذلك من أجل كفاءة الاستخلاص، وخفض تركيزها في المرحلة المائية، وبالتالي السمية [٨٣].

(٦,٢,٢,٣) النظم المائية ذات المرحلتين Two-Phase Aqueous Systems

تتكون النظم المائية ذات المرحلتين من محلولين اثنين من البوليمرات غير المتوافقة، على سبيل المثال البولي إيثيلين جلايكول والدكستران، أو محلول بوليمر يذوب في الماء مع محلول آخر من الملح، مثل محلول الفوسفات المنظم أو كبريتات المغنيسيوم، مع توتر بيني منخفض بين المرحلتين. وتوفر هذه النظم بيئة معتدلة نسبياً للمحفزات الحيوية ومناسبة بصفة خاصة لاستخلاص المنتجات المحبة للماء [٧٦]. وتقع المشكلات الرئيسة في تصميم نظم التحويل الحيوي المائية ذات المرحلتين بسبب عدم وجود نماذج مناسبة للتنبؤ بنشاط المحفز الحيوي، فضلاً عن تقسيم المحفز الحيوي والناتج، وقد أعيق تنفيذها على النطاق الواسع بالتكلفة المرتفعة للعديد من البوليمرات المستخدمة؛ بسبب مستويات نقائها. وإذا كانت رخيصة، فيمكن استخدام البوليمرات الأقل نقاءً بدون انخفاض كبير في الإنتاجية، وقد تقدم النظم المائية ذات المرحلتين بديلاً مثيراً للاهتمام لنظم التحويل الحيوي المحتوية على مركبات محبة للماء [٧٨].

(٦,٢,٢,٤) الراتنجات الصلبة Solid Resins

تضاف الراتنجات ذات مساحة السطح الكبيرة إلى بيئات التحويل الحيوي للتغلب على القيود المرتبطة بتثبيط الناتج من خلال استرداد الناتج في الموقع [٩٤]، أو لتجنب استخلاص السائل-السائل من بيئات التحويل الحيوي ذات الخلايا الكاملة [١٠٨]، حيث يتم نقل الناتج إلى الراتنج عند تكوينه. ويمكن أيضاً أن تستخدم الراتنجات لتسليم وسط التفاعل، الأمر الذي يتطلب التشبع السابق للراتنج بوسط التفاعل، وذلك قبل تحضينه في بيئة التحويل الحيوي التي يتم تسليمه إليها. ويمكن أيضاً أن توفر الراتنجات تغذية وسط التفاعل في الموقع واسترداد الناتج [٨٩].

ويشبه المفهوم الكامن وراء النظم القائمة على الراتنج ذلك في النظم المائية ذات المرحلتين، لكنه يتجنب الآثار الضارة على المحفز الحيوي التي تظهر في كثيرٍ من الأحيان عند استخدام المذيبات العضوية (أو السوائل

obeikandi.com

الأيونية)، على الرغم من أن تحميل الراتنج العالي قد يؤدي إلى أضرار لا رجعة فيها للمحفز الحيوي [٩٤]. وعند اختيار مرحلة صلبة مناسبة، يجب أن تعطي عناية خاصة إلى انجذاب وسط التفاعل، الناتج، والمحفز الحيوي نحو الراتنج. فقد يؤدي الإفراط في ارتباط وسط التفاعل بالراتنج إلى انخفاض توافره الحيوي لها في المرحلة المائية. ويجب أيضاً تجنب امتزاز المحفز الحيوي على المرحلة الصلبة.

(٦,٢,٢,٥) نظم الغاز–الصلبة Solid-Gas Systems

تقدم نظم الغاز الصلبة الكثير من المزايا على النظم القائمة على السوائل، وهي نقل الكتلة المحسن؛ نتيجة ارتفاع معاملات الانتشار واللزوجة المنخفضة للغازات، والذوبان المحسن لأوساط التفاعل والنواتج، وفي نهاية المطاف التخلص من استخدام المذيبات، وكذلك التقليل من وجود التلوث الميكروبي؛ نتيجة درجات الحرارة المرتفعة نسبياً المستخدمة (على سبيل المثال، ٤٥ إلى ٨٥ درجة مئوية)، وانخفاض مخاطر تكوين المنتجات الثانوية، والطرق المبسطة للتقييد، وسهولة استرداد النواتج (وأوساط التفاعل غير المتفاعلة) عن طريق التكثيف والحد من التدمير الحراري، نظراً لحالة المحفز الحيوي الجافة جزئياً [٨٥، ١٠٩]. بالإضافة إلى ذلك، فإن هذه النظم توفر معلومات مفيدة عن التفاعلات بين المحفزات الحيوية وبيئاتها الدقيقة، والتأثير المصاحب على النشاط والثبات الحفزي، حيث إن الأنشطة الحرارية الديناميكية لمختلف الأنواع يمكن تثبيتها بصورة مستقلة [١٠٩].

وتشمل الملامح الرئيسة في تصميم النظام إستراتيجية لتكوين مرحلة غازية، وضغط العمل المطلق، والنشاط الحراري الديناميكي للماء.

(٦,٢,٢,٦) السوائل فوق الحرجة Supercritical Fluids

يمكن ربط الاهتمام باستخدام السوائل الحرجة (SCFs) بتزايد الاهتمامات البيئية مع كمية النفايات الناتجة عن الصناعة الكيميائية، ومعظمها مذيبات عضوية ونواتج ثانوية. تقدم السوائل الحرجة أيضاً مزايا فيما يتعلق بنقل الكتلة، حيث تكون انتشارية أوساط التفاعل والنواتج عالية، وتكون لزوجة بيئة التحويل الحيوي منخفضة، ويتم خفض قيود نقل الكتلة الداخلية والتي غالباً ما تكون عنق الزجاجة في التحويلات الحيوية غير المتجانسة؛ بسبب الانتشارية العالية للسوائل الحرجة.

والسائل الحرج الأكثر استخداماً في التحويلات الحيوية، ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج، هو غير مسرطن، وغير سام، وغير مطفر، وغير قابل للاشتعال، وثابت حرارياً، وعليه يقدم منافع واضحة متعلقة بالصحة والسلامة. كما أنه أيضاً صديق للبيئة ويمكن إعادة تدويره. ومع ذلك، فإن طبيعته غير القطبية تفضل عادةً تطبيق

ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج عند استخدام مركبات كارهة للماء. وقد أدت الجهود البحثية الأخيرة إلى تطوير المواد المقللة للتوتر السطحي التي تسمح بإذابة كلٍ من الكيماويات المحبة والكارهة للماء، والتي قد توسع من نطاق تطبيقات ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج في التحويلات الحيوية [٧٤].

وتفتقر السوائل الحرجة الأخرى المستخدمة في التحفيز الحيوي، مثل الإيثان فوق الحرج [٨٨]، والبروبان فوق الحرج، والبيوتان فوق الحرج [٧٣، ١١٠] إلى الطابع "الأخضر" [٧٤]. ومن ناحيةٍ أخرى، فإن الماء لديه انجذاب لهذه السوائل أقل من ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج، ومن ثم يقل خطر إزالتها للماء الضروري من جزيئ الإنزيم [٧٣].

وعند تصميم نظام تحويل حيوي على استخدام هذه الغازات الكثيفة، فإنه يجب التصدي لعدة قضايا رئيسة. وتشمل هذه اختيار المذيب، جنباً إلـى جنبٍ مع العوامل التي تؤثر على النشاط/ الثبات الإنزيمي، والتي تكون فـي هذه النظم المعينة الضغط، وزيادة الضغط/ خفض الضغط، والنشاط المائي. ويجب القيام بمثل هذا التقييم فـي البحوث التجريبية، حيث إنه حالياً يكاد يكون من المستحيل توقع نشاط/ ثبات المحفز الحيوي في وجود السوائل الحرجة.

(٦,٣) المفاعلات الحيوية Bioreactors

تتم عادةً التحويلات الحيوية في المفاعلات الكيميائية الأساسية، التي تعمل بنظام الدفعة، والتغذية المستمرة، أو التغذية على دفعات. ويعد النظام الأخير بديل مناسب لاستخدام مرحلة ثانية مساعدة عندما يكون وسط التفاعل سام/ مثبط فوق تركيز معين و/ أو شحيح الذوبان في المرحلة المائية. وتتطلب تحكماً دقيقاً حيث يمكن حدوث قيود لوسط التفاعل [١١١]. ومفاعلات نظام الدفعة هي الأكثر شيوعاً (ولكن ليس حصراً) عند وجود المحفزات الحيوية الحرة. وإذا تم استخدام المحفزات الحيوية المقيدة في هذا النمط من العمليات، وإذا كان من الضروري إعادة استخدامها، فإن فصل واسترداد المحفز الحيوي يكون إلزامياً، والذي قد يجلب فقدان لكتلة المحفز الحيوي، فضلاً عن فقدان النشاط.

(٦,٣,١) مفاعلات الدفعة الواحدة Batch Reactors

على الرغم من أنه يشيع استخدام مفاعلات التقليب لإعطاء نمط خلط مثالي تقريباً وتجنب تدرجات التركيز (وخاصة في درجة الحموضة) ودرجة الحرارة، فإن جزيئات دعامة التقييد غالباً ما تكون حساسة للإجهاد. وهذا يعني أنه ينبغي استخدام المستحضرات المتينة فقط من المحفزات الحيوية في مفاعلات التقليب. والبديل عن

ذلك هو ما يعرف بمفاعل السلة، حيث يتم الاحتفاظ بجسيمات المحفز الحيوي المقيدة في سلة مشكلةً إما شفرات التقليب أو صدادات المفاعل. وثمة نهج أكثر شيوعاً يعتمد على نمط تدفق القابس. ويعمل نوع مفاعل تدفق القابس الذي قد يكون مفاعل الوسادة المعبأة أو المتخلخلة في وضع التدوير الإجمالي؛ وتكون هناك حاجة لذلك إذا أعطت دورة واحدة إنتاجية تحويل منخفضة. وتكون هذه الميزة أيضاً مفيدة بشكلٍ خاص للحصول على البيانات الحركية، حيث يمكن اعتبار المفاعل كمفاعل تفريقي. وعلاوةً على ذلك، يمكن بسهولة تقليل مقاومات نقل الكتلة الخارجية عن طريق التشغيل تحت معدلات تدفق عالية.

(٦,٣,٢) مفاعلات التغذية على دفعات Fed-Batch Reactors

في مفاعلات التغذية على دفعات تضاف مكونات المواد المتفاعلة/ البيئة بشكلٍ مستمر أو في شكل نبضات أو دفعات. يجب أن تعطى عناية خاصة لتأثير التغذية على حجم التفاعل، وبشكلٍ رئيس على الحالة الهيدروديناميكية وعلى مساحة سطح المفاعل الأولية؛ وذلك لتجنب فيضان بيئة المفاعل. رقابة ونمذجة العملية أكثر تعقيداً من طرق التشغيل الأخرى، والبحوث في هذا المجال خاصة المكرسة للمفاعلات الحيوية الإنزيمية نادرة [١١٢].

(٦,٣,٣) مفاعلات التغذية المستمرة Continuous Reactors

التشغيل المستمر للمحفزات الحيوية المقيدة له بعض المزايا عند المقارنة بغيرها من طرق التشغيل، وهي سهولة التحكم الآلي، وسهولة التشغيل، ومراقبة جودة المنتجات. ويمكن تقسيم المفاعلات المستمرة إلى نوعين: مفاعل خزان التقليب مستمر التغذية (CSTR) ومفاعل تدفق القابس (PFR). يتحقق التقليب الكامل في مفاعل خزان التقليب مستمر التغذية المثالي، وعليه لا تعتمد درجة التحويل على الموضع في الوعاء، وتكون الظروف في داخل المفاعل هي نفسها الموجودة في التيار الخارج، أي تركيزات منخفضة لوسط التفاعل وعالية من المنتج. وفي مفاعل تدفق القابس المثالي يعتمد عائد التحويل على طول الوعاء. إلا أن مفاعل تدفق القابس لا يحتوي على أجهزة تقليب وبذلك تتفاوت الظروف داخل المفاعل، عادةً مع تدرجات درجة الحرارة والسرعة والتركيز التي تكون في نفس اتجاه التدفق، وهذا ليس مثالياً.

وينبغي أن يأخذ الاختيار بين هذين النوعين بعين الاعتبار الخصائص الحركية والتشغيلية. وهكذا، من ناحية حركية ميكايليس–مينتن، فإنه يفضل مفاعل تدفق القابس على مفاعل خزان التقليب مستمر التغذية؛ لأنه يتطلب محفزاً حيوياً أقل للوصول إلى نفس عائد التحويل. ونظراً لخصائص مفاعل تدفق القابس ومفاعل خزان

التقليب مستمر التغذية، فإن الأول يفضل للأنظمة ذات تثبيط المنتج، في حين ينبغي استخدام الأخير للأنظمة ذات تثبيط وسط التفاعل. ومع ذلك، إذا كان التحكم في درجة الحموضة مطلوباً، فلا ينصح باستخدام مفاعل تدفق القابس.

ويجب أن تعطى عناية خاصة لأبعاد المحفز الحيوي المقيد؛ فقد تؤدي الجسيمات إلى انخفاض كبير في الضغط، فضلاً عن الانسداد (انظر الجدول رقم ٥ , ٦).

ويمكن استخدام مفاعل الوسادة المتخلخلة (FBR) الذي له نمط تقليب متوسط لمفاعل خزان التقليب مستمر التغذية ومفاعل تدفق القابس المثالي، مع انخفاض الضغط الصغير. كما يمكن معالجة أوساط التفاعل غير الذائبة وعالية اللزوجة بصورة أفضل في مفاعل الوسادة المتخلخلة أو مفاعل خزان التقليب مستمر التغذية.

إن اختيار الـمفاعل المناسب ليس مهمة واضحة، وهذا يتطلب معرفة شاملة بمتطلبات نظام التحويل الحيوي المعين.

(٤ , ٦) ترشيد وتسريع تطوير وتوصيف عملية التحويل الحيوي

Rationalizing and Speeding up the Development and Characterization of a Bioconversion Process

إن نظم التحويل الحيوي معقدة جداً وتعتمد على مجموعةٍ واسعة من المتغيرات. وعليه، فإنه هناك حاجة إلى تطوير إستراتيجيات التخطيط الرشيد لتأسيس تخطيط رشيد تجريبي، إضافةً إلى الطرق السريعة والموثوق بها التي تسمح بتقييم الميزات ذات الصلة، وتوصيف النظام، لتعزيز وتيرة تنمية العملية. وتساهم الجهود المتفانية والتقنيات الحديثة جداً في جعل هذا الهدف حقيقة واقعة، من خلال الاستفادة بالتطورات في العلوم الحاسوبية والنظم والمكونات المنمنمة.

(١ , ٤ , ٦) الطرق الحسابية Computational Methods

توفر التطورات في العلوم الحاسوبية الأدوات التي تسمح بتنمية المبادئ التوجيهية لتخطيط تجريبي عقلاني، والسماح بذلك بتوفير الوقت والموارد. إن النمذجة الجزيئية والكيمومتريات هما مجالان حسابيان يكمل كل منهما الآخر، وعند اجتماعهما، يساهما على نحوٍ حاسم في تطوير نماذج التنبؤ. يمكن في النمذجة الجزيئية بناء نماذج تخيلية تسمح بفهم أفضل لتفاعلات الإنزيم مع وسط التفاعل. وتستند في معظمها على حساب الطاقة الحرة للتفاعل التي يتم الحصول عليها من محاكاة المرحلة الانتقالية للتفاعل. وعادةً ما يتم إجراء ذلك من خلال حسابات الميكانيكا الجزيئية، والتي تكون غير قادرة على توفير التوقعات الدقيقة. من ناحية أخرى فإن هذه الحسابات ليست مطالبة حسابياً وتقدم نتائج سريعة نسبياً. ولا تزال طرق ميكانيكا الكم معقدة للغاية ومطالبة حسابياً

لاستخدامها. ويعامل المنهج الوسيط بينهما الموقع النشط ووسط التفاعل على مستوى ميكانيكا الكم والنظام المتبقي على مستوى الميكانيكا الجزيئية، ولكن حتى هذا يمكن أيضاً أن يكون مطالباً حسابياً.

وتستخدم عادة تقنيات النمذجة الجزيئية لتوصيف تفاعلات الإنزيم مع وسط التفاعل، ويجري تطبيقها في التنبؤ بانتقائية الإنزيمات للمتشابهات [١١٣]. وتمكن الكيمومترات من ربط القياسات لنظام/ عملية كيميائي بحالة النظام من خلال سلسلة من الطرق الرياضية، التي تضم التحليل الإحصائي متعدد المتغيرات وتصميم التجارب. ويوفر هذا الأخير أداة لا تقدر بثمن لدراسة متغيرات متعددة في وقتٍ واحد وتحديد الظروف التجريبية المثلي، في حين أن السابق يمكن من تفسير البيانات الواردة في الأنظمة المعقدة التي تحتوي على عددٍ كبير من المتغيرات، عن طريق الحد من أبعادها [١١٤].

ويكون الجمع بين الطريقتين مفيد بشكلٍ خاص في تطوير نماذج التنبؤ، أي لإقامة معادلات أو معاملات تجريبية. وقد استخدم هذا النهج المزدوج بنجاحٍ في تعريف مجموعات الأحماض الأمينية الطرفية المسؤولة عن الانتقائية عند مقارنة أميدات البنسيلين-ج من مصادر مختلفة [١١٥، ١١٦].

(٢, ٤, ٦) طرق المعالجة دقيقة المقياس Microscale Processing Methods

يعتمد هذا النهج، على استخدام مفاعلات حيوية مصغرة ذات أحجام أقل من ١٠٠ مل، بالإضافة إلى تقنيات تحليل وأدوات قادرة على التعامل مع عدد واسع من العينات في وقتٍ قصير، وتتيح عملية الموازاة والتشغيل الآلي، وخفض التكاليف، سواءً في الموارد البشرية والمادية للمحاولات التجريبية. تشمل مثل هذه المفاعلات الحيوية المصغرة الأوعية المهتزة، مثل الدوارق المهتزة، وأنابيب الاختبار، والأطباق دقيقة المستوى، ذات أحجام وتصميمات مختلفة، وكذلك مفاعلات التقليب الحيوية المصغرة ومفاعلات الأغشية. وقد سهلت التطورات التقنية إمكانية رصد ومراقبة درجة الحموضة وتوتر الأكسجين المذاب مباشرة (على الأقل في بعض الحالات، وبعضها يشمل أيضاً التحكم بمعدل تدفق الهواء)، والتي تعزز من إمكانات هذه الأجهزة [١١٧-١١٩].

يتم حالياً استخدام المفاعلات الحيوية المصغرة في تطبيقاتٍ عدة، بما في ذلك التعديل الوراثي المبكر أو تقييم السلالات الأصلية للكائنات، وتحسين السلالة، وتطوير بيئة النمو/ التحويل الحيوي [١١٨]. يجب أن توضع عناية خاصة للتأكد من أن الظروف التشغيلية هي تلك التي لا تخفي النتائج [١٢٠]. على سبيل المثال، إذا تم عن غير قصد العمل بالأوكسجين كوسط تفاعل محدد خلال تقييم تأثير تركيب البيئة على النشاط الحفزي، فإن نتائج مجموعة من التجارب يمكن أن تكون وهمية [١٢١]. ويصبح تكرار النتائج وزيادة المستوى من الأهمية

obeikandi.com

بمكان عند استخدام المفاعلات الحيوية المصغرة فـي المراحل المتأخرة لتطوير العملية. ويجب في مثل هذه الحالات أن يتم التحقق ما إذا كانت طرق قاعدة "الإبهام" التي تستخدم عادةً في الصناعة لزيادة المستوى من نطاق المعمل إلى نطاق الإنتاج قابلة للتطبيق. وتستند هذه الأساليب على معايير مختلفة، بما فـي ذلك المعامل الحجمي لانتقال كتلة الأكسجين (k_La)، واستهلاك الطاقة لكل وحدة حجم، وسرعة طرف المقلب، وثبات توتر الأكسجين المذاب، أو زمن الخلط. على الرغم من أخذ k_La واستهلاك الطاقة لكل وحدة حجم كمرجع، كما تم بصورةٍ متزامنة إحراز تقدم فـي تنمية الارتباط التجريبي للتنبؤ بمثل هذه العوامل [١٢٢، ١٢٣]، إلا أن تنوع العوامل يظهر أنه لا يوجد معيار واحد، وعلاوةً علـى ذلك ليست جميع النظم الـمصغرة مؤهلة للامتثال لجميع المعايير لزيادة المستوى [١١٨، ١١٩].

(٦,٥) ملاحظات ختامية Concluding Remarks

هدف هذا الفصل إلى توفير منظور شامل للتحفيز الحيوي التطبيقي، مع التركيز الخاص على القضايا التي ينبغي التصدي لها عند تصور نظام تحويل حيوي معين، والمعايير ذات الصلة التي يجب النظر فيها لأفضل اختيار يتم استخدامه خلال المراحل المختلفة لمثل هذه العملية. تم توفير بعض المبادئ التوجيهية العامة التي تساعد في التصميم العام لنظام التحويل الحيوي، ولكن أشير إلى أنه لا توجد معايير عالمية، لذلك يحتاج كل نظام إلى اهتمام مفصل، وذلك بالنظر إلى المتطلبات الجوهرية. وقد عززت التطورات التقنية الحديثة من إمكانات مصمم المحفزات الحيوية، متيحةً التحول في نموذج تصميم نظم التحويل الحيوي من استخدام محفزات حيوية ذات خصائص موجهة لقيود التفاعل إلى تكييف الأول حسب متطلبات هذا الأخير. وتزيد قدرة المحفزات الحيوية على العمل في بيئات أخرى غير المائية من استخدام البيئات المحسنة للإنتاجية البديلة.

تحبذ المخاوف البيئية المتنامية تطوير وتنفيذ عمليات التحويل الحيوي "الخضراء"، باستخدام البيئات غير السامة الخالية من المذيبات العضوية (السوائل فوق الحرجة، والمذيبات الأيونية، والمرحلة الغازية). وهناك حاجة إلى العمل الواسع في مجال تطوير النماذج التنبؤية لتوقع السلوك في مثل هذه البيئات. وأيضاً تزداد القدرة التنافسية لنظم التحويل الحيوي ضد العمليات القائمة على الكيماويات، حيث إن إطار الوقت والموارد اللازمة لخطوات التنمية للعمليات القائمة على المحفز الحيوي تنخفض بشكلٍ حاد مع استخدام النظم المصغرة القادرة على تقييم وتحليل عدد كبير من المتغيرات في وقتٍ واحد وبسرعة. ويساعد الدمج بين النمذجة الجزيئية والتطورات في العلوم الحسابية على خفض التكاليف والوقت اللازمين لتطوير النماذج، والحد من عدد محاولات التجارب المطلوبة وتوفير أساس رشيد لهندسة المحفزات الحيوية. وتبرز كل هذه الميزات بشكلٍ واضح الاتجاهات الحالية من

obeikandi.com

أجل إرساء أساس أكثر عقلانية في تصميم وتطوير نظم التحويل الحيوي، وتطوير أسرع وأكثر موثوقية لأدوات الفحص وتعزيز التكامل بين مجالات المعرفة المكملة (الهندسة، وعلم الاحياء، والكيمياء، والرياضيات، وعلوم الحاسب) من أجل مزيد من تطوير العملية.

شكر وتقدير Acknowledgments

يشكر ب. فيرنانديز مؤسسة العلوم والتكنولوجيا، البرتغال، للعقد في إطار برنامج العلوم عام ٢٠٠٧م.

المراجع References

[١] Rozzell, J.D. (1999) *Bioorg. Med. Chem.*, **7,** 2253–2261.
[٢] Leresche, J.E. and Meyer, H.-P. (2006) *Org. Proc. Res. Develop.*, **10,** 572–580.
[٣] Panke, S. and Wubbolts, M. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13,** 111–116.
[٤] Parales, R.E., Bruce, N.C., Schmid, A., and Wackett, L.P. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.*, **68,** 4699–4709.
[٥] Schmid, A., Hollmann, F., Byung Park, J., and Bühler, B. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13,** 359–366.
[٦] Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005) *Biotechnol. Adv.*, **23,** 471–499.
[٧] Panke, S. and Wubbolts, M. (2005) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9,** 188–194.
[٨] Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J., and Ballesteros, A. (2006) *Trends Biotechnol.*, **24,** 281–287.
[٩] Fernandes, P. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73,** 291–296.
[١٠] Burton, S.G., Cowan, D.A., and Woodley, J.M. (2002) *Nat. Biotechnol.*,**20,** 37–45.
[١١] Rasor, J.P. and Voss, E. (2001) *Appl. Catal. A Gen.*, **221,** 145–158.
[١٢] Robertson, D.E. and Steer, B.A. (2004) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8,** 141–149.
[١٣] Bommarius, A.S. and Polizzi, K.M. (2006) *Chem. Eng. Sci.*, **61,** 1004–1016.
[١٤] Hult, K. and Berglund, P. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 395–400.
[١٥] Hibbert, E.G., Baganz, F., Hailes, H.C., Ward, J.M., Lye, G.J., Woodley, J.M., and Dalby, P.A. (2005) *Biomol. Eng.*, **22,** 11–19.
[١٦] Wahler, D. and Reymond, J.-L. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12,** 535–544.
[١٧] Becker, S., Schmoldt, H.-U., Adams, T.M., Wilhelm, S., and Kolmar, H. (2004) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15,** 323–329.
[١٨] Buchholz, K., Kasche, V., and Bornscheuer, U.T. (2005) *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
[١٩] Fernandes, P. and Cabral, J.M.S. (2006) Biotrans-formations, in *Basic Biotechnology*, 3rd edn (ed. Ratledge, C.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 579–626.
[٢٠] León, R., Fernandes, P., Pinheiro, H.M., and Cabral, J.M.S. (1998) *Enzyme Microb. Technol.*, **23,** 483–500.
[٢١] Fernandes, P., Prazeres, D.M.F., and Cabral, J.M.S. (2003) Membrane-assisted extractive bioconversions, in *Process Integration in Bio-chemical Engineering–Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. **80** (eds L. van der Wielen and U. von Stockar), Springer-Verlag, Berlin, pp. 115–148.
[٢٢] Bechtold, M., Makart, S., Heinemann, M., and Panke, S. (2006) *J. Biotechnol.*, **124,** 146–162.
[٢٣] Buque-Taboada, E.M., Straathof, A.J.J., Heijnen, J.J., and van der Wielen, L.A.M. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71,** 1–12.
[٢٤] Varma, A.J., Kennedy, J.F., and Galgali, P. (2004) *Carbohydr. Polym.* **56,** 429–445.

obeikandl.com

[٢٥] Riva, S. (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5,** 106–111.

[٢٦] Khimiuk, A.Y., Korennykh, A.V., van Langen, L.M., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., and Švedas, V.K. (2003) *Tetrahedron Asymmetry*, **14,** 3123–3128.

[٢٧] Zhou, Y.-Y., Yang, T., Wang, N., Xua, L., Huang, Y.-B., Wu, X.-X., Yang, X.-C., and Zhang, X.-Z. (2003) *Enzyme Microb. Technol.*, **33,** 55–61.

[٢٨] Ishige, T., Honda, K., and Shimizu, S. (2005) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9,** 174–180.

[٢٩] Liljeblad, A. and Kanerva, L.T. (2006) *Tetrahedron*, **62,** 5831–5854.

[٣٠] Cai, X., Wang, N., and Lin, X. (2006) *Polymer*, **47,** 6491–6495.

[٣١] Konarzycka-Bessler, M. and Jaeger, K.-E. (2006) *Trends Biotechnol.*, **24,** 248–250.

[٣٢] McNamara, C.J. and Mitchell, R. (2005) *Front. Ecol. Environ.*, **3,** 445–451.

[٣٣] Kirk, O., Borchert, T.V., and Fuglsang, C.C. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13,** 345–351.

[٣٤] Duetz, W.A., van Beilen, J.B., and Witholt, B. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12,** 419–425.

[٣٥] Groves, J.T. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A.*, **100,** 3569–3574.

[٣٦] Arnold, F.H. and Glieder, A. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 567–569.

[٣٧] Zhao, H. and van der Donk, W.A. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 583–589.

[٣٨] Nazor, J. and Schwaneberg, U. (2006) *ChemBioChem*, **7,** 638–644.

[٣٩] Hollmann, F., Lin, P.-C., Witholt, B., and Schmid, A. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125,** 8209–8217.

[٤٠] Yasohara, Y., Kizaki, N., Hasegawa, J., Takahashi, S., Wada, M., Kataoka, M., and Shimizu, S. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51,** 847–851.

[٤١] Yang, Z.-H., Yao, S.-J., and Lin, D.-Q. (2004) *Ind. Eng. Chem.Res.*, **43,** 4871–4875.

[٤٢] Doswald, S., Hanlon, S.P., and Kupfer, E. (2007) US Patent Application 0009999 A1.

[٤٣] Csuk, R. and Glaenzer, B.I. (1991) *Chem. Rev.*, **91,** 49–97.

[٤٤] Michielsen, M.J.F., Meijer, E.A., Wijffels, R.H., Tramper, J., and Beeftink, H.H. (1998) *Enzyme Microb. Technol.*, **22,** 621–628.

[٤٥] Doig, S.D., Simpson, H., Alphand, V., Furstoss, R., and Woodley, J.M. (2003) *Enzyme Microb. Technol.*, **32,** 347–355.

[٤٦] Fontanille, P. and Larroche, C. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60,** 534–540.

[٤٧] Chen, R.R. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74,** 730–738.

[٤٨] Ni, Y. and Chen, R. (2005) *Biotechnol. Prog.*, **21,** 799–805.

[٤٩] Sedlaczek, L., Lisowska, K., Korycka, M., Rumijowska, A., Ziółkowski, A., and Długoński, J. (1999) *Appl. Microbiol. Bio-technol.*, **52,** 563–571.

[٥٠] Rumijowska-Galewicz, A., Ziółkowski, A., Korycka-Machała, M., and Sedlaczek, L. (2000) *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **16,** 237–244.

[٥١] Korycka-Machała, M., Ziółkowski, A., Rumijowska-Galewicz, A., Lisowska, K., and Sedlaczek, L. (2001) *Microbiology*, **147,** 2769–2781.

[٥٢] Ni, Y., Mao, Z., and Chen, R.R. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73,** 384–393.

[٥٣] Sroga, G.E. and Dordick, J.S. (2002) *Biotechnol. Bioeng.*, **78,** 761–769.

[٥٤] Huang, Q., Huang, K., and Scott, A.I. (1998) *Tetrahedron Lett.*, **39,** 2033–2036.

[٥٥] Otto, R.T., Bornscheuer, U.T., Syldatk, C., and Schmid, R.D. (1998) *Biotechnol. Lett.*, **20,** 437–440.

[٥٦] Tischer, W. and Wedekind, F. (1999) *Immobilized Enzymes: Methods and Applications, in Biocatalysis: from Discovery to Application. Topics in current Chemistry*, vol. 200, Springer-Verlag, Berlin, pp. 95–126.

[٥٧] Krajewska, B. (2004) *Enzyme Microb. Technol.*, **35,** 126–139.

[٥٨] Sheldon, R.A., Schoevaart, R., and Van Langen, L.M. (2005) *Biocatal. Biotransformation*, **23,** 141–147.

[٥٩] Puri, M., Kaur, H., and Kennedy, J.F. (2005) *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **80,** 1160–1165.

[٦٠] Coppens, G. (1982) US Patent 4345031.

Tsakiris, A., Kourkoutas, Y., Dourtoglou, V.G., Koutinas, A.A., Psarianos, C., and Kanellaki, M. (2006) *J. Sci. Food Agric.*, **86,** 539–543. [٦١]

Plessas, S., Bekatorou, A., Koutinas, A.A., Soupioni, M., Banat, I.M., and Marchant, R. (2007) *Bioresour. Technol.*, **98,** 860–865. [٦٢]

Davis, B.G. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 379–386. [٦٣]

Pierre, A.C. (2004) *Biocatal. Biotransformation* , **22,** 145–170. [٦٤]

Avnir, D., Coradin, T., Lev, O., and Livage, J. (2006) *J. Mater. Chem.*, **16,** 1013–1030. [٦٥]

Noritomi, H., Sasanuma, A., Kato, S., and Nagahama, K. (2007) *Biochem. Eng. J.*, **33,** 228–231. [٦٦]

Kim, J., Grate, J.W., and Wang, P. (2006) *Chem. Eng. Sci.*, **61,** 1017–1026. [٦٧]

Wang, P. (2006) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17,** 574–579. [٦٨]

Bruns, N. and Tiller, J.C. (2005) *Nano Lett.*, **5,** 45–48. [٦٩]

Torres, S. and Castro, G.R. (2004) *Food Technol. Biotechnol.*, **42,** 271–277. [٧٠]

Kragl, U., Eckstein, M., and Kaftzik, N. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13,** 565–571. [٧١]

Jain, N., Kumar, A., Chauhan, S., and Chauhan, S.M.S. (2005) *Tetrahedron*, **61,** 1015–1060. [٧٢]

Knez, Ž. and Habulin, M. (2002) *J. Supercritical Fluids*, **23,** 29–42. [٧٣]

Knez, Ž., Habulin, M., and Primožič, M. (2005) *Biochem. Eng. J.*, **27,** 120–126. [٧٤]

Lamare, S. and Legoy, M.-D. (2004) US Patent 6511842. [٧٥]

Zijlstra, G.M., de Gooijert, C.D., and Tramper, J. (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9,** 171–176. [٧٦]

Illanes, A., Wilson, L., Altamirano, C., Cabrera, Z., Alvarez, L., and Aguirre, C. (2007) *Enzyme Microb. Technol.*, **40,** 195–203. [٧٧]

Karakatsanis, A. and Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007) *J. Food Eng.*, **80,** 1213–1217. [٧٨]

Blattner, C., Zoumpanioti, M., Krönera, J., Schmeer, G., Xenakis, A., and Kunza, W. (2006) *J. Supercritical Fluids*, **36,** 182–193. [٧٩]

Bühler, B., Straathof, A.J.J., Witholt, B., and Schmid, A. (2006) *Org. Proc. Res. Develop.*, **10,** 628–643. [٨٠]

Gravil, S., Veschambre, H., Ch ê nevert, R., and Bolte, J. (2006) *Tetrahedron Lett.*, **47,** 6153–6157. [٨١]

Katsoura, M.H., Polydera, A.C., Tsironis, L., Tselepis, A.D., and Stamatis, H. (2006) *J. Biotechnol.*, **123,** 491–503. [٨٢]

Pfruender, H., Jones, R., and Weuster-Botz, D. (2006) *J. Biotechnol.*, **124,** 182–190. [٨٣]

Yuan, Y., Bai, S., and Sun, Y. (2006) *Food Chem.*, **97,** 324–330. [٨٤]

Debeche, T., Marmet, C., Kiwi-Minsker, L., and Renken, A. (2005) *Enzyme Microb. Technol.*, **36,** 911–916. [٨٥]

Erable, B., Maugard, T., Goubet, I., Lamare, S., and Legoy, M.D. (2005) *Process Biochem.*, **40,** 45–51. [٨٦]

Kumar, R., Modak, J., and Madras, G. (2005) *Biochem. Eng. J.*, **23,** 199–202. [٨٧]

Garcia, S., Lourenço, N.M.T., Lousa, D., Sequeira, A.F., Mimoso, P., Cabral, J.M.S., Afonso, C.A.M., and Barreiros, S. (2004) *Green Chem.*, **6,** 466–470. [٨٨]

Hilker, I., Alphand, V., Wohlgemuth, R., and Furstoss, R. (2004) *Adv. Synth. Catal.*, **346,** 203–214. [٨٩]

Staebler, A., Cruz, A., van der Goot, W., Pinheiro, H.M., Cabral, J.M.S., and Fernandes, P. (2004) *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **29,** 19–23. [٩٠]

Kim, M.-J., Choi, M.Y., Lee, J.K., and Ahn, Y. (2003) *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **26,** 115–118. [٩١]

Liao, L.-C., Ho, C.S., and Wu, W.-T. (1999) *Process Biochem.*, **34,** 417–420. [٩٢]

Straathof, A.J.J. (2003) *Biotechnol. Prog.*, **19,** 755–762. [٩٣]

Kim, P.-Y., Pollard, D.J., and Woodley, J.M. (2007) *Biotechnol. Prog.*, **23,** 74–82. [٩٤]

Hill, A.C. (1898) *J. Chem. Soc.*, **73,** 634–658. [٩٥]

Kastle, J.H. and Loevenhart, A.S. (1900) *Am. Chem. J.*, **24,** 491–525. [٩٦]

Sym, E.A. (1936) *Biochem. J.*, **30,** 609–617. [٩٧]

Halling, P.J. and Kvittingen, L. (1999) *Trends Biotechnol.*, **17,** 343–344. [٩٨]

obeikandl.com

[٩٩] Stamatis, H., Xenakis, A., and Kolisis, F.N. (1999) *Biotechnol. Adv.*, **17,** 293–318.

[١٠٠] Aloulou, A., Rodriguez, J.A., Fernandez, S., van Oosterhout, D., Puccinelli, D., and Carrière, F. (2006) *Biochim. Biophys. Acta,* **1761,** 995–1013.

[١٠١] Fernandes, P., Ferreira, B.S., and Cabral, J.M.S. (2003) *Int. J. Antimicrob. Agents*, **22,** 211–216.

[١٠٢] Filho, M.V., Stillger, T., M ü ller, M., Liese, A., and Wandrey, C. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42,** 2993–2996.

[١٠٣] Barberis, S., Quiroga, E., Morcelle, S., Priolo, N., and Luco, J.M. (2006) *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **38,** 95–103.

[١٠٤] Schmid, A., Kollmer, A., Mathys, R.G., and Witholt, B. (1998) *Extremophiles*, **2,** 249–256.

[١٠٥] Park, S. and Kazlauskas, R.J. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 432–437.

[١٠٦] Kaar, J.L., Jesionowski, A.M., Berberich, J.A., Moulton, R., and Russell, A.J. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125,** 4125–4131.

[١٠٧] Lutz-Wahl, S., Trost, E.-M., Wagner, B., Manns, A., and Fischer, L. (2006) *J. Biotechnol.*, **124,** 163–171.

[١٠٨] Lo, C.-K., Pan, C.-P., and Liu, W.-H. (2002) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **28,** 280–283.

[١٠٩] Lamare, S., Legoy, M.-D., and Graber, M. (2004) *Green Chem.*, **6,** 445–458.

[١١٠] Oliveira, D., Feihrmann, A.C., Rubira, A.F., Kunita, M.H., Dariva, C., and Oliveira, J.V. (2006) *J. Supercritical Fluids,* **38,** 373–382.

[١١١] Bühler, B., Witholt, B., Hauer, B., and Schmid, A. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.*, **68,** 560–568.

[١١٢] Sengupta, S. and Modak, J.M. (2001) *Chem. Eng. Sci.*, **56,** 3315–3325.

[١١٣] Braiuca, P., Ebert, C., Basso, A., Linda, P., and Gardossi, L. (2006) *Trends Biotechnol.*, **24,** 419–425.

[١١٤] Haaland, P.D. (1989) *Experimental Design in Biotechnology*, Marcel Dekker Inc, New York.

[١١٥] Braiuca, P., Ebert, C., Fischer, L., Gardossi, L., and Linda, P. (2003) *ChemBioChem*, **4,** 615–622.

[١١٦] Braiuca, P., Cruciani, G., Ebert, C., Gardossi, L., and Linda, P. (2004) *Biotechnol. Prog.*, **20,** 1025–1031.

[١١٧] Szita, N., Boccazzi, P., Zhang, Z., Boyle, P., Sinskey, A.J., and Jensen, K.F. (2005) *Lab Chip*, **5,** 819–826.

[١١٨] Betts, J.I. and Baganz, F. (2006) *Microb. Cell Fact.*, **5,** 21–34.

[١١٩] Fernandes, P. and Cabral, J.M.S. (2006) *Biocatal. Biotransformation*, **24,** 237–252.

[١٢٠] Büchs, J., Lotter, S., and Milbradt, C. (2001) *Biochem. Eng. J.*, **7,** 135–141.

[١٢١] Büchs, J. (2001) *Biochem. Eng. J.*, **7,** 91–98.

[١٢٢] Maier, U., Losen, M., and Büchs, J. (2004) *Biochem. Eng. J.*, **17,** 155–167.

[١٢٣] Doig, S.D., Pickering, S.C.R., Lye, G.J., and Baganz, F. (2005) *Chem. Eng. Sci.*, **60,** 2741–2750.

obeikandl.com