الباب السابع

التطبيقات التحليلية لتكنولوجيا النانو فى مجال علوم وتكنولوجيا الأغذية

obeikandl.com

obeikandl.com

الباب السابع

التطبيقات التحليلية لتكنولوجيا النانو
فى مجال علوم وتكنولوجيا الأغذية

١- ميكروسكوب الدفع الذري Atomic Force Microscope

١-١ مقدمة

إعتمد الباحثون منذ زمن بعيد علي الفحص الميكروسكوبي للتعرف علي التركيب البنائي للأغذية وتأثره بالمعاملات التصنيعية والتخزين. وقد واكب التطور المستمر في ظهور أنواع الميكروسكوبات المختلفة تطور المعرفة في هذا المجال. ففي بداية الدراسات إعتمد الباحثون علي الميكروسكوب العادي ليتطور الي الميكروسكوب الأليكتروني بنوعيه النافذ Transmission والماسح Scanning وميكروسكوب الليزر الماسح confocal laser scanning microscope وآخر أنواع الميكروسكوبات المستحدثة هو ميكروسكوب الدفع الذري Atomic force microscope (AFM) والذي تم استحداثه عام ١٩٨٦ كنوع مختلف جذريا عما سبقه من الميكروسكوبات سواء في أساسه النظري أو إمكانياته المختلفة. وبالمقارنة بأنواع الميكروسكوبات الأخري فان لميكروسكوب الدفع الذري مزايا متعددة يمكن تلخيصها فيما يلي:

١- له قوة تكبير وفصل resolution عاليتين فالميكروسكوب ذو الدفع الذري من الطرق القليلة المعدودة التي يمكنها تمييز وجود تغير أو خلل في المركبات علي المستوي الجزيئي.

٢- لا يحتاج إعداد العينة للفحص الي جهد كبير فلا يحتاج الي صبغ العينة (كما في الميكروسكوب العادي) أو الي تفريغ أو الوصول الي نقطة حرجة أو التغطية بطبقة من الذهب (كما في الميكروسكوب الأليكتروني بنوعيه) أو المعاملة بمواد مفلورة flouresence كما في ميكروسكوب الليزر الماسح.

٣- القدرة علي تصوير العينة من عدة جهات وجمع بياناتها الاحادية والحصول علي صور ثنائية وثلاثية الأبعاد.

٤- يمكن تصوير العينة في الجو العادي أو في محلول مائي ومن ثم يمكن متابعة التغيرات التي تحدث في التركيب البنائي لها مباشرة أثناء المعاملات التكنولوجية المختلفة وذلك علي سبيل المثال.

٥- القدرة على التعامل مع الجزيئات الكبيرة macromolecules ودراسة تفاعلاتها

وبالنظر الي هذه المزايا فان ميكرسكوب الدفع الذري له القدرة علي توصيف التركيب البنائي للمواد الغذائية علي المستوي النانو ومن ثم فانه يعتبر أحد الطرق الأساسية لدراسة وفهم التغيرات التي تحدث في التركيب البنائي النانو للمواد الغذائية أثناء المعاملات التكنولوجية والحفظ. ومن المؤكد أن المعلومات المتحصل عليها بهذه الوسيلة تعتبر الأساس لتعديل طرق التصنيع والحفظ بما لا يؤثر سلبا علي خواص وصفات المنتج. وبالرغم من المزايا المتعددة لميكرسكوب الدفع الذري فان له بعض نواحي القصور تتلخص فيما يلي:

١- صغر حجم المنطقة التي يتم مسحها small scan size.

٢- بطء عملية المسح.

٣- صعوبة تصوير الأغذية أو العينات البيولوجية شديدة الطراوة.

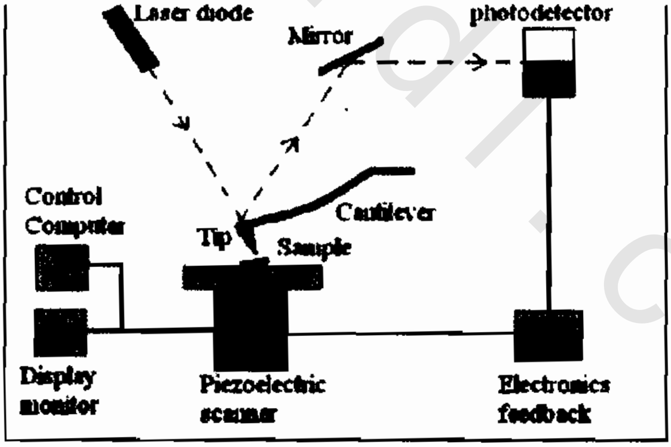
١-٢ أساسيات عمل ميكرسكوب الدفع الذرى

١-٢-١ الأسس Principle

يعتمد الفحص بميكروسكوب الدفع الذري علي قياس محصلة التغيرات في التفاعل interaction بين المسبار probe وسطح العينة (عادة ما يكون من خلال قوي فان در فالس) أثناء مسح العينة. يبين شكل (١-٧) تتابع عملية تصوير الشكل البنائي للعينة والتي تتلخص في الخطوات التالية:

١- يركز شعاع ليزر (من laser diode) علي مسبار في نهاية ذراع رافعة متحركه cantilever (يفضل أن يسقط علي النهاية المدببة tip مباشرة) علي مرآة عاكسة ومنها الي مميز Detector من نوع position-positive photodiode

٢- مع تحرك المسبار في نهاية الذراع تبعا لطوبوغرافية العينة أثناء عملية المسح فان الزاوية التي ينعكس بها شعاع الليزر تتغير.



شكل (١-٧) الأسس النظرية لفحص العينات بميكروسكوب الدفع الذري

٣- مع تغير زاوية سقوط شعاع الليزرفان نقاطه تتحرك محدثة تغيرا في شدة intensity كل نقطة من النقاط المحدثة والتي تحدث بدورها اشارات كهربية مكافئة كميا للتحرك الذي يحدث في المسبار.

٤- عند إجراء المسح فان طوبوغرافية سطح العينة تؤدي الي تحرك الذراع تبعا لتغير القوة بين سطح العينة والمسبار.

٥- يتم عمل خريطة طوبوغرافية لسطح العينة من قياسات تحرك الذراع الرافعة بواسطة الحاسب الآلي ويتم عرض الصور علي شاشة في حين تظهر البيانات المتحكمة علي شاشة أخري.

ويمكن تشغيل ميكروسكوب الدفع الذري اما علي أساس التحكم الرجعي control feed back أو بدونه. فعند إجراء الفحص بنظام التحكم الرجعي فان ارتفاع المنصة المتحركة والمثبت عليها العينة يتغير مع أي تغير في الإشارات الكهربية من المميز لكي تحافظ علي المسافة بين العينة والمسبار عند قيمة محددة وعلي ذلك فان طوبوغرافية العينة تتحدد بالتغير في الارتفاع والانخفاض في المنصة الحاملة للعينة hight mode image ويفيد هذا النظام في حالة العينات شديدة التسطح باستخدام دقة توضيح resolution عالية.

١-٢-٢ التشغيل Operation

توجد ثلاثة أنظمة للفحص المبدئي بميكروسكوب الدفع الذري وهي:

١- نظام التلامس contact mode حيث يلامس المسبار سطح العينة باستمرار أثناء المسح وهو ما يعني تعرض سطح العينة باستمرار الي قوة كبيرة وهو ما يؤدي الي هدم العينات الطرية خاصة عند التصوير في الهواء ويعطي صورا رديئة.

٢- النظام غير المتلامس non contact mode

٣- نظام التلامس المتقطع tapping mode، في هذا النظام يلامس المسبار المتذبذب سطح العينة في أقل نقطة تذبذب فقط وهذا النظام يقلل من القوة التي يسقطها المسبار علي العينة مما يقلل من الهدم ويعطي أعلي درجة وضوح للأحداثيات الأفقية عن النظامين الآخرين. وهذا النظام هو الأكثر شيوعا في الاستخدام في فحص الأغذية والمواد البيولوجية. وحديثا تم تطوير هذا النظام بحيث يمكن قياس بعض خواص العينة الهامة مثل درجة المطاطية viscoelasticity، ويؤخذ علي هذا النظام بطء عملية المسح مقارنة بنظام التلامس. وبصفة عامة فان شكل المسبار يحدد بدرجة كبيرة الدقة في الصور التي يتم أخذها.

وبعد تحديد النظام الذي سيتم إستخدامه يتم فحص العينة اما في الهواء أو في وسط مائي علي مرحلتين الاولي الحصول علي الصور والثانية تحليلها باستخدام برامج خاصة.

١-٣ تطبيقات ميكروسكوب الدفع الذري في مجال علوم وتكنولوجيا الأغذية

عمل العلماء منذ إستحداث ميكروسكوب الدفع الذري علي إستخدام هذه الوسيلة الفعالة في كل مجالات البحث والتطوير ومنها مجال علوم وتكنولوجيا الأغذية. وقد تزايد عدد الدراسات التي أجريت في مجال الأغذية باستخدام ميكروسكوب الدفع الذري منذ عام ١٩٩٣ حيث استخدم في ذلك الوقت لأول مرة لمتابعة التغيرات في بروتينات الغذاء وتزايد عدد البحوث بسرعة حتي عام ٢٠٠٤ ثم تراجع قليلا عام ٢٠٠٥-٢٠٠٦ لاستحداث نظم جديدة في المجالات البيولوجية الأخري ولم تطبق في مجال الغذاء فقد بلغت نسبة البحوث التي

استخدم فيها ميكروسكوب الدفع الذري في مجال الغذاء حوالي ٣٠% من تطبيقاته في كافة المجالات عام ٢٠٠٤ ثم تراجعت الي ٢٢% عام ٢٠٠٥-٢٠٠٦. وبصفة عامة فان تطبيقات ميكروسكوب الدفع الذري في مجال علوم وتكنولوجيا الأغذية تندرج تحت ستة أقسام علي النحو التالي:

١-٣-١ الاظهار الوصفي للجزيئات الكبيرة والبوليمرات الغذائية

Qualitative macromolecules and polymers imaging

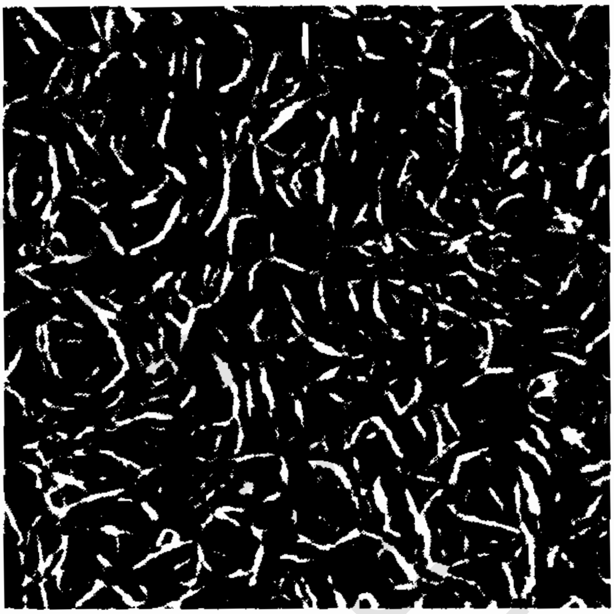
يمثل الفحص الوصفي لعينات الغذاء الاستخدام الأساسي لميكروسكوب الدفع الذري. ومن الناحية النظرية يمكن وصف جزيئ كبير واحد أو بوليمر في منظومة الغذاء باستخدام ميكروسكوب الدفع الذري غير أنه من الناحية العملية يقتصر استخدامه علي توصيف البروتينات والسكريات العديدة في الغذاء.

١-٣-٢ التحليل التركيبي أو الكمي Complicated or quantitative structure analysis

من الأمور الأكثر صعوبة وتحديا للباحثين استخدام ميكروسكوب الدفع الذري لدراسة التركيب الفراغي spatial structure للمكونات في نظام غذائي معقد. وبجهود كبيرة أمكن استخدام ميكروسكوب الدفع الذري في توصيف نظام غذائي معقد والتنبؤ بالنتائج بتصور الميكانيكيات الطبيعية والكيماوية التي تحدث في الغذاء أثناء التصنيع والحفظ. ومن ناحية أخري فقد تم تطوير مؤشرات كمية جديدة اعتمادا علي الصور المأخوذة بهذا الميكرسكوب يمكن أن تعطي معلومات مفيدة عن الخواص الطبيعية/الكيماوية للغذاء، فعلي سبيل المثال يوضح شكل (٧-٢) الملامح العامة لجيل البكتين المحضر من حمضيات albedo فتظهر مساحة ١ ميكرومتر مربع شبكة معقدة من خيوط منحنية في أماكن الارتباط بينها ومن هذه الصور أمكن تحديد أبعاد الخيوط المكونة للشبكة والمسام التي

obeikandi.com

تتخللها. وقد أوضحت هذه الصور لأول مرة تركيب السكر المدمص علي البكتين في الجيل المتكون علي صورته الطبيعية وكيفية تنظيم الشبكة البكتينية لهذا الجيل في أوقات مختلفة وتميز الفروق الطفيفة بين شكل الجيل المحضر باستخدام أنواع مختلفة من البكتين.



شكل (٢-٧) تركيب الشبكة الهلامية من البكتين للحمضيات orange albedo يوضح التركيب الخيطي وأماكن ارتباط الخيوط

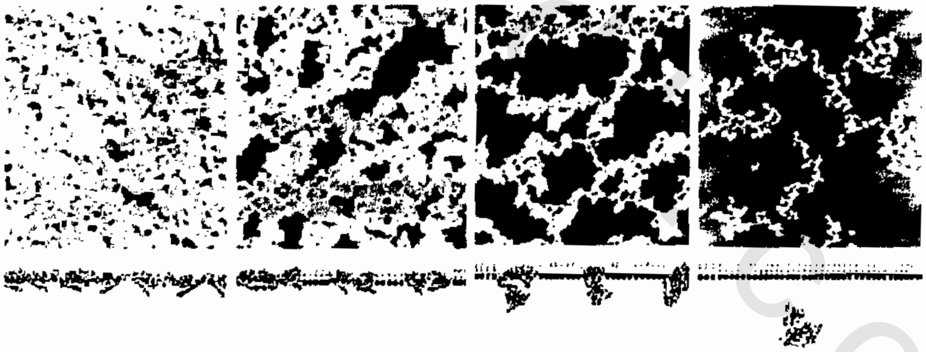
ويعتبر الفحص بميكروسكوب الدفع الذري طريقة بديلة للحصول علي معلومات كمية أفضل عن الجزيئات الكبيرة فقد مكن الباحثين من تقدير الاستطالة التي تعتمد علي التغيرات في لزوجة أو صلابة سلسلة واحدة باستخدام نماذج رياضية مناسبة أو بمعني آخر فان ميكروسكوب الدفع الذري يربط بين التركيب النانو والخواص الكيموطبيعية للجزيئات الكبيرة.

obeikandi.com

١-٣-٣ التفاعلات الجزيئية Molecular interactions

تلعب التفاعلات الجزيئية دورا هاما في تحديد الخواص الطبيعية والكيماوية للأغذية لذلك يحاول الباحثون باستمرار تطوير الطرق التي يمكن من خلالها تتبع هذه التفاعلات ووضع الميكانيكيات لحدوثها ويمثل ميكروسكوب الدفع الذري واحدا من أهم الأدوات لدراسة هذه التفاعلات.

يبني استخدام ميكروسكوب الدفع الذري لقياس التفاعلات الجزيئية علي أساس قياس القوة. فيمكن قياس قوة التفاعل بين المسبار وسطح العينة بتحريك الذراع عموديا علي سطح العينة ورسم العلاقة بين المسافة والقوة. وبذلك من الممكن الكشف عن قوي التفاعل علي سطح العينة أو بمعني آخر الكشف عن رابطة واحدة. فعلي سبيل المثال إستخدم ميكروسكوب الدفع الذري في تتبع احلال المواد النشطة سطحيا surfactant محل البروتين المدمص علي سطح الالتقاء بين الهواء والماء (الرغوة) أو بين الماء والزيت (المستحلب) كما يوضح شكل (٣-٧)

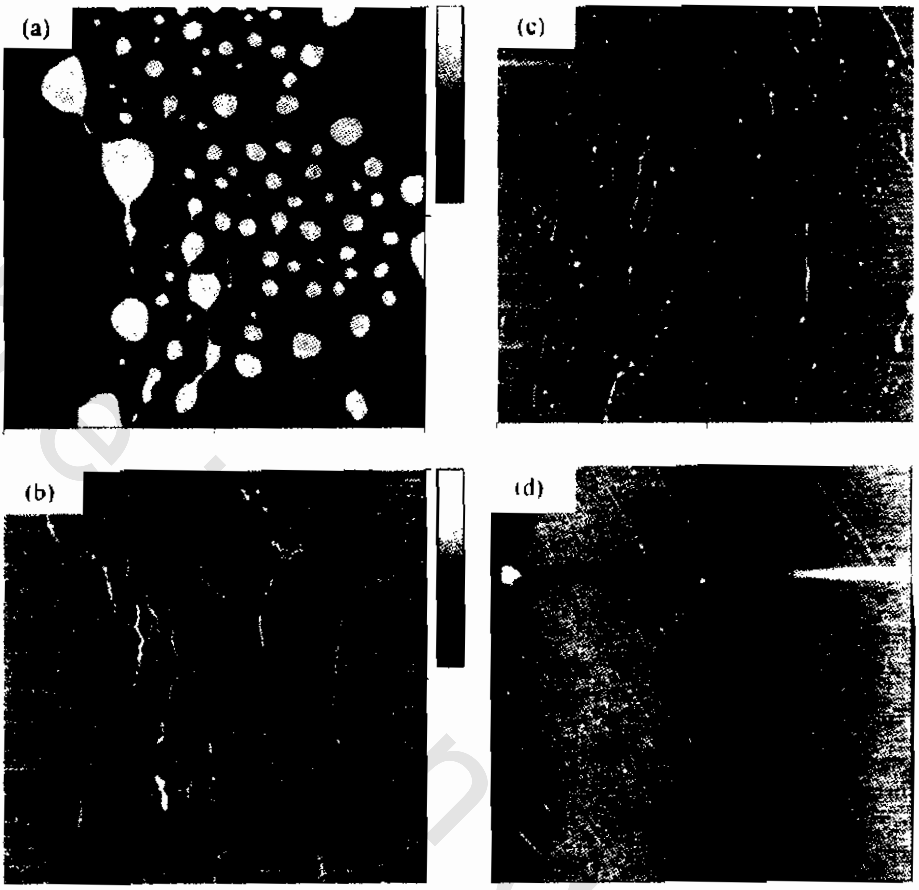


شكل (٣-٧) مراحل احلال المادة النشطة سطحيا (Tween 20) وجزيئات بيتا-لاكتوجلوبيولين المدمص علي سطح الرغوة (سطح الالتقاء بين الماء والهواء)

فبالاضافة الي الصور التي توضح تتابع التغيرات الوصفية في الوسط فانه يمكن تقدير المساحة التي يحتلها كل من البروتين والمادة النشطة سطحيا. كذلك أمكن استخدام ميكرسكوب الدفع الذري في دراسة التفاعل بين بيتا لاكتوجلوبيولين وكابا-كراجينان. وحديثا أمكن استخدام الفحص بهذا الميكروسكوب في دراسة احلال المادة النشطة سطحيا لمجوعة معقدة من البروتينات (بروتينات الشرش المستخلصة whey protein isolates) حيث أظهرت الدراسة أن مجموعة البروتينات تقاوم الاحلال بصورة أكبر من بروتين بيتا-لاكتوجلوبيولين النقي غير أنه من الصعب تعميم دراسة التفاعلات الجزيئية في الأنظمة الغذائية المعقدة لصعوبة اجراء ذلك.

١-٣-٤ التشكيل الجزيئي للغذاء Food molecular manipulation

لكثير من جزيئات الغذاء الكبيرة food macromolecules تركيب دائري معقد. وينشأ عن تجمع الجزيئات أو حتي تعقد جزيئ واحد ذو تركيب خيطي الي إختفاء خواصه الجزيئية المميزة. ويوفر التعامل مع الجزيئات إمكانية ملاحظة التفاعل بين جزيئات الغذاء مباشرة. فحديثا أمكن لأحد الباحثين من فرد جزيئ واحد من البكتين بطريقة تمشيط محورة قبل تثبيته. ويوضح شكل (٤-٧) الصور المختلفة لجزيئ البكتين والتي توضح فعالية طريقة التمشيط المحورة في تشكيل الجزئ.



شكل (٤-٧) الصور المختلفة لجزيئ البكتين (a)الصورة المثالية للجزئ طبيعيا دون تـشكيل (b) الصورة غير المثالية للجزيئ طبيعيا بدون تشكيل (c) صورة الجزيئ بعـد تثبيته دون تمشيط (d) صورة الجزيئ بعد تمشيطه وتثبيته

١-٣-٥ طبوغرافية السطح

يعتبر ميكروسكوب الدفع الذري وسيلة فعالة للدراسات الوصفية لخـشونة السطح ومحددات الخواص السطحية مثل التجانس وخـواص التكـسر وقـوي الالتصاق ويوضح شكل (٥-٧)

obeikandl.com

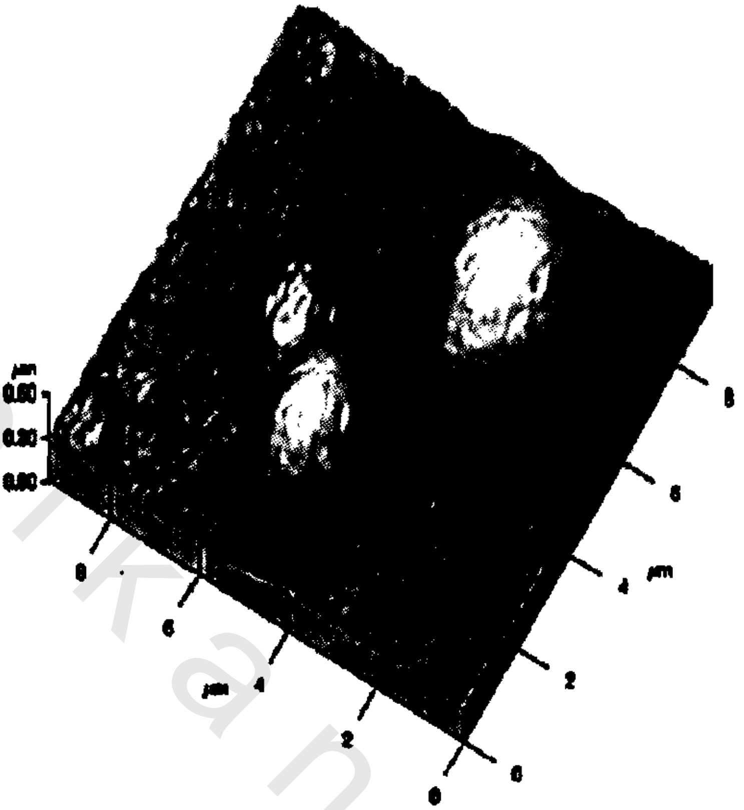


Fig. 4—Surface topography of triticale starch granules. From Juszczak (2003).

شكل (٥-٧) طبوغرافية سطح حبيبة نشا التريتيكال

أحد الأمثلة لدراسة طبوغرافية سطح حبيبة نشا. وقد استخدم الفحص لطبوغرافية السطح في العديد من الدراسات التطبيقية ومنها علي سبيل المثال:-

- دراسة سطح الشيكولاته التي يدخل اللبن في تركيبها. فعند تعرض السطح لدورات متعاقبة من درجات الحرارة المتغيرة أظهر تكون بعض البلورات حول الفجوات بينما لم يحدث أي تغير يذكر في الفجوات نفسها وهو ما يشير لأول مرة (علي عكس الافتراضات القديمة) الي عدم وجود تأثير مباشر لهذه

obeikandi.com

الفجوات علي ظاهرة التزهر bloming أو انتقال الدهن الحـر الـي سـطح الشيكولاته أثناء التخزين.

١-٣-٦ توصيف أغذية النانو Nanofood characterization

بالرغم من أنه من الناحية العملية لم يتم تسويق أغذية النانو حتـي الآن الا أن الباحثين قد خطوا خطوات كبيرة في مجال تصنيع هذه الأغذية بنظام التشييد من الجزيئات والذرات التي لها خاصية البناء الذاتي self assembling وبمساعدة الفحص بميكرسكوب الدفع الذري يمكن محاكاة هذه العملية وتعظيمها والحصول علي معلومات مفيدة قد تساعد مستقبلا في انتاج أغذية النانو.

١-٤ الخلاصة

يمثل ميكرسكوب الدفع الذري وسيلة فعالة تـم اسـتخدامها فـي دراسـة التركيب الجزيئ الدقيق (النانو) للغذاء ودراسة التفاعلات الجزيئية علي مستوي النانو بالاضافة الي معلومات تفصيلية عن خواص الغذاء ذات تطبيقات مباشـرة في تصنيع وتداول الغذاء. ونظرا لحداثة طرق الفحص بميكرسكوب الدفع الذري فهناك الحاجة الي استحداث طرق قياسية تصلح للتطبيق في مختلـف الانظمـة الغذائية فعلي سبيل المثال فان بعض جزيئات الغذاء الكبيرة لا تـرتبط بـسطح رقائق الميكا المستخدمة لتحميل العينات للفحص بهذا الميكرسـكوب وهـو مـا يتطلب دراسة امكانية تحوير سطح الميكا أو جزيئات الغذاء لتحقيـق الارتبـاط بينهما.

٢- المحسات الحيوية وتكنولوجيا النانو Nanotechnology and Biosensors

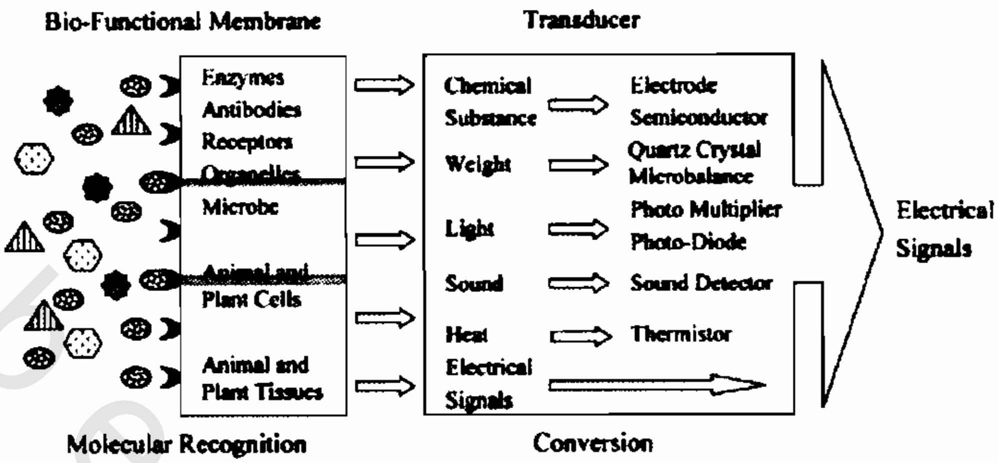
٢-١ مقدمة

تحتاج صناعة الأغذية الي طرق تحليلية يمكن الاعتماد عليها وتكون في ذات الوقت إقتصادية وسريعة لتقدير بعض المكونات الكيماوية والمحتوي الميكروبي والملوثات في الخامات المستخدمة في التصنيع وفي المنتجات المصنعة. ويتزايد هذا الاحتياج مع تطور التشريعات المنظمة لتداول الأغذية وزيادة وعي المستهلك وإهتمامه بالقيمة الغذائية والصحية للمنتج ومأمونيته. ويقدر ما تنفقه صناعة الأغذية في الولايات المتحدة الأمريكية علي الرقابة علي الأغذية المصنعة وتقييم جودتها وسلامتها حوالي ٥و١-٢% من القيمة الكلية لمبيعاتها. فعلي سبيل المثال يتم الكشف عن وجود المضادات الحيوية في كل الألبان الخام الموردة للمصانع وهو ما يمثل عدة مئات الآلاف من التقديرات السنوية لصناعة الألبان في مصر. كذلك تهتم الجهات الرقابية والصناعية بتواجد الملوثات في الغذاء مثل أنواع السموم المختلفة وكذلك الميكروبات الضارة والمرضية. ويتزايد الاهتمام بايجاد طرق سريعة ودقيقة مع ظهور بعض المشاكل الجديدة ولذلك فان عدم وجود طرق للكشف عن مرض جنون البقر عند بداية ظهورة وإنتشارة أدي الي القضاء علي أكثر من ٩٠٠٠ حيوان في المملكة المتحدة. الاضافة الي ذلك فان التشريعات تتطلب باستمرار إضافة بيانات جديدة تفصيلية للمكونات الكبري والصغري علي بطاقة البيانات للأغذية المصنعة وهو ما يحتاج الي طرق موثوق بها لتقدير تلك المكونات في الغذاء. وبالاضافة الي ذلك فإن إسهام الخدمات التحليلية في الصناعات الغذائية في تزايد مستمر ولاسيما في تحديد القيمة الغذائية للمنتج وتقييم طزاجته وتحديد مدد صلاحيته للتداول.

وهناك العديد من الطرق التحليلية التقليدية التي تم تطويرها وتطبيقها في تحليل الأغذية والتي يمكن أن توفر معلومات تفصيلية عن الخواص الطبيعية والكيماوية للأغذية وبالذات الملوثات، غير أن هذه الطرق مثل الطرق الكروماتوجرافية تحتاج الي وقت طويل في تحضير العينة فضلا عن الحاجة الي إستخدام أجهزة مكلفة وكيماويات ذات نقاوة عالية ومن هنا تأتي أهمية الطرق المعتمدة علي المحسات الحيوية كوسيلة سريعة ودقيقة وإقتصادية لتحليل الأغذية كبديل للطرق التقليدية. وبالرغم من الدراسات المتعددة علي المحسات الحيوية بأقسامها وتطبيقاتها المختلفة الا أن استخدامها في مجال الأغذية مازال محدودا نظرا لطبيعة الغذاء المعقدة ووجود العديد من المكونات المصاحبة والتي تتداخل مع تقدير المكون المراد تقديره وهو ما يؤدي الي نتائج غير دقيقة. لذلك يتطلب إستخدام المحسات الحيوية في تحليل الأغذية في كثير من الأحيان الي تحضير مبدئي للعينات وهو ما يضيف عامل الوقت كعنصر محدد لاستخدامها.

٢-٢ المحسات الحيوية Biosensors

يطلق أسم المحسات الحيوية علي طرق الكشف والتحليل المبنية علي التزاوج بين مركبات عضوية حيوية وبين محولات ناقلة للاشارات signal transducers تحول الاشارات الي جهد كهربي يمكن تقديره بواسطة مميز مناسب detector.



شكل (٦-٧) الأسس المستخدمة في تصنيع المحسات الحيوية

وهناك العديد من المركبات العضوية الحيوية المستخدمة في تصنيع المحسات الحيوية والتي يطلق عليها عنصر التمييز الجزيئي Molecular recognition element (MRE) وتنقسم الي مجموعتين:

١- مجموعة العوامل المساعدة catalytic elements وتضم هذة المجموعة الأنزيمات والكائنات الدقيقة والخلايا والأنسجة النباتية والحيوانية.

٢- مجموعة المواد الجاذبة Affinity وتشمل الأجسام المضادة antibodies والمستقبلات receptors والأحماض النووية والبوليمرات الطابعة للجزيئات molecularly imprinting polymers.

وتجب الاشارة الي أن كل هذه المركبات ذات تخصص دقيق وحساسية عالية للمادة المراد تحليلها. ويتم تثبيت هذه المركبات علي أحد أسطح الجزء الثاني من المحس الحيوي المحول والناقل للإشارات وهو عادة جزء غير عضوي معدني في كثير من الحالات. وفي وجود المركب المراد الكشف عن وجوده وتقديرة تحدث تغيرات في المركب العضوي الحيوي تبعا لطبيعة تفاعله

obeikandi.com

مع المكون المراد تحليله تنشأ عنها إشارات يتم انتقالها وتحويلهـا الـي جهـد كهربي بواسطة الجزء المحول والناقل للإشارات ويتم التعرف عليها وتقـديرها بواسطة مميز مناسب وتضم النظم المحولة والناقلة للإشارات الآتي:

١- المعتمدة علي التغيرات الكهروكيماوية electrochemical ويـستخدم لهـا قطب شبه موصل electrode semi conductor

٢- المعتمدة علي التغير في الوزن ويستخدم لها ميـزان ميكروئـي لبلـورة كوارتز quartz crystal microbalance

٣- المعتمدة علي إنبعاث أشعة ويستخدم لها photomultiplier photo-diode

٤- المعتمدة علي الذبذبات الصوتية ويستخدم لها sound detector

٥- المعتمدة علي إنبعاث حراري ويستخدم لها thermister

٦- المعتمدة علي الاشارات الكهربية وهذه تقدر مباشرة بالمميز

ويوضح شكل (٦-٧) الاسس التي تبني عليها المحسات الحيوية.

٢-٣ الطرق العامة لتثبيت المركبات العضوية الحيوية علـي الجـزء الناقـل والمحول للإشارات

من الضروري اختيار المركب العضوي الحيوي الذي يتميز ببساطة الأداء ما أمكن مع ثباته العالي فبالرغم من وجود عدد كبيـر جـدا مـن الأنزيمـات المعروفة والتي يمكن من الناحية النظرية إستخدامها الا أن مجموعة الأنزيمات المؤكسدة تمثل أكثرها ثباتا وأفضلها للاستخدام في المحسات الحيوية حيث تتميز بثباتها العالي ولا يتطلب إستخدامها الحاجة الي وجود عوامل مـساعدة. وفـي السنوات الأخيرة تركزت الجهود في عزل الميكروبات والأنزيمات وهندسـتها وراثيا لزيادة تحملها الحراري علي سبيل المثال بهدف زيادة كفـاءة المحـسات الحيوية التي تدخل في تركيبها وإطالة مدة تشغيلها بكفاءة.

ومن أهم القواعد المحددة لتصميم محس حيوي نموذجي:

١- إحتجاز أكبر قدر من النشاط الحيوي للمركب العضوي في طبقة رقيقة ملاصقة ما أمكن للجزء الناقل والمحول للإشارات.

٢- أن يظل المركب العضوي محتفظا بأكبر قدر من نشاطه الحيوي أطول مدة ممكنة.

٣- وبالنسبة للأنزيمات المستخدمة كمركبات عضوية حيوية يجب أن يسمح نظام التثبيت المستخدم بحرية إنتشار المواد الداخلة في التفاعل ونواتج التفاعل الي داخل وخارج طبقة الأنزيم.

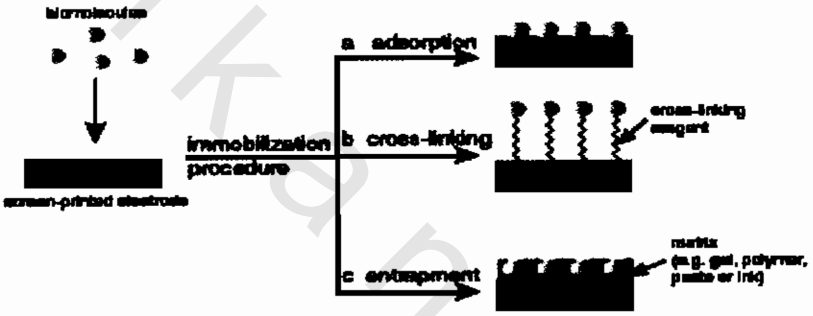
ويلقي تثبيت المركبات العضوية الحيوية إهتماما كبيرا نظرا لما يمثله من إمكانية إتاحة إستخدامها مرات متعددة كما تسمح بتبسيط وأتمته الأجهزة التحليلية وهو ما يعني زيادة إقتصاديات الاستخدام.

وهناك العديد من طرق تثبيت المركبات الحيوية الي الجزء الناقل والمحول للاشارات تتضمن:

- الادمصاص adsorption وتفتقر المحسات الحيوية المعتمدة علي هذا الاسلوب الي كفاءة الأداء ولا تستخدم حاليا الا في حالات نادرة.
- الاحتجاز في نظام هلامي أو في أغشية شبه منفذة. وتستخدم الأغشية شبه المنفذة في العديد من المحسات الحيوية وهي تسمح بحرية حركة الجزيئات المتفاعلة ونواتج التفاعل الي أماكن إحتجاز الأنزيم ويمثل إختيار الغشاء شبه المنفذ عاملا مهما في الحساسية للاشارات المنبعثة وخلفيتها.
- البلمرة الكهروكيماوية Electrochemical polymerization لمركبات عضوية لكي تحتجز بينها المركبات العضوية الحيوية ويسمح هذا النظام بالتحكم في سمك الغشاء المتكون وتجانسه ومناسبته للانتاج الدقيق علي نطاق واسع.

- إحتجاز الجزيئات الحيوية في زجاج السليكات بطريقة السائل/الهلام sol/gel وهذا النظام شفاف مما يسمح بالتحليل الضوئي.
- الروابط التعاونية بين المجموعات الجانبية الفعالة في المركب الحيوي (مثل مجموعات الأمين/الكربوكسيل/السلفهيديل) مع مجموعات فعالة علي سطح الدعامة.

ويوضح شكل (٧-٧) الطرق المختلفة لتثبيت المركبات العضوية الحيوية علي الجزء غير العضوي من المحس الحيوي.



شكل (٧-٧) الطرق المختلفة لتثبيت المكون العضوي الحيوي علي الجزء غير البيولوجي

ومن أحدث أنواع المحسات الحيوية وأكثرها إنتشارا في الوقت الحاضر تلك المبنية علي إستخدام الأقطاب المطبوعة علي شاشة screen printed electrodes والتي أسهمت في إجراء التحليلات *in vivo, in vitro* في عينات طبيعية ودون الحاجة الي معاملة سابقة للعينة. وقد أنتشر إستخدام هذا النظام علي نطاق واسع في تصنيع المحسات الحيوية للاستخدام مرة واحدة لما لها من ميزة إنخفاض التكاليف وحداثتها وملائمتها للتقديرات المصغرة miniturized وحاليا توجد مصادر تجارية عديدة للأقطاب المطبوعة علي شاشات منها:

obeikandl.com

Pin Research Instrumintation http://www.pininst.com/echem

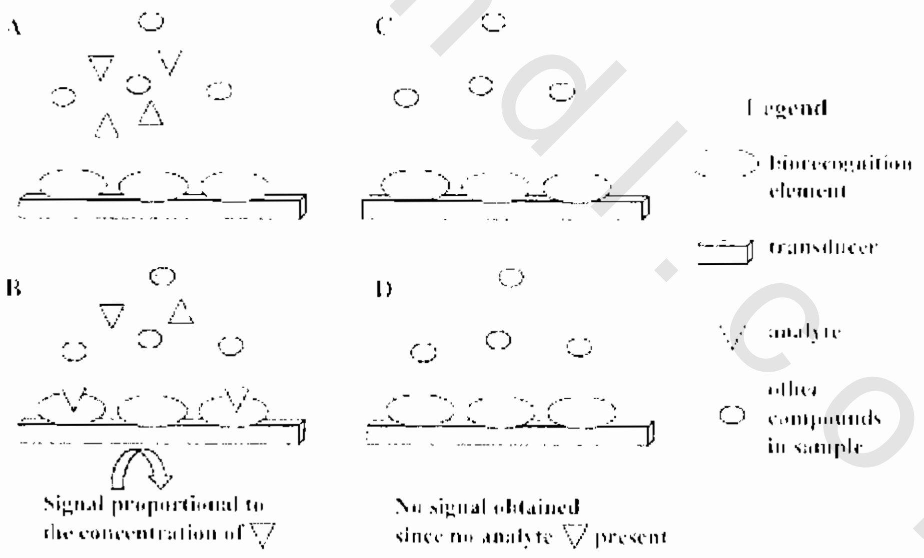
Palm Sens Electrochemical sensor Interface http://www.palmsens.com

Biosens Technology (http://www.bst.biosensotde

٤-٢ أساليب عمل المحسات الحيوية

يعتمد تقدير المكونات المختلفة بواسطة المحسات الحيوية علي ثلاثة أساليب وهي الأسلوب المباشر والأسلوب غير المباشر التنافسي والأسلوب غير المباشر غير التنافسي علي النحو التالي:

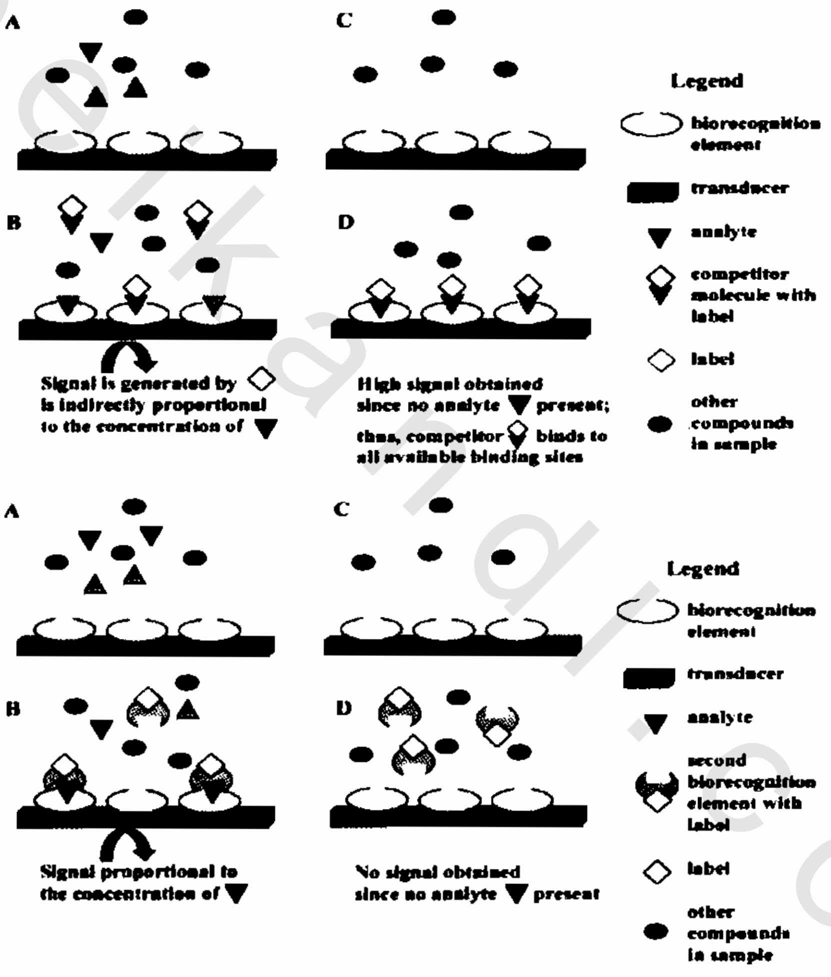
١- النظام المباشر Direct assay وفي هذا النظام يتم تحضين العينة المحتوية علي المكون المراد الكشف عنه وتقديره في وجود مواد أخري مع المحس الحيوي حيث يتفاعل المكون المراد تحليله مع عنصر التمييز الحيوي مطلقا إشارة من خلال الجزء المحول الناقل يتم متابعتها بواسطة المميز. وفي غياب المكون المراد تحليله لا تصدر أي إشارات (شكل ٨-٧)



شكل (٨-٧) الأسلوب المباشر لعمل المحسات الحيوية

obeikandl.com

٢- النظام غير المباشر التنافسي Indirect competetive assay لا يختلف عمل هذا النظام عن السابق سوي في إضافة مكون منافس للمكون المراد تقديرة في العينة قبل إجراء التحليل علي أن يكون المكون المنافس هو القادر علي إطلاق إشارة بعكس المكون المراد تقديرة وفي هذه الحالة فان شدة الأشارة تتناسب عكسيا مع تركيز المكون المراد تقديره (شكل٩-٧)



شكل (٩-٧) الأسلوب غير المباشر التنافسي (الجزء الاعلي) وغير المباشر غير التنافسي (الجزء الأسفل) لعمل المحسات الحيوية

obeikandi.com

٣- النظام غير المباشر غير التنافسي Indirect non-competetive assay ولا يختلف هذا الأسلوب عن النظام المباشر سوي في إضافة عنصر تمييز ثاني الي العينة قبل إجراء التحليل حيث يرتبط المكون المراد تقديره بعنصر التمييز المضاف والذي يرتبط بدوره مع المحس الحيوي مطلقا إشارة تتناسب شدتها مع تركيز المكون المراد تقديره في العينة (شكل ٩-٧).

٢-٥ تكنولوجيا النانو والمحسات الحيوية

يلعب النانو تكنولوجي دورا متزايدا في الأهمية في تطوير المحسات الحيوية حيث أمكن تحسين حساسية وبعض خواص المحسات الحيوية باستخدام مواد النانو في تصنيعها. ويعزي ذلك الي عاملين:

- زيادة أسطح التفاعل، فمن المعروف أنه كلما صغر حجم الحبيبه زادت المساحة السطحية للوحدة الوزنية لها.
- تظهر مواد النانو أو بعض مكوناتها علي الأقل ذات الأحجام التي تقع في المدي ١-١٠٠ نانو خواص طبيعية وكيماوية فريدة من خلال تأثيرها علي الحجم الكمي quantum size وتأثير الحجم الصغير mini size effect والتأثيرات السطحية surface effect الخ.

وتتيح مواد النانو إستخدام العديد من تكنولوجيات بث الاشارات signal transduction في تصنيع المحسات الحيوية. ونظرا لحجمها المتناهي في الصغر فان محسات النانو nanosensors، nanoprobe ونظم النانو الأخري تحدث ثورة في مجالات التحليل الكيماوي والبيولوجي بإتاحتها لامكانية التحليل السريع لعديد من المكونات في ذات الوقت.

٢-٦ تركيبات النانو المستخدمة في المحسات الحيوية

تمثل مواد النانو الجديدة والمستخدمة في تطبيقات التقييم الحيوي مجالا جديدا سريع التطور وقد أختبرت العديد من تركيبات النانو لتحديد خواصها وتطبيقاتها المحتملة في المحسات الحيوية. وتضم هذه التركيبات أنابيب النانو nano tubes وألياف النانو nano fibers وقضبان النانو nano rods وحبيبات النانو nano particles والأفلام الرقيقة thin films غير أن أكثرها حظا بالدراسة هي حبيبات النانو.

٢-٧ حبيبات النانو في الحس الحيوي nano particles in biosensing

هناك العديد من التطبيقات المحتملة لحبيبات النانو في المحسات الحيوية فعلي سبيل المثال فان حبيبات النانو الوظيفية functional nano particles (الأليكترونية، الضوئية والمغناطيسية) والمرتبطة بالجزيئات الحيوية (مثل الببتيدات، البروتينات، الأحماض النووية) قد تم تطويرها للاستخدام في المحسات الحيوية للتعرف علي وتكبير الاشارات وفيما يلي تعريف ببعض المحسات الحيوية القائمة علي حبيبات النانو:

١- المحسات الحيوية ذات الموجات الصوتية Acoustic wave biosensors

من بين المحسات ذات الموجات الصوتية تلك المعتمدة علي الكتلة mass المكبرة بواسطة بلورة كوارتز حيث يتم ربط حبيبة سائلة (يفضل أن يكون قطرها في حدود ٥-١٠٠ نانومتر) محورة لجسم مضاد بطريق غير مباشر الي سطح قطب عن طريق تكوين معقد مع أحد المركبات المتأينة والتي سبق تثبيتها علي سطح القطب بواسطة جسم مضاد. تؤثر الكتلة الكبيرة للحبيبة السائلة في تردد ذبذبات بلورة الكوارتز وهو ما يستخدم كأساس للكشف ويتم التقدير بنظام تنافسي.

٢- المحسات الحيوية الضوئية Optical biosensors

ذكرت بعض المراجع الأثر المقوي للرنين resonance لتجمعات النانو المعدنية metal nano clusters والمرتبط علي أحد الأسطح أنه يمكن إستخدامه في المحسات الحيوية الضوئية. وقد أستخدمت لهذا الغرض التفاعلات بين اللكتين-السكر lectin-sugar، الأنتجين-الأجسام المضادة، البروتين-مستقبلاته في هذه الطرق. وعلي ذلك فان حث إرتباط أو تفكك المادة المراد تحليلها analyte علي تجمعات النانو المعدنية والموضوعة علي مسافة محددة من سطح عاكس يفضل أن يكون موصلا للاليكترونات تنشأ عنه إشارات ضوئية يمكن تمييزها من خلال الأثر المقوي للرنين لتجمعات النانو المعدنية.

وقد إستخدمت حبيبات نانو الذهب في مجموعة جديدة من مجمعات الضوء المفلور fluorrescence quenchers لتطوير محس حيوي لتمييز والكشف عن تتابع محدد من الدنا DNA. في هذا النظام يتم ربط حبيبات نانو الذهب بجزيئ من نيوكليوتيدات الأوليجو Oligoneucletides مميزة بمجموعة سلفهيدريل في أحد أطرافها والطرف الأخر مفلور fluorophore وقد وجد أن هذا التزاوج الحيوي/غير العضوي يتكون تلقائيا علي شكل قوس علي سطح حبيبة النانو فاذا ما أرتبط الجزيئ المستهدف تقديره بذلك الشكل يتغير التركيب البنائي له يعيد الي الطرف المفلور والسابق كبح القدرة عن إنبعاث الضوء المفلور منه. والمحس الحيوي الضوئي المصمم علي هذا الأساس له القدرة علي الكشف عن طفرة تعتمد علي تغير في أحد القواعد فقط single-base mutation

٣- المحسات الحيوية المغناطيسية Magnetic biosensors

تعتبر حبيبات النانو المغناطيسية أداة تمييز قوية ومبتكرة في المجالات البيولوجية والطبية وعادة ما تحضر إما في صورة موقع واحد Single domain أو

في صورة supermagnetic (Fe_3O_7), greigite (FeS_4), maghinte (γ-Fe_2O_3) ومختلف صور الحديد ferrite. ويمكن باستخدام حبيبات النانو المغناطيسية المرتبطة بأحد الجزيئات الحيوية المميزة فصل وتركيز المادة المراد الكشف عنها. كذلك تم تطوير طرق قياس مناعية من خلال تقييم المجال المغناطيسي الناشئ من المكون المستهدف والمميز بواسطة حبيبات النانو المغناطيسية باستخدام مقياس لشدة المجال المغناطيسي magnetometer.

٤- المحسات الحيوية الكهروكيماوية Electrochemical biosensors

تصنع المحسات الحيوية الكهروكيماوية غالبا من حبيبات نانو معدنية metallic nano particles والتي يمكن أستخدامها لزيادة كمية الجزيئات الحيوية المثبته علي المحس الحيوي نتيجة لزيادة المسطح المعرض لارتباط الجزيئات مع زيادة دقة الحبيبات. وعلي ذلك فان إستخدام Au النانو الغروي في تثبيت الدنا علي قطب الذهب يخفض الحد الأدني لقدرة المحس الحيوي المحضر علي الكشف عن المواد المختبرة.

كذلك فان البلورات شبه الموصلة ذات الأحجام النانو تزيد من كفاءة التفاعلات الكيموضوئية كما يمكن ربطها بجزيئات حيوية مثل الأنزيمات لتطوير نظم كيموضوئية جديدة مبتكرة. وقد أستخدمت حبيبات النانو المعدنية أيضا لتسهيل إنتقال الاليكترونات في وسائل النانو الأليكترونية nano electronic devices ولتمييز الجزيئات البيولوجية كهروكيماويا دون التأثير علي خواصها البيولوجية وبذلك يمكن تقدير المكونات بالتجاذب affinity عن طريق متابعة الاشارات الكهروكيماوية لحبيبات النانو المعدنية. وقد إستخدمت حبيبات النانو المعدنية أيضا كعامل مساعد في تصميم المحس الحيوي.

٢-٨ تحليل الأغذية باستخدام المحسات الحيوية

تمثل الأغذية مجالا هاما لاستخدامات المحسات الحيوية. ويحتاج البعض من هذه الاستخدامات الي تحضير مسبق للعينة قبل إجراء التحليل ومن الصعب ذكر طرق إعداد العينة للتحليل تفصيلا لأختلافها باختلاف المكونات المراد تحليلها والعينة الغذائية المحللة الا أن الطرق تتضمن بصفة عامة:

١- جعل المكون المراد تحليله متاحا للتحليل مثل المكونات الداخلية للخلايا البكتيرية الممرضة.

٢- تركيز المكون من العينة أو مضاعفته الي الحد الذي يمكن الكشف عنه.

٣- إزالة المواد المثبطة الموجودة في العينة مثل الليبيدات والمثبطات الأنزيمية... الخ.

كذلك من الصعب استعراض المكونات المختلفة التي يمكن تحليلها في الأغذية والطرق المستخدمة لذلك ومن ثم فسوف نعرض المجالات العامة التي تم تطبيقها بنجاح:

١- المحسات الحيوية للكشف عن الميكروبات المرضية. تمثل المحسات الحيوية المستخدمة في الكشف عن الميكروبات المرضية قطاعا هاما في تكنولوجيا المحسات الحيوية نظرا لحجم المخاطر علي صحة الأنسان من تلك الميكروبات وأهمية سرعة الكشف عنها ليمكن السيطرة علي إنتشارها وتحجيم الأضرار الناشئة عنها وهو ما لا توفره الطرق التقليدية للكشف عن الميكروبات المرضية. وقد أسهمت تكنولوجيا النانو في تطوير كفاءة المحسات الحيوية وهناك العديد منها المنتج تجاريا. ومن الصعب حصر وتوصيف كل المحسات الحيوية المبنية علي تكنولوجيا النانو للكشف عن الميكروبات المرضية وذلك لكثرتها وتعدد الأسس

المبنية عليها ولذلك سوف نستعرض خصائص بعض هذه الطرق ومحدداتها وحدود الكشف عنها علي النحو المبين في الجدول التالي.

جدول (١-٧) المحسات الحيوية والميكروبات المرضية التي يمكن الكشف عنها وحدود الكشف ومدة التقدير ومحددات الطريقة. (Arora *et al*, 2006)

الميكروب	مدة الكشف	حدود الكشف	محددات الطريقة
١- المحسات الحيوية المناعية			
Salmonella *Salmonella typhimurium* *Stephylococcus aureous* *E.coli* 0157:H7	١٥ دقيقة حوالي ٧ دقائق	حوالي ١٠٠ خلية ٢٠ خلية/مل ١٥٠±٣٥٠ خلية/مل ٦-١٠^{٢} خلية/مل ١٠^{٣}- ١٠^{٤} خلية/مل	لا يمكن إعادة إستخدام المحس في بعض الأحيان
Bioflash™ *Staphylococcus aureous* *Yersinia meningitis* *Yersinia pestis* *Listeria monosytogenes* *Compylobacter*	١٥٠ ثانية حوالي ٢٠ دقيقة	١٠^{٣}- ١٠^{٤} خلية/مل ١٠^{٤}- ١٠^{٥} خلية/مل ١٠^{٣} خلية/مل ١٠^{٧} خلية/مل	
٢- المحسات الحيوية المبنية علي الفاج Phage display peptide biosensor			
Listeria monosytogenes *E.coli* *Yersinia pestis* Stapylococal Enterotoxin B	— — — —	— — — —	الزمن اللازم لاتمام الاختبار طويل نسبيا

obeikandl.com

الميكروب	مدة الكشف	حدود الكشف	محددات الطريقة
٣-المحسات الحيوية للدنا DNA biosensor			
E.coli *Listeria monosytogenes* *Bacillus anthracis*	— — — —	١٠خلية/٧٥٠ومل ٤٠خلية/مل	لا يمكن اعادة الاستخدام، استخلاص الدنا
٤-المحسات الحيوية البناPNA* biosensors			
غير محدد	—	مماثل للمحسات الدنا	عالي التكاليف، أستخلاص البنا
٥-المصفوفات الدقيقة Microarrys			
مصفوفات الدنا لكل من *Listeria,* *Compylobacter,* *Clostridium perfinges* *Staphylococcus* *E.coli*	— — — —	— — — —	مشاكل في تصنيعها علي هذا المستوي الدقيق
٦-المحسات المبنية علي مواد النانو Nanomaterial based sensing			
QCM-based *E.coli* 0157:H7	حوالي ٣٠ دقيقة	٢و٦٧ x $١٠^{-٢}$ خلية/مل	بساطة في الكشف، حساسية وسرعة أعلي

- PNA ببتيد حمض نيوكليك محضر معمليا ومكون من وحدات متكررة من ن-٢ أمينو أثيل جليسين مرتبط بقاعدة نيتروجينية.
- QCM, quatrz crystal microbalance.

obeikandl.com

ومن التطورات الحديثة في هذا المجال استحداث محسات يمكنها الكشف عن أكثر من ميكروب ممرض في ذات الوقت. فقد تم تطوير نانوليبوسوم لبروتين ج المستخلص من المجموعة البكتيرية group G Streptococci له القدرة علي الارتباط بالجزء Fc لمعظم الجلوبيولينات المناعية IgG المستخدمة في التقديرات المناعية. وقد أستخدم هذا المستحضر في تحضير مصفوفة لتقديرات الادمصاص المناعية Array-based immunosorbent assay للكشف عن تواجد كل من *E.coli* 0157:H7, *Salmonella, Listertia monocytogenes* بنجاح في ذات الوقت وان إختلفت حساسية الكشف لكل من هذة الميكروبات. غير أن هذا النظام لم يتم تقييمه بعد في الكشف عن هذه الميكروبات الممرضة في مواد غذائية.

٢- المحس الحيوي للكشف عن جودة اللحوم. أستخدمت محسات حيوية أنزيمية لكل من أنزيمي xanthine oxidase, putresine oxidase مثبتة علي قطب من البلاتين في تقيم فساد اللحوم أو تقدير مدة التخزين السابقة للحوم. ويعتمد المحس الحيوي المعتمد علي أنزيم putresine oxidase علي تحليل البتروسين والكدافرين المتكونة بواسطة البكتريا المسببة للفساد مكونا فوق أكسيد أيدروجين يتم تقديرة بطرق تختلف في حساسيتها. وقد وجد أن معامل الارتباط بين تقدير البتروسين بأحد هذه الطرق والمقدر باستخدام الفصل الكروماتوجرافي عالي الأداء ٩١١و.

٣- المحس الحيوي للكشف عن طزاجة الأسماك بالاعتماد علي تقدير كل من inosine, inosine 5,monophosphate.

٤- تقدير السموم البحرية. هناك العديد من حالات التسمم من الأغذية البحرية تنشأ عن تناول سموم بحرية ذات وزن جزيئ صغير مثل حمض

الأوكاديك okaduic والبرفيتوكسين brevetoxin وحمض الدوميك domic acid وتترودوتوكسين tetrodotoxin وقد أستخدمت محسات حيوية مناعية في الكشف عن تركيزات جزء في المليون منها.

٥- أمكن باستخدام المحسات الحيوية المناعية الكشف عن السموم الفطرية مثل أفلاتوكسين ب١ بتركيز جزء في المليون.

٦- تقدير الأسيتالدهيد واللاكتات في النبيذ واليوجورت (الزبادى) باستخدام محس حيوي أنزيمي يعتمد علي أنزيم Aldehyde dehydrogenase.

٧- إستخدمت المحسات الحيوية في تتبع تكون الكحول أثناء التخمرات في النبيذ والبيرة والمشروبات الكحولية.

٨- تم تطوير محسات حيوية لتتبع المبيدات الحشرية مثل الكربمات والفسفورية العضوية ومبيدات الحشائش في اللبن.

٩- تم تطوير محسات حيوية تعتمد علي تثبت خلايا خميره لتقدير سكريات الجلوكوز والسكروز واللاكتوز

١٠- المحس الحيوي لتقدير جودة الدقيق وذلك بتتبع التغيرات في النشا نتيجة لنشاط أنزيم الدياستيز.

١١- تقدير المركبات الفينولية في البيرة.

١٢- تقدير حمض البيوتريك باستخدام محس حيوي مثبت عليه خلايا بكتريا Arthrobacter nictianae.

obeikandi.com

الخلاصة

تلعب تكنولوجيا النانو دورا هاما في تطوير طرق سريعة ودقيقة لتحليل الأغذية وخاصة الكشف عن تواجد الميكروبات المرضية وبقايا الملوثات الكيماوية في الغذاء. ففي مجال المحسات الحيوية أسهمت تكنولوجيا النانو في توفير مواد نانو ذات خواص محددة للكشف عن الميكروبات والملوثات بطرق مختلفة. كما ساهم التصنيع النانو في تحضير محسات حيوية دقيقة لاستخدامات مختلفة في مجال سلامة الغذاء ومما لاشك فيه أن هذا المجال سوف يشهد تطورات جذرية هائلة في المستقبل القريب.

opeikandl.com